



Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Determinación de la funcionalidad de almidones aislados de
residuos de panificación mediante métodos físicos -
químicos y enzimáticos.**

Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:

Ingeniero en Alimentos

Autor

Carlos Ismael Mosquera Cedillo

Director

Marco Antonio Lazo Vélez

Cuenca-Ecuador

2017

DEDICATORIA

A mi hijo Nicolás,
por mostrarme lo grandioso
que es ser padre, y a Viviana por su apoyo
y amor incondicional, que me ayudan a alcanzar mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento va primeramente para mi madre, gracias por su apoyo, paciencia y amor incondicional durante mi vida personal y universitaria.

A mis Abuelos Álvaro e Isaura por sus consejos llenos de sabiduría, y por haberme criado durante mi niñez ya que gracias a ellos soy la persona de hoy en día.

A mis hermanos Danny y Ganbel, por sus alegrías, travesuras y compañerismo que me ha hecho feliz cada día de mi vida.

Al Dr. Marco Lazo, por su confianza depositada en mí, brindándome su apoyo, tiempo y conocimientos.

A mis compañeros de curso, por estar conmigo día a día durante toda mi vida universitaria.

A la Universidad del Azuay, por la confianza depositada en mí, y por su apoyo económico.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
PALABRAS CLAVES	iv
ABSTRACT	v
KEYWORDS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I MATERIALES Y MÉTODOS	3
1.1. Miga de pan.	3
1.2. Condiciones para la extracción de grasa de la miga de pan.	3
1.3. Condiciones para la extracción de proteínas por hidrólisis alcalina	3
1.4. Extracción del almidón presente en la matriz panaria.	4
1.5. Caracterización química.	4
1.6. Caracterización del almidón	5
1.5. Propiedades de funcionales del almidón.	5
1.5. Análisis estadístico	8
CAPÍTULO II RESULTADOS	9
2.1. Miga de pan.	9
2.2. Extracción de grasa.	9
2.3. Extracción de proteínas por hidrólisis alcalina	10
2.4. Extracción de grasa y proteínas de la miga blanca.	11
2.5. Caracterización del almidón	12
2.6. Propiedades funcionales del almidón.	14
CAPÍTULO III: DISCUSIONES	17
CONCLUSIÓN	220
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	224

**Determinación de la funcionalidad de almidones aislados de residuos de panificación
mediante métodos físicos - químicos y enzimáticos.**

RESUMEN

El desperdicio de pan se genera durante la fabricación, transporte, almacenamiento y caducidad del mismo. La presente investigación se centró en recuperar fracciones de nutrientes para ser reutilizados industrialmente. Los almidones fueron obtenidos luego de un proceso de desgrasado, hidrólisis alcalina y/o enzimática de la miga. La miga tratada con una solución alcalina y ficina presentó los mejores valores de almidón (74,97%), índice de solubilidad en agua (41,19 %), índice de absorción de agua (5,18), poder de hinchamiento (5,48), granulometría (80µm) y viscosidad (1461cP). Siendo sus propiedades funcionales similares al almidón de maíz, yuca y malanga.

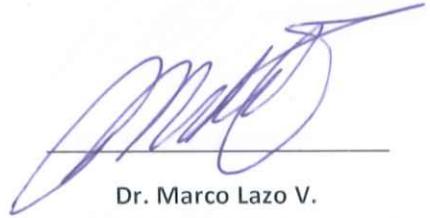
Palabras claves: Miga blanca, ficina, propiedades funcionales, hidrólisis, viscosidad.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.

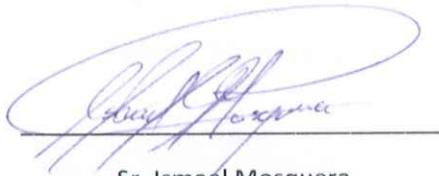
Coordinadora Escuela

Ingeniería en Alimentos



Dr. Marco Lazo V.

Director de Tesis



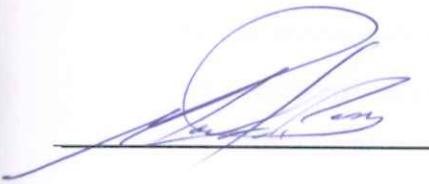
Sr. Ismael Mosquera

Autor

ABSTRACT

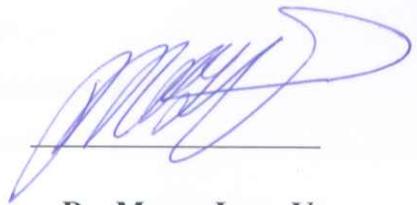
Bread waste is generated during the manufacture, transport, storage and expiration of it. The present investigation focused on recovering fractions of nutrients to be industrially reused. The starches were obtained after a defatted process, alkaline and/or enzymatic hydrolysis of the crumb. The crumb treated with an alkaline solution and ficin showed the best starch values (74,97%), water solubility index (41,19%), water absorption index (5,18), swelling power (5,48), granulometry (80 μ m) and viscosity (1461cP). Its functional properties were similar to corn starch, yucca and taro.

Keywords: White crumb, ficin, functional properties, hydrolysis, viscosity.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.

School Director



Dr. Marco Lazo V.

Thesis Director



Ismael Mosquera

Author



Translated by

Ing. Paul Arpi

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química proximal de las migas de pan.	8
Tabla 2: Porcentaje de extracción de grasa a diferentes volúmenes de n-hexano	9
Tabla 3: Porcentaje de extracción de proteínas en las etapas de hidrólisis alcalina.....	9
Tabla4: Composición química proximal de la miga blanca luego del desgrasado e hidrólisis alcalina y/o hidrólisis enzimática.....	10
Tabla 5: Contenido de almidón total, resistente, dañado, amilosa, amilopectina, sacarosa y glucosa en las migas ricas en almidón.....	12
Tabla 6: Propiedades funcionales de las migas ricas en almidón.....	13
Tabla 7: Viscosidad de las muestras ricas en almidón con suspensiones del 10,15 y 20 % (p/v).	154

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama sobre la purificación de almidón	6
Figura 2: Porcentaje de retención de las muestras ricas en almidón vs la abertura de malla	16

Índice de anexos

Anexo 1	25
Figura 3: Tiempo de reacción de ficina, bromelina y papaína.	25
Figura 4: Curvas de proteína soluble en función del tiempo a diferentes concentraciones de: a) papaína, (pH 7,0, 50° C), b) ficina (pH 7,0, 39°C) y c) bromelina (pH 4,0, 40°C)	26
Figura 5: Curva de Michaelis-Menten para la hidrólisis con papaína, (pH 7,0, 50° C), ficina (pH 7,0, 39°C) y bromelina (pH 4,0, 40°C)	26
Figura 6: Regresión de Lineweaver-Burk para la hidrólisis con papaína, (pH 7,0, 50° C), ficina (pH 7,0, 39°C) y bromelina (pH 4,0, 40°C)	27

Carlos Ismael Mosquera Cedillo

Trabajo de Graduación

Marco Antonio Lazo Vélez, PhD.

Diciembre del 2017

Determinación de la funcionalidad de almidones aislados de residuos de panificación mediante métodos físicos - químicos y enzimáticos.

INTRODUCCIÓN

La merma, pérdida o desperdicio de alimentos que hoy en día son generados alrededor del mundo representan un tercio del total de la producción mundial. En América Latina se generan aproximadamente entre un 20 -30 % de los desperdicios totales de la producción de cereales y sus derivados; dentro de estos desperdicios de cereales encontramos los residuos de panificación (Gustavsson et al., 2012). En el Ecuador, 4,6 millones de toneladas métricas de desechos por año son contabilizadas por el ministerio del ambiente (El Comercio, 2014), de esta cifra, el 60 % corresponde a materia orgánica que puede ser considerada como desperdicios de alimentos.

Según el INEC, 2012 el gasto corriente mensual de los ecuatorianos para pan de trigo se estima alrededor de 34' 344.155 dólares ocupando el primer lugar de gasto por compra de alimentos. En el país, los residuos de panificación han sido utilizados de forma mayoritaria para la alimentación de animales y para la elaboración de miga de pan; este último frecuentemente es usado en la elaboración de empanizados. La miga es obtenida luego del secado y reducción del pan y vendida directamente a los consumidores como apanadura. Una pequeña porción de toda la miga producida en una panificadora es reutilizada como materia prima agregada indirectamente en el interior y en el exterior de panes tradicionales (pan con chocolate, pan enmigado, etc.); sin embargo, su uso en estos productos es limitado, no siendo mayor del 4% de la fórmula total. Valores superiores de sustitución presenta un gran problema tecnológico y de calidad.

Por otro lado, el pan es un producto con alto valor energético, rico en proteínas y valor lipídico cuando se trata de pan especial que ha sido enriquecido con grasas vegetal o animal. Sus macro nutrientes mayoritarios son los carbohidratos (CHO), que representan entre el 50 - 60% de la composición química del pan, siendo aproximadamente el 47% almidones procesados (Salvador, 2001). Estos almidones, se encuentran de forma retrogradada y como almidones nativos, en la corteza se encuentran la mayor cantidad de almidón nativo debido a que estos no alcanzan a gelificar por estar en un medio con bajo contenido de agua. (Primo-Martín et al, 2007). Los almidones presentes en los desperdicios de pan pueden ser todavía tecnológicamente aprovechables, debido a que presentan la propiedad de reestructurar su

configuración espacial gracias a la temperatura, perdiendo así su retrogradación (Johansson et al, 1984). Estos almidones están formados en su mayoría por almidón dañado y almidón resistente; el primero se forma durante la molienda del trigo debido al daño físico que sufren los gránulos de almidón y el segundo es la porción de almidón considerada parte de la fibra dietética que no puede ser hidrolizado por las enzimas humanas en el intestino delgado (Saldivar, 2013).

En la actualidad muchos de los residuos alimenticios son aprovechados como materia prima potencial para la fabricación de un sin número de productos, esto dado a los grandes volúmenes que se generan a nivel mundial y a la fácil disposición de cantidades significativas de moléculas funcionales, como son carbohidratos, proteínas, triglicéridos, ácidos grasos, compuestos fenólicos; por lo tanto, todo residuo alimenticio puede ser considerado como materia prima para la obtención de moléculas funcionales. Así el aumento de la demanda de productos químicos o aditivos alimentarios, impulsados por factores como la superpoblación, la contaminación del ambiente y otros, hace necesario la innovación y el desarrollo de nuevas estrategias para la obtención de recursos renovables (Lin et al., 2013).

El objetivo principal de esta investigación es el aislamiento del almidón de la matriz panaria, con la finalidad de obtener almidón tecnológicamente aprovechable a través de procesos físicos de descortezado, pulverizado, mezclado y secado, que forman parte del estandarizado de la miga; procesos químicos de desengrasado de la miga con n-hexano e hidrólisis de proteínas con NaOH, además de procesos bioquímicos como son el uso de enzimas papaína, ficina y bromelina. Para ello se determinará el mejor proceso de purificación de almidón valorando sus propiedades físico químicas (contenido de almidón total, almidón resistente, almidón dañado, amilosa/amilopectina, análisis proximales) y funcionales (índice absorción de agua, índice de solubilidad en agua, poder de hinchamiento, claridad de las pastas, granulometría, viscosidad).

CAPÍTULO I MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Miga de pan.

El pan duro y miga de pan comercial (MPC) fueron adquiridos de una pequeña empresa panadera ubicada en la ciudad de Cuenca.

Del pan duro se separó manualmente la corteza obteniendo miga de corteza (MC) y miga blanca (MB) que será utilizada para la obtención de almidón. Las muestras MC y MB se secaron a 45°C en una cámara de circulación de aire forzado marca Tecnopast durante 24 horas. Luego se molieron por separado en un molino para café marca Krups, GX4100 y se almacenaron en fundas para congelación a -20 °C en un congelador marca Arctiko, G214.

1.2. Condiciones para la extracción de grasa de la miga de pan.

Para la optimización del proceso de desgrasado fue utilizada la miga comercial (MPC). Tres diferentes volúmenes de n- hexano: 30, 40 o 50 mL fueron mezclados con 50 gr de miga de pan durante 90 min con agitación manual en intervalos de 15 min. Este procedimiento se repitió 3 veces. Transcurrido el tiempo las soluciones se filtraron en papel filtro Whatman N° 40. Finalmente se eliminó el solvente de la miga desengrasada usando secado al aire bajo una campana de extracción marca Esco, SPD-4A2 hasta que el olor del solvente era imperceptible.

1.3. Condiciones para la extracción de proteínas por hidrólisis alcalina.

Para determinar las condiciones de extracción de proteínas se realizaron 4 hidrólisis consecutivas con una solución de NaOH 0,2 % (Seung et al., 1999). Para ello, 50g de la MB baja en grasa fue suspendida en 150 mL (1: 3 P/V) de NaOH 0,2% y se dejó reaccionar por 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la hidrólisis, la suspensión se centrifugó a 1800 g por 10 min en una centrifuga marca Eppendorf 22800. El precipitado resultante se re suspendió en agua destilada (1:2, P/V) y se neutralizó a pH 7,0 usando HCl 0,1 N, se lavó con agua destilada y con alcohol Etilico al 96% (1:2, P/V). Tanto la neutralización como los lavados fueron seguidos por centrifugación a 1800 g por 10 min. Finalmente se secó a 40 °C por 24 horas. El contenido residual de proteína en los sobrenadantes obtenidos en cada etapa del proceso fue analizado colorimétricamente mediante el método de Bradford.

El porcentaje de extracción de proteínas fue calculado según la fórmula 1

$$PEP = \left(1 - \frac{\%Pmh}{\%Pmi}\right) \times 100 \quad [1]$$

De donde:

Pmh: Porcentaje de proteína en la muestra luego de la hidrólisis

Pmi: Porcentaje de proteína en la muestra sin hidrolizar

1.4. Extracción del almidón presente en la matriz panaria.

Para obtener el almidón presente en la matriz panaria, se eliminó directamente las grasas y proteínas mediante procesos químicos y enzimáticos. Mientras tanto, carbohidratos como la fibra y los azúcares que se encuentran en la miga de pan fueron eliminados indirectamente por los procesos llevados a cabo para la obtención de almidón.

Se retiró la grasa de la muestra MB, por ser la que menor cantidad de grasa y mayor cantidad de carbohidratos presenta. Para ello se suspendió la muestra con n-hexano en proporción 1:0,6(P/V), se mezcló y dejó actuar por 90 min con agitación. Luego se dejó decantar por 30 min y se retiró cuidadosamente el solvente (hexano + grasa) que posteriormente se recuperó por destilación en un rota vapor marca BUCHI, R-200. Los sólidos se extendieron sobre papel aluminio y se secaron a temperatura ambiente dentro de la campana, esta extracción se repitió 3 veces. Cabe mencionar que no se realizó una cuarta extracción debido a que el contenido graso se elimina en los procesos posteriores.

La extracción de proteínas por hidrólisis alcalina se realizó luego del desgrasado mediante el proceso descrito en el punto 1.3 exceptuando la cuarta hidrólisis con NaOH 0,2%. Por otro lado, las muestras miga blanca desgrasada (MBD) y miga blanca con hidrólisis alcalina (MBA) se hidrolizaron enzimáticamente con papaína (tampón de fosfatos 0,1M pH 7,0; 50°C), ficina (tampón de fosfatos 0,1M pH 7,0; 39°C) y bromelina (tampón de acetatos 0,1M pH 4,0; 40°C), todas provistas por Sigma. Las reacciones se llevaron a cabo con concentraciones enzimáticas de 0,09 U/mL de suspensión, 0,9 U/mg de proteína y 10 mg/g de proteína en tiempos de reacción de 10,20 y 40 min para la papaína, ficina y bromelina, respectivamente. Terminada la reacción se inactivaron las enzimas a 90°C/ 5min y la suspensión hidrolizada con bromelina se neutralizó a pH 7,0 con HCl 0,1 N. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 1800 g por 10 min y el precipitado se lavó 3 veces con agua destilada, seguido por centrifugación. Finalmente, los precipitados se secaron (40 °C por 24 horas) y molieron. Los análisis proximales de las muestras se realizaron con las técnicas descritas en el punto 1.5. En la Figura 1 se resume el proceso utilizado para la purificación del almidón presente en la muestra MB.

En el anexo 1 se observa las curvas de cinética enzimática para cada enzima utilizada con miga de pan como sustrato.

1.5. Caracterización química.

Los análisis de humedad, grasa, fibra, así como los de cenizas y proteína fueron realizadas de acuerdo a las normas AOAC 925:09, 920:39, 962:09, y norma INEN NTE 520:2013,

519:2012, respectivamente. El extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) se determinó por diferencia.

1.6. Caracterización del almidón.

La caracterización del almidón presente en las muestras se realizó con diferentes kits colorimétricos provistos por *Megazyme (Wicklow, Irlanda)*. La determinación del contenido total de almidón, almidón resistente, almidón dañado, así como el contenido de amilosa y amilopectina y de sacarosa y glucosa se realizaron con *Total Starch Assay Kit (AA/AMG) K-TSTA*; *Resistant Starch Assay Kit K-RSTAR* y *Starch Damage Assay Kit;K-SDAM*, *Amylose/Amylopectin Assay Kit K-AMY* y *Raffinose/Sucrose/Glucose Kit K-RAFGL*, respectivamente.

1.7. Propiedades funcionales del almidón.

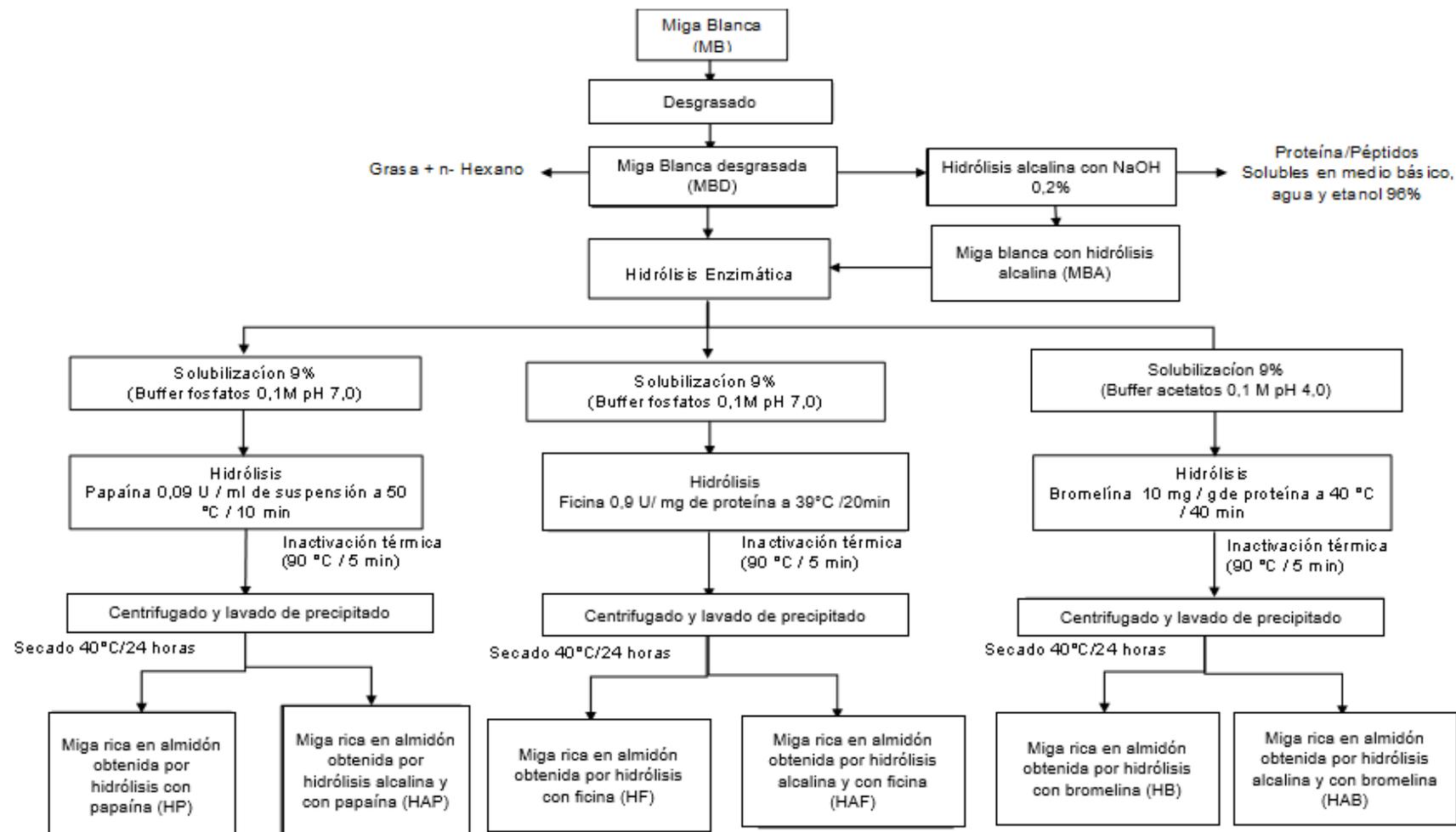
El índice de absorción de agua, índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento se midieron según el método descrito por Anderson et al., (1969) mencionado por la FAO (2007). De forma resumida, se pesó 650 mg de cada muestra (base seca) en tubos para centrifuga secos y previamente pesados, se agregó 15 mL de agua destilada a 60 °C y se agitó con suavidad hasta suspender las muestras. Se colocaron las muestras en baño de agua a 60 °C por 30 min, con agitación cada 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 2550 g/ 30 min. Se midió el volumen del sobrenadante de cada muestra, e inmediatamente se tomó 10 mL del sobrenadante y se colocó en una caja Petri, previamente pesada, que luego se secó en una estufa a 70 °C por una noche. Finalmente se pesaron los tubos que contienen el precipitado (gel) y las cajas Petri luego del secado. Los cálculos de los parámetros mencionados se basaron en las fórmulas 2,3 y 4:

$$\text{Índice de absorción de agua (IAA)} = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso de la muestras(g)}} \quad [2]$$

$$\text{Índice en solubilidad en agua (ISA)} = \frac{\text{Peso de solubles(g)} * \text{Volumen medido} * 10}{\text{Peso de la muestra(g)}} \quad [3]$$

$$\text{Poder de hinchamiento (PH)} = \frac{\text{Peso del gel (g)}}{\text{Peso de la muestras(g)} - \text{peso de solubles (g)}} \quad [4]$$

Figura 1: Diagrama sobre la purificación de almidón



Para la determinación del porcentaje de claridad de las pastas y la densidad aparente se siguió los protocolos de la FAO (2007). Para la determinación del primero de ellos, se pesó 200 mg de muestra en tubos para centrifuga, se suspendió con 20 mL de agua destilada a temperatura ambiente y se agitó suavemente, se colocó los tubos en baño de agua en ebullición por 30 min con agitación en intervalos de 5 min. Se enfrió la suspensión a temperatura ambiente y se midió la transmitancia a una longitud de onda de 650 nm, utilizando agua destilada como blanco. El porcentaje de transmitancia se obtuvo con la fórmula 5:

$$A_{650} = 2 - \log \%T \quad [5]$$

Los valores de densidad se obtuvieron al llenar con muestra una probeta de 10 mL, para ello se impartió pequeños golpes constantes hasta que la muestra alcance el volumen total de la probeta. Para los cálculos se pesó la probeta vacía, la probeta llena de muestra luego del proceso y se reemplazó los datos en la fórmula 6.

$$\text{Densidad aparente del almidón} = \frac{[(\text{Peso de la Probeta} + \text{Almidón empacado})(g)] - \text{peso de la probeta}(g)}{\text{Volumen de muestra empacada}(mL)} \quad [6]$$

Para determinar la granulometría de las muestras se utilizó la técnica del ISI, (2002) con modificaciones en la abertura de malla (0,25; 0,125; 0,08 y 0,008 mm). Brevemente se colocó 10 gr de muestra en tamiz superior y se agitó por 30 min manualmente, se pesó cada tamiz que contiene la fracción resultante y el porcentaje de retención se calculó a partir de la fórmula 7:

$$\text{Porcentaje de retención} = \frac{[(\text{Peso del tamiz} + \text{fracción de almidón})(g)] - \text{peso del tamiz}(g)}{\text{Peso de la muestra}(g)} \times 100 \quad [7]$$

Finalmente, el análisis de viscosidad se basó en la técnica de ISI, (2002) preparando suspensiones con concentraciones de: 10, 15 y 20%, se calentó la suspensión en un vaso de precipitación con agitación hasta ebullición. Se enfrió el gel a 25 °C y se midió la viscosidad en un Viscoamílografo FungiLab, Alpha con spines TR8 para las suspensiones de 10 y 15% y TR10 para la suspensión de 20%, con una velocidad máxima de 5 rpm en un tiempo de 400 segundos y se reportó la viscosidad calculada directamente por el equipo.

1.8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico JMP-13. Todos los análisis se expresaron como desviación estándar media de mínimo tres réplicas independientes ($n = 3$), a menos que se indique lo contrario. Cuando fue apropiado, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por un análisis de Tukey para evaluar las diferencias entre las muestras, a un nivel de significancia de $p < 0,05$.

CAPÍTULO II RESULTADOS

2.1. Miga de pan.

En la Tabla 1 se puede observar la composición química de las migas de pan evaluadas para la obtención de los concentrados de almidón. Los resultados del porcentaje de carbohidratos, cenizas y proteína, no varían significativamente entre las tres muestras estudiadas. Por otro lado, los contenidos de humedad y grasa presentaron variaciones significativas ($p < 0,05$), siendo la muestra MB la que contiene la menor cantidad de grasa y de proteína.

Tabla 1: Composición química proximal de las migas de pan.

Muestras ¹	Humedad (%)	Grasa (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Fibra (%)	Carbohidratos (%)
Miga Blanca(MB)	4,8 ± 0,05 ^a	5,92 ± 0,16 ^b	1,93 ± 0,35 ^a	13,14 ± 2,40 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	78,59 ± 2,87 ^a
Miga Corteza(MC)	4,6 ± 0,10 ^b	7,79 ± 0,30 ^b	2,13 ± 0,05 ^a	14,91 ± 1,85 ^a	0,40 ± 0,05 ^b	74,98 ± 1,76 ^a
Miga de Pan Comercial (MPC)	3,28 ± 0,06 ^c	8,91 ± 0,70 ^a	1,99 ± 0,05 ^a	15,38 ± 0,72 ^a	0,18 ± 0,06 ^b	73,59 ± 2,91 ^a

¹Los datos son media ± desviación estándar expresadas en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

2.2. Extracción grasa.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del desgrasado valorados en MPC. En esta, se puede observar como el porcentaje de extracción de grasa (PEG) varía en los diferentes volúmenes de n-hexano y número de extracciones valorados. El PEG no presentó variación significativa ($p < 0,05$) durante las dos primeras extracciones ni con los tres volúmenes de n-hexano ensayados. Para la tercera extracción se observó una diferencia significativa entre los 3 volúmenes analizados, siendo el último volumen el que más grasa extrae en el proceso. Cabe mencionar que se realizó una cuarta extracción con el volumen de 50 mL y ésta extrajo un 7 % más de grasa, obteniendo un PEG de 92,73%.

Tabla 2: Porcentaje de extracción de grasa a diferentes volúmenes de n-hexano

Volumen de n-hexano(mL)	¹ PEG(Extracción 1)	PEG(Extracción 2)	PEG(Extracción 3)
	%	%	%
30	12,50 ± 1,42 ^a	47,22 ± 1,25 ^a	69,53 ± 0,98 ^a
40	10,98 ± 1,25 ^a	53,28 ± 0,89 ^a	75,38 ± 1,78 ^b
50	11,62 ± 1,96 ^a	54,23 ± 3,12 ^a	85,73 ± 2,14 ^c

¹PRG: El “porcentaje de extracción de grasas”, representa los gramos de grasa extraídos por cada 100 gramos de grasa inicial presente en la muestra MPC. Los datos son media ± desviación estándar expresadas en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

La grasa de la MB fue separada usando una relación p/v de 1:1.8, miga/n-hexano, con tres extracciones sucesivas. Esta relación logró reducir el contenido de grasa en MB a valores inferiores al 2%, alcanzando una reducción total cercana al 0,5% de grasa al final del proceso.

2.3. Extracción de proteínas por hidrólisis alcalina.

Los porcentajes de extracción de proteínas luego de la hidrólisis alcalina, lavados con agua y etanol a MB baja en grasa pueden ser observados en la Tabla 3.

Tabla 3: Porcentaje de extracción de proteínas en las etapas de hidrólisis alcalina

Tratamientos	Número de tratamiento	PEP ¹ (%)
Hidrólisis con NaOH 0,2%	1	13,62 ± 3,23 ^a
	2	7,18 ± 1,33 ^b
	3	0,56 ± 0,08 ^c
	4	0,39 ± 0,23 ^c
Lavado con H ₂ O	1	7,89 ± 0,75 ^b
	2	0,68 ± 0,11 ^c
Lavado con etanol 96%	1	0,60 ± 0,12 ^c
PEP Total		≈ 30,92

¹PEP: El “porcentaje de extracción de proteínas” expresa, los gramos de proteína hidrolizada presentes en el sobrenadante por cada 100 gramos de proteína presentes en la muestra MBD. Los datos son media ± desviación estándar. Los valores con las mismas letras no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Basándose en los datos, se alega que la primera y segunda hidrólisis con NaOH 0,2% son significativamente diferentes, siendo la primera hidrólisis la que mayor porcentaje de extracción de proteína presentó. Mientras, se observó que la tercera y cuarta hidrólisis con NaOH 0,2% presentaron un menor PEP y no son significativamente diferentes entre ellas.

Por otro lado, se observó que el primer y segundo lavado con agua son significativamente diferente entre ellos. Así, el primer lavado presentó el mayor PEP. Interesantemente el porcentaje de extracción de este paso (7,2%) se aproximó al valor que tiene el segundo tratamiento de hidrólisis alcalina (7,8%). Por otra parte, el lavado con el etanol, no presenta un PEP alto (0,60%) y es similar al segundo lavado con agua (0,68 %) y a la tercera (0,56) y cuarta (0,39 %) hidrólisis con NaOH 0,2% (Tabla 3).

2.4. Extracción de grasa y proteínas de la miga blanca.

En la Tabla 4 se muestran los parámetros químicos proximales de las muestras control y muestras ricas en almidón luego de la hidrólisis enzimática. En esta tabla, también se puede observar como varían los parámetros químicos luego del desgrasado e hidrólisis alcalina.

Tabla 4: Composición química proximal de la miga blanca luego del desgrasado e hidrólisis alcalina y/o hidrólisis enzimática.

	Muestras ¹	Humedad	Grasas	Cenizas	Proteína	Fibra	Carbohidratos
Controles	MB	4,83 ± 0,06 ^{bc}	5,92 ± 0,17 ^a	1,94 ± 0,36 ^{bc}	13,81 ± 1,35 ^a	0,63 ± 0,20 ^b	77,70 ± 1,64 ^c
	MBD	8,10 ± 0,86 ^a	1,59 ± 0,22 ^c	2,73 ± 0,09 ^{ab}	10,90 ± 0,58 ^b	0,69 ± 0,12 ^b	84,08 ± 0,92 ^b
	MBA	5,64 ± 0,58 ^b	0,77 ± 0,03 ^d	0,61 ± 0,15 ^c	6,65 ± 0,43 ^c	N/D ²	91,98 ± 0,56 ^a
Hidrólisis enzimática	HP	4,62 ± 0,55 ^{bc}	2,32 ± 0,45 ^b	3,85 ± 1,09 ^{ab}	9,89 ± 0,48 ^b	0,80 ± 0,15 ^b	83,11 ± 1,64 ^b
	HB	5,31 ± 1,50 ^{bc}	2,31 ± 0,11 ^b	3,69 ± 1,08 ^b	6,80 ± 1,85 ^c	0,77 ± 0,21 ^b	86,43 ± 1,56 ^b
	HF	2,39 ± 0,31 ^{dc}	2,59 ± 0,11 ^b	5,77 ± 2,6 ^a	4,99 ± 0,08 ^c	1,37 ± 0,32 ^a	82,71 ± 0,52 ^b
Hidrólisis alcalina y enzimática	HAP	2,33 ± 0,61 ^d	0,68 ± 0,11 ^d	1,44 ± 0,08 ^{bc}	5,77 ± 0,73 ^c	N/D	92,11 ± 0,74 ^a
	HAB	5,71 ± 1,28 ^{ab}	0,59 ± 0,12 ^d	1,74 ± 0,55 ^{ab}	5,59 ± 0,32 ^c	N/D	92,07 ± 1,26 ^a
	HAF	3,09 ± 0,25 ^{cd}	0,30 ± 0,01 ^d	1,81 ± 0,56 ^{bc}	3,70 ± 0,12 ^d	N/D	94,12 ± 0,23 ^a

¹MB: miga blanca, MBD: miga blanca desgrasada. HP, HB y HF: miga rica en almidón obtenida por hidrólisis con papaína, bromelina y ficina, respectivamente. MBA: miga blanca con hidrólisis alcalina. HAP, HAB y HAF: miga rica en almidón con hidrólisis alcalina y de papaína, bromelina y ficina, respectivamente. Los datos son media ± desviación estándar expresadas en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

²N/D: No detectable por el equipo.

El contenido de grasa en la muestra MB disminuyó significativamente luego del desgrasado (Tabla 4). Mientras, el contenido residual de grasa en la muestra MBD disminuye considerablemente luego de la hidrólisis alcalina. Para los dos grupos de concentrados de almidón obtenidos con y sin hidrólisis alcalina y en ambos casos, tratados enzimáticamente, la concentración de grasa aumentó para las primeras, mientras que no presentó variación significativa para las segundas (Tabla 4).

En cuanto al contenido de fibra se observó que en la muestra MBD no varía significativamente luego del desgrasado. Sin embargo, luego de hidrólisis alcalina el contenido de fibra no es detectable por el equipo utilizado (Tabla 4). Interesantemente, la muestra MBD presentó un aumento en el contenido de fibra luego de la acción de la enzima ficina.

Por otro lado, se observó que el contenido de cenizas estuvo relacionado al contenido de fibra, así, las muestras derivadas de la hidrólisis alcalina presentaron los niveles más bajos de cenizas y fibra, mientras que, las muestras sin hidrólisis alcalina presentaron los valores más altos.

En cuanto al contenido proteico, se aprecia que el desgrasado de la muestra MB redujo considerable la cantidad de proteína. Por otro lado, la hidrólisis alcalina de la muestra MBD generó un porcentaje de extracción de proteínas (PEP) de 38% (este rendimiento se calculó según la fórmula 1). Mientras que la hidrólisis con papaína, bromelina y ficina presentaron PEP de 9,26; 37,61 y 54,22 %, respectivamente. Cabe mencionar que la hidrólisis con papaína fue el único proceso que no redujo considerablemente el contenido proteico de la muestra MBD.

El contenido proteico de la muestra MBA tratada con papaína y bromelina presentaron un PEP de 13,26 y 15,94 %, respectivamente. Mientras que el PEP de la ficina fue de un 44,3%, siendo este último, el de mayor eficiencia de extracción.

Si incorporamos el PEP de la hidrólisis alcalina más la hidrólisis catalizada por la papaína, bromelina y ficina, se obtienen porcentajes de 58,21; 59,52 y 73,21%, respectivamente, demostrando así, que la hidrólisis alcalina más la hidrólisis catalizada por ficina son las más eficiente para la eliminación de materia nitrogenada.

2.5. Caracterización del almidón.

La Tabla 5 contiene los porcentajes de almidón total, resistente, dañado, amilosa y amilopectina que se encuentran en las migas ricas en almidón obtenidas luego de los procesos de desgrasado e hidrólisis de proteínas. Así como también los porcentajes de sacarosa y glucosa.

Tabla 5: Contenido de almidón total, resistente, dañado, amilosa, amilopectina, sacarosa y glucosa en las migas ricas en almidón.

	Muestra ¹	Almidón total %(p/p)	Almidón resistente %(p/p)	Almidón dañado %(p/p)	Amilosa %(g/100 almidón)	Amilopectina %(g/100 almidón)	Sacarosa %(p/p)	Glucosa %(p/p)
Controles	MB	42,74± 1.01 ^d	1,10 ± 0,01 ^d	29,91±0,23 ^d	13,28±0,55 ^d	86,71±0,38 ^a	2,54±0,49 ^a	2,13±0,12 ^a
	MBD	61,45±1,34 ^c	1,35 ± 0,01 ^{cd}	46,01±0,98 ^c	16,43±0,75 ^{cd}	83,56±0,61 ^{ba}	1,15±0,19 ^b	1,07±0,05 ^b
	MBA	67,30±0,91 ^{bc}	2,50 ± 0,03 ^a	51,90±0,11 ^{ab}	18,65±0,66 ^{bc}	81,34±0,54 ^{cb}	0	0
Hidrólisis enzimática	HP	66,24±1,19 ^{bc}	1,93 ± 0,07 ^b	46,72±2,7 ^{cb}	17,77±0,90 ^{bc}	82,22±0,73 ^{cb}	0	0
	HB	68,27±1,34 ^{bc}	1,88 ± 0,27 ^{bc}	48,11±0,85 ^{bc}	19,12±0,99 ^{bc}	80,87±0,81 ^{cb}	0	0
	HF	70,52±1,72 ^b	2,04 ± 0,05 ^{ab}	47,56±1,26 ^{cb}	21,2 ±0,91 ^{ab}	78,73±0,64 ^{dc}	0	0
Hidrólisis alcalina y enzimática	HAP	72,45±5,50 ^b	2,44 ± 0,12 ^{ab}	50,54±0,54 ^{ab}	19,34±2,10 ^{bc}	80,65±1,71 ^{cb}	0	0
	HAB	69,89±1,27 ^b	2,67 ± 0,35 ^a	50,74±2,08 ^{ab}	20,31±1,26 ^{ab}	79,68±1,03 ^{dc}	0	0
	HAF	74,97±1,49 ^a	2,74 ± 0,25 ^a	55,27±2,11 ^a	24,48±3,03 ^a	75,51±2,11 ^d	0	0

¹**MB:** miga blanca, **MBD:** miga blanca desgrasada. **HP, HB y HF:** miga rica en almidón obtenida por hidrólisis con papaína, bromelina y ficina, respectivamente. **MBA:** miga blanca con hidrólisis alcalina. **HAP, HAB y HAF:** miga rica en almidón con hidrólisis alcalina y de papaína, bromelina y ficina, respectivamente. Los datos son media ± desviación estándar expresadas en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

Se observó que el contenido de almidón total (AT) de la muestra HAF fue estadísticamente el más alto. Sin embargo, en las restantes muestras con y sin hidrólisis alcalina y enzimática no se presentó diferencias significativas en el contenido de AT. El incremento de la concentración de almidón fue un 25,53% en la MBD y en promedio un 27,65 % en las migas hidrolizadas, cuando fueron comparadas con la muestra control (MB); demostrando que el proceso de extracción de grasa y proteínas ayudó a la concentración del almidón en las muestras estudiadas.

Por otro lado, los resultados mostraron que el contenido de AR aumenta considerablemente en las muestras que involucraron la hidrólisis alcalina en su proceso. Así, las tres muestras con mayor contenido de AR son MBA, HAB y HAF y presentaron 1,40, 1,57 y 1,64 %, más AR que la muestra control (MB), respectivamente (Tabla 5).

El contenido de AD se incrementó durante cada uno de los pasos de obtención de los concentrados (desgrasado, hidrólisis alcalina y enzimática) siendo en promedio el 50% del almidón total cuantificado y el tipo de almidón más representativo. A su vez, se observa que las muestra obtenidas por hidrólisis alcalina (HA) contienen en promedio 1,1 veces más AD que sus contrapartes no hidrolizadas alcalinamente. Por otro lado, se observó que el contenido de AD no varía significativamente entre las diferentes enzimas utilizadas para la hidrólisis enzimática tanto en el grupo de las muestras alcalinizadas y no alcalinizadas. Siendo la muestra HAF la que presenta una tendencia más alta (Tabla 5).

El contenido de amilosa aumenta luego de la hidrólisis enzimática en las muestras con y sin hidrólisis alcalina, mientras el contenido de amilopectina disminuye para estos dos grupos de muestras. Además, el contenido de amilosa en las muestras con y sin hidrólisis alcalina aumenta alrededor de un 5 y 10 %, respectivamente (Tabla 5). Finalmente, como era de esperar los contenidos iniciales de sacarosa y glucosa, presentes en MB y MBD, no fueron detectados en ninguna de las muestras tratadas con cualquiera de las hidrólisis ensayadas.

2.6. Propiedades funcionales del almidón.

Tabla 6: Propiedades funcionales de las migas ricas en almidón.

	Muestras ¹	ISA ²	IAA ²	PH ²	CP ²	DA ²
Sin Hidrólisis alcalina	HP	21,53 ± 1,38 ^{bc}	4,66 ± 0,79 ^a	5,59 ± 1,02 ^a	20,85 ± 2,46 ^c	0,8725 ± 0,03 ^{ab}
	HB	15,72 ± 2,8 ^c	4,80 ± 0,84 ^a	5,48 ± 1,08 ^a	47,78 ± 0,84 ^a	0,8831 ± 0,01 ^{ab}
	HF	21,98 ± 1,06 ^{bc}	4,55 ± 0,09 ^a	5,48 ± 0,05 ^a	19,44 ± 0,84 ^c	0,8112 ± 0,09 ^b
Con hidrólisis Alcalina	HAP	34,94 ± 2,47 ^a	4,19 ± 0,26 ^a	5,75 0,44 ^a	27,31 ± 1,89 ^{bc}	0,9010 ± 0,03 ^a
	HAB	25,48 ± 0,77 ^b	4,52 ± 0,36 ^a	5,62 ± 0,42 ^a	50,54 ± 3,31 ^a	0,9012 ± 0,01 ^a
	HAF	41, 19 ± 3,83 ^a	5,18 ± 0,38 ^a	5,48 ± 1,08 ^a	33,39 ± 2,60 ^b	0,8530 ± 0,02 ^{ab}

¹**HP, HB y HF:** miga rica en almidón obtenida por hidrólisis con papaína, bromelina y ficina, respectivamente. **HAP, HAB y HAF:** miga rica en almidón con hidrólisis alcalina y de papaína, bromelina y ficina, respectivamente.

²**ISA:** índice de solubilidad en agua a 60 °C: g de solubles /g 100 de H₂O; **IAA:** índice de absorción de agua: g de gel/g de muestra a 60 °C; **PH:** Poder de hinchamiento: g de gel/ g de muestra insoluble a 60 °C; **CP:** claridad de las pastas: Porcentaje de transmitancia a 650 nm; **DE:** densidad aparente; g/mL. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

En la Tabla 6 se observa que el índice de solubilidad en agua (ISA) de las muestras HAF (41,19%) y HAP (34,94%) fueron los más altos. Estos varían significativamente en la muestra HAB (25,48%), la cual, a su vez, es similar a las muestras HP (21,53%) y HF (21,98%). Mientras la muestra HB (15,72%) tuvo el menor porcentaje de ISA. Por otro lado, el índice de

absorción de agua (IAA) no varió significativamente entre las muestras, y se encuentra entre 4,19 y 5,18. De esto, se aprecia que la muestra HAF tiene el mayor IAA. De igual manera, se observa que el poder de hinchamiento (PH) de las muestras ricas en almidón no varió significativamente.

Interesantemente, se aprecia que las muestras hidrolizadas con bromelina (HB, HAB) presentaron porcentajes de transmitancia ($_{650\text{ nm}}$) similares, y a su vez varían significativamente de las otras muestras con los porcentajes de transmitancia más altos (Tabla 6).

Por otro lado, las medidas de la densidad aparente en las muestras ricas en almidón con y sin hidrólisis alcalina presentaron valores (0,8112-0,9012 g/mL) inferiores a la densidad del agua. De estas, las muestras derivadas de la hidrólisis con ficina varían significativamente del resto, siendo las menos densas.

En la Tabla 7 se observa la viscosidad a diferentes concentraciones de suspensiones (miga-agua). Se puede observar que al 10 % las muestras varían significativamente entre ellas siendo la muestra HF la que mayor viscosidad tuvo. Por otro lado, cuando las muestras se suspenden al 15% el valor de viscosidad de cada una no varía significativamente, con excepción de la muestra HP que presentó el mayor valor de viscosidad. Se observa también, que suspensiones al 20% produjeron valores de viscosidad que no varían significativamente entre ellos.

Tabla 7: Viscosidad de las muestras ricas en almidón con suspensiones del 10,15 y 20 % (p/v).

Muestras ¹	Viscosidad ² (Suspensión10% p/v) Poises	Viscosidad (Suspensión15% p/v) Poises	Viscosidad (Suspensión 20% p/v) Poises
HP	22,12 ±5,01x10 E2 ^{ab}	143,70±2,05x10 E2 ^a	223,46±16,20x10 E2 ^a
HB	11,34 ±3,37x10 E2 ^b	53,84±1,40x10 E2 ^b	268,85±45,80x10 E2 ^a
HF	28,69 ±1,00 x10 E2 ^a	26,15±0,37x10 E2 ^b	299,50±2,10x10 E2 ^a
HAP	16,22 ±4,40x10 E2 ^b	25,11±0,30x10 E2 ^b	233,85±63,60x10 E2 ^a
HAB	15,32 ±1,20x10 E2 ^b	37,20±4,24x10 E2 ^b	239,05±14,70x10 E2 ^a
HAF	14,61 ±2,50 x10 E2 ^b	39,91±0,97 x10 E2 ^b	319,00±28,20x10 E2 ^a

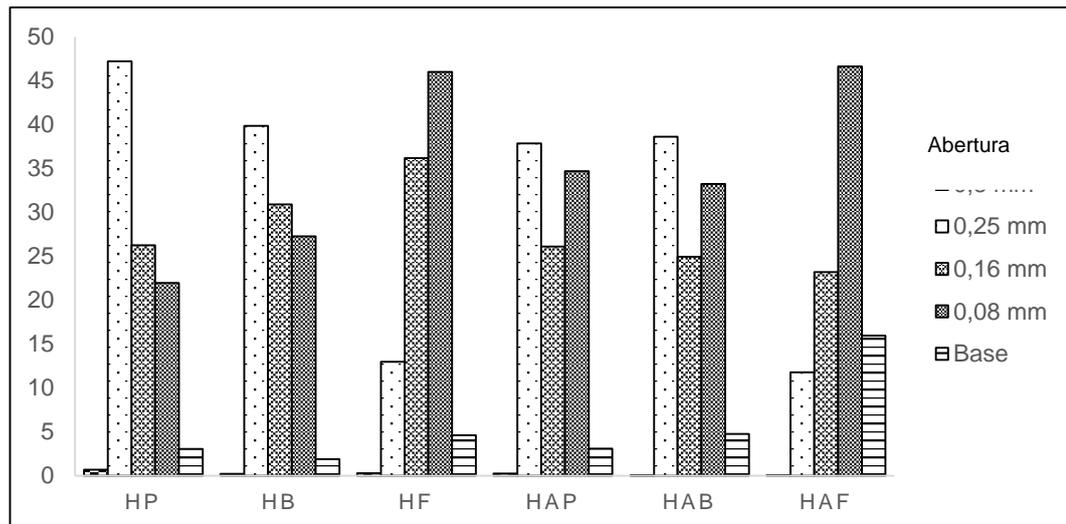
¹HP, HB y HF: miga rica en almidón obtenida por hidrólisis con papaína, bromelina y ficina, respectivamente. HAP, HAB y HAF: miga rica en almidón con hidrólisis alcalina y de papaína, bromelina y ficina, respectivamente.

² La viscosidad se encuentra expresada en Poises a 25 °C medida en un un Viscoamiloógrafo FungiLab con spines TR8 para las suspensiones de 10 y 15% y TR10 para la suspensión de 20% con una velocidad máxima de 5 rpm en un tiempo de 400 segundos. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

La distribución del tamaño de grano está descrita en la Figura 2, que presenta el porcentaje de retención de las muestras en cada tamiz. Se observa que el mayor porcentaje de retención para las muestras HP y HB fue en la malla con abertura de 0,25 mm. Por otro lado, las

muestras HAP y HAB se retuvieron en mallas con aberturas de 0,25 y 0,16 mm, respectivamente. Se puede observar que las muestra HF Y BF, fueron retenidas en la malla con abertura de 0,08 mm, con porcentajes de retención de 45,99 y 46,63%, respectivamente. Por ende, se considera a estas muestras como las más finas con un tamaño de partícula aproximado a 80 μm .

Figura 2: Porcentaje de retención de las muestras ricas en almidón vs la abertura de malla



HP, HB y HF: miga rica en almidón obtenida por hidrólisis con papaína, bromelina y ficina, respectivamente. **HAP, HAB y HAF:** miga rica en almidón con hidrólisis alcalina y de papaína, bromelina y ficina, respectivamente.

CAPÍTULO III DISCUSIONES

Los valores de la composición química proximal de las muestras de miga de pan analizadas en este estudio, son en promedio 18% más altos que los valores reportados por Cando y León (2012), quienes mencionan que los panes comercializados en la ciudad de Cuenca contienen un promedio del 5,8; 8,7 y 60,2 % de grasa, proteína y carbohidratos, respectivamente.

Para la extracción de grasa se utilizó la proporción de miga-n-hexano 1:1,8, la cual es mayor a lo reportado por Saldivar (2013) para la extracción de aceite de soya (1:1 a 1:1,5). Por otro lado, Pilco (2015) reportó un porcentaje de extracción de aceite de unguahua de 90,54% utilizando una proporción de fruto-n-hexano de 1:8 a 50 °C. De igual manera, Sirisompong et al (2011) reportan un porcentaje de extracción de grasa en semillas de rambután de 90%, a 65 °C. Estos autores obtuvieron porcentajes de extracción de grasa superiores al descrito en este estudio (73%), debido principalmente a que utilizaron temperaturas de extracción altas y un método de extracción por reflujo (Soxhlet). Los resultados obtenidos en este estudio no son comparados con estudios similares ya que no se encontró bibliografía relacionada.

En las condiciones para la hidrólisis alcalina se obtuvo un porcentaje de extracción de proteínas de 30,92%, el cual es inferior a lo reportado por Seung et al (1999), quienes mencionan que el NaOH 0,2% extrae alrededor del 86% de proteína de arroz con las mismas condiciones utilizadas en este estudio. De igual manera, Puchongkavarin et al (2005) obtuvo un porcentaje de extracción de proteínas de 93% con NaOH 0,1M en harina de arroz, realizando 6 hidrólisis consecutivas. Esta diferencia en los porcentajes de extracción se debe a que la proteína de arroz contiene 82,5% de glutelinas las cuales son solubles en soluciones alcalinas.

Por otro lado, se observó que la primera y segunda hidrólisis con NaOH 0,2% extrajeron significativamente la mayor cantidad de proteína presente en la muestra MBD, esto se atribuye a la solubilidad que presentan las albuminas, globulinas y glutelinas en soluciones de NaOH (Cardoso et al 2007). Mientras tanto, la tercera y cuarta hidrólisis con NaOH 0,2% presentaron porcentajes de reducción de proteínas bajos, esto se debe a que las proteínas solubles en NaOH se extraen rápidamente en la primera y segunda hidrólisis. Además, se observó que el primer lavado con agua destilada extrajo un porcentaje de proteínas cercano al obtenido en la primera hidrólisis con NaOH 0,2%, debido a la extracción de proteínas hidrofílicas (Cuniberti y Mir, 2007) y péptidos hidrofílicos remanentes de la hidrólisis alcalina. Por último, se apreció que el lavado con etanol extrajo poca cantidad de proteínas debido a que las prolaminas, solubles en etanol, se hidrolizan en prolina y aminoácidos azufrados

durante la hidrólisis alcalina, moléculas que a su vez son solubles en agua y etanol, respectivamente (Landers y Hamaker 1994 y Gallegos et al., 2004).

Al finalizar los procesos de desgrasado e hidrólisis de proteínas, se puede observar como la composición proximal de la miga blanca varió luego de cada proceso. Después del desgrasado la cantidad de proteína se redujo considerablemente en un 21%, esto debido a la solubilidad que presentan algunas proteínas con terminaciones apolares en solventes orgánicos (Chin et al., 1994). Por otra parte, se aprecia que el contenido de proteína luego de la hidrólisis alcalina, muestra MBA se redujo un 38% que es bajo comparado con lo expuesto por Seung et al (1999) (Tabla 3).

Mientras tanto, el contenido de grasa también se redujo significativamente en un 51%, esto se debe a la hidrólisis de los triglicéridos en un medio alcalino formando sales de ácidos grasos y alcoholes monohidroxilados (Gómez, 2011).

También se observa que la cantidad de fibra se reduce considerablemente, esto se atribuye a la solubilidad que presentan sus componentes en álcali (lignina) y en agua (fibra soluble). El contenido de cenizas disminuye proporcionalmente al contenido de fibra ya que se encuentran directamente relacionados. (Álvarez 2006, Manrique y Gonzáles 2007).

Se observó que luego de la acción de la papaína, bromelina y ficina, hubo un aumento del porcentaje de grasa en las muestras sin hidrólisis alcalina. Este suceso se atribuye a que las enzimas (endoproteasas) utilizadas liberan péptidos internos hidrofóbicos, durante la hidrólisis (García 2015). Estos péptidos se solubilizan conjuntamente con los lípidos, en el éter utilizado para la cuantificación de grasa. Por otra parte, la papaína presentó un PEP de 9,27 y 13,23% sobre las muestras MBD y MBA, respectivamente; estos PEP son superiores al 4,8% reportado por Caiza (2011) para la hidrólisis de proteína de chocho. Desde otro punto de vista, se aprecia que el PEP de 37,61% obtenido por la hidrólisis con bromelina sobre la muestra MBD, es similar al 36,5 %, reportado por Apinunjarupong et al (2009) para la hidrólisis de proteína en salvado de arroz. Mientras tanto, el PEP de 15,94 % obtenido por la hidrólisis con bromelina sobre la muestra MBA, es inferior.

Se aprecia también, que los PEP de 54,22 y 44,36 % obtenidos luego de la hidrólisis con ficina sobre las muestras MBD y MBA, son superiores al 30% mencionado por Ramezani et al (2003) para la hidrólisis de proteína en carne de vacuno. Analizando los PEP obtenidos por cada enzima, se puede concluir que la ficina reduce la mayor cantidad de proteína presente en la miga. Esto debido, a la afinidad que presenta la ficina con las proteínas que tienen varios grupos disulfuro (gluten), ya que la cisteína presente en el sitio activo de esta enzima, reduce los enlaces disulfuros para formar grupos tiol, por lo que puede aumentar la degradación proteica. Por lo tanto, se considera que la hidrólisis alcalina más la acción proteolítica de la ficina, es el proceso más efectivo para la extracción de proteínas presentes en la matriz panaria.

El contenido de almidón total (AT) en la muestra control (MB) fue de 42,74%, similar a los valores obtenidos por Sellan (2015) de 40- 68% para diferentes tipos de panes fresco. Mientras que los valores de AT en las muestras tratadas tanto con hidrólisis alcalina como la enzimática no variaron significativamente. Concordando con lo reportado previamente por Cardoso et al (2007) quien observó que la hidrólisis con NaOH 0,2% no afecta significativamente al contenido de almidón en el almidón de arroz.

Por otro lado, el porcentaje de almidón resistente (AR) aumentó directamente con el contenido de AT, debido a la concentración de las muestras por la pérdida de macromoléculas (proteínas y grasas). Es conocido que el AR se forma mayoritariamente a altas temperatura (horneado) y se mantiene constante durante el envejecimiento del pan (Primo-Martín et al 2007 y Johansson et al 1984), lo que respalda los datos obtenidos en esta investigación.

El contenido de almidón dañado (AD) en las muestras estudiadas (Tabla 5) representa aproximadamente un 70% del almidón total. Además, este contenido es superior al porcentaje de AD en la harina de trigo y de arroz, con porcentajes de AD de 8-10 y 10,6 %, respectivamente (Barrera et al 2007 y Mancebo et al 2015).

Con respecto a los contenidos de amilosa y amilopectina aumentaron progresivamente luego de cada proceso, esto debido a la hidrólisis alcalina y enzimática (Cardoso et al 2007). Los valores de amilosa y amilopectina en las diferentes muestras son similares a lo reportado por Badui (2006) quien menciona que el almidón de trigo tiene un 25% de amilosa y un 75 % de amilopectina.

Finalmente, la sacarosa y glucosa presentes en las muestras control MB y MBD se eliminaron durante el lavado con H₂O en la hidrólisis básica y enzimática.

El índice de absorción de agua (IAA) no varía significativamente entre las muestras ricas en almidón. De estas, la muestra HAF con el mayor contenido de AT presentó un IAA (5,18) superior a los índices reportados para el almidón de malanga (1,62) (Torres et al 2013) y de sagú (1,88) (Granados et al 2004). A su vez, este contenido fue similar a los reportados para el almidón de papa (4,63) y de yuca (5,83). Estas diferencias, se deben principalmente al tamaño y forma del gránulo, así como también a la fuente biológica del almidón (Lindeboom et al 2004). Por otro lado, las muestras HAF, HAB y HB presentaron índices de solubilidad en agua (ISA) superiores a los reportados por Torres et al (2013), quien menciona ISA de 2,97, 2,79 y 3,70% para el almidón de papa, yuca y malanga, respectivamente. Además, la FAO (2007) indica que el ISA para el almidón de yuca varía entre 0,27 y 12,32. Con base a lo mencionado, podemos determinar que los concentrados de almidón obtenidos en este trabajo presentan solubilidades mayores que a los almidones comparados, ya que, su alto contenido de almidón dañado facilita el ingreso de las moléculas de agua a la matriz de almidón alcanzando una mayor solubilidad (Hwang y Kokini 1992).

El poder de hinchamiento (PH) no presentó una variación significativa entre las muestras, estando éstas entre 5,48 y 5,75, los cuales son comparables al almidón de yuca con un rango de 0,79 -15,45 (FAO, 2007). Este valor de PH se debe a la alta cantidad de amilopectina que presentan las muestras (Granados et al 2004). Por otra parte, las muestras HAB y HAF presentaron porcentajes de transmitancia de 50,54 y 33,39 %, respectivamente, superiores a la transmitancia de 29,96 % reportada para el almidón de maíz (Hernández et al 2008). Esta diferencia de transmitancia se debe a que los almidones con un bajo contenido de amilosa se dispersan fácilmente en una suspensión almidón-agua, dejando pasar la luz con facilidad e incrementando su claridad y porcentaje de transmitancia (Novelo y Betancur, 2005).

Las muestras con una concentración de miga del 10% presentaron valores similares a los de almidón de maíz (2584cP) y malanga (1170 cP) (Contreras et al., 2014 y Torres ,2013). De estas, la muestra HAF con mayor contenido de AT formó un gel con una viscosidad de 1461 cP, la cual se encuentra dentro del rango de 840 a 1500cP mencionado por la FAO (2007) para el almidón de yuca a 25°C. Cabe mencionar, que estos valores de referencia son medidos a una concentración de almidón del 5%. Pacheco y Techeira (2009) asocian valores de viscosidad altos con una mayor cantidad de almidón retrogradado en almidón de ñame nativo y modificado.

Finalmente, la muestra HAF presenta los valores más cercanos a los almidones comerciales, con el menor diámetro de partícula (80 μm), alto porcentaje de almidón (74,97%) y los mejores valores de ISA (41,19%), IAA (5,18) y PH (5,48) comparado con el resto de muestras estudiadas.

CONCLUSIÓN

Es una realidad que los desperdicios de alimentos aumentan día a día a nivel mundial debido a un creciente y desordenado consumo de la población. De estos, el desperdicio generado por la industria panificadora está dentro de los más altos. El objetivo de esta investigación fue recuperar el almidón existente en las mermas y devoluciones por expirado de pan. Para ello se utilizó la miga sin corteza, debido a que en ésta se encuentra la mayor cantidad de carbohidratos y el menor contenido de grasa. Además, que en la cáscara se presenta compuestos cancerígenos como las melanoidinas, pirazinas, nitrosaminas y acrilamidas.

Los concentrados de almidón resultantes en la presente investigación se caracterizaron por presentar un mayor contenido de almidón dañado. El concentrado obtenido usando hidrólisis alcalina y enzima ficina presentó las mejores propiedades funcionales, con índice de solubilidad de agua, absorción de agua y poder de hinchamiento similar al almidón nativo de yuca. Además, menor tamaño de partícula y mayor contenido de almidón; propiedades que favorecen el uso de este concentrado como aditivo en la elaboración de alimentos en polvo, en alimentos que requieren absorber agua o ser usados en mezclas con harina de trigo para disminuir la fuerza del gluten (contenido de proteínas), como materia prima para la elaboración de jarabes y otros productos fermentados. Finalmente se requiere en lo posterior determinar el costo beneficio de este almidón en los diversos usos recomendados.

BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. . *Official Methods of the Association for Analytical Chemists. E.U.A: (19a. Ed.)* . Washington. DC - USA., 2012.
- Álvarez, E & Sánchez, P. «La fibra dietética.» *Scielo* (2006): 61-72.
- Apinunjarupong, S., Lapnirun, S., & Theerakulkait, C . «Preparation and some functional properties of rice bran protein concentrate at different degree of hydrolysis using bromelain and alkaline extraction.» *Preparative Biochemistry and Biotechnology* ((2009)): 183-193.
- Badui, S. *Química de Alimentos* . México: Pearson , 2006.
- Barrera, G., Pérez, G., Ribotta, P. & León, A. «Influence of damaged starch on cookie and bread-making quality.» *European Food Research and Technology* (2007): 1-7.
- Caiza, J. «Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho(*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral.» 2011. *EPN*. <<http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4387/1/CD-3992.pdf>>.
- Cando, A. & León, P. «Determinación de macronutrientes en los panes más consumidos de Cuenca.» 2012. *Universidad de Cuenca*. <<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2477/1/tq1119.pdf>>.
- Cardoso, M., Putaux, J., Samios, D., & da Silveira, N. «Influence of alkali concentration on the deproteinization and/or gelatinization of rice starch.» *Carbohydrate Polymers* (2007): 160–165.
- Chavez, M., Díaz, J., Pérez, U., & Delfin, J. «Temas de Enzimología, Tomo I.» *Universidad de la Habana, Facultad de Biología, Cuba* (1990): 7-67.
- Contreras, B., Morales, E., Reyes, M. & Gaytán, M. «Propiedades funcionales de harinas de maíz nixtamalizado obtenidas por extrusión a baja temperatura .» *CyTA - Journal of Food* (2014): 263-270.
- Cuniberti, M. & Mir, L. «Relación gluten/proteína en trigo.» 2010. *INTA* . <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-03relacion_gh-prot_en_trigo-cuniberti_-mir.pdf>.
- El Comercio. *Desperdicio de comida en grandes cantidades alarma al mundo*. 2014. <<http://www.elcomercio.com/tendencias/desperdicio-de-comida-grandes-cantidades.html>>.
- FAO. « Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca, .» *FAO* (2007): 61-75.
- Gallegos, S., Pacheco, J., Betancur, D. & Guerrero, L. . «Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus* L.» *Scielo* (2004): 81-88.
- García, G. . *Cuaderno de actividades de la asignatura de Ingeniería de Proteínas (2015-2016) del Grado de Bioquímica en la Universidad de Granada centrado en el estudio de la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1)*. 2015. <<http://ingenieria-proteinas.blogspot.com/2016/07/hidrofobicidad-y-antipatia-de.html>>.
- Gómez, E. «Recubrimientos para frutas y hortalizas. .» 2011. <http://www.deccopostharvest.com/pdf/newsletter/11_04_2011/recubrimientos_frutas_hortalizas.pdf>.

- Granados, C., Guzman, L., Acevedo, D., Diaz, M., & Herrera, A. «Propiedades funcionales del almidón de Sagu (*Maranta arundinacea*).» *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial* (2014): 90–96.
- Grasso, F. «Diseño del proceso: Pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna.» 20013. *Universidad Nacional de la Plata*. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/26889/Documento_completo___pdf?sequence=1>.
- Gustavsson, J., Cederberg, C. Sonesson, U., et al. «Pérdida y desperdicios de alimentos en el mundo.» 2012. *FAO*. <<http://www.fao.org/docrep/016/i2697s/i2697s.pdf>>.
- Hernández, M., Torruco, J., Chel, L. & Betancur, D. «Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México.» *Food Science and Technology* (2008): 718-726.
- Hwang, J. & Kokini, J. «Contribution of the side branches to rheological properties of pectins.» *Carbohydrate Polymers* (1992): 41-50.
- INEC. *Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares Urbanos y Rurales*. 2012. <<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-nacional-de-ingresos-y-gastos-de-los-hogares-urbanos-y-rurales/>>.
- ISI. «Determination of viscosity of starch by brookfield. ISI 17-1e. In: Laboratory methods.» 2002. *Science Park, Aarhus, Dinamarca, International Starch Institute (ISI)*. web.
- Johnston, D., & Singh, V. « Use of proteases to reduce steep time and SO₂ requirements in a corn wet-milling process.» *Cereal Chemistry* (2001): 405–411.
- Johansson, C, Siljeström, M. & Georg Asp, N. «Dietary fibre in bread and corresponding flours —Formation of resistant starch during baking.» *European Food Research & technology* (1984): 24-28.
- Kosmala, I., Antoniewicz, A., Boever, J. & Hvelplund, T. «Use of enzymatic solubility with ficin (EC 3.4.22.3) to predict in situ feed protein degradability.» *Animal feed science and technology* (1996): 245–254.
- Landers, P. & Hamaker, B. «Antigenic Properties of Albumin, Globulin, and Protein Concentrate Fraction from Rice Bran.» *Cereal Chemistry* (1995): 409-411.
- Lim, S., Lee, J., Shin, D., & Lim, H. «Comparison of Protein Extraction Solutions for Rice Starch Isolation and Effects of Residual Protein Content on Starch Pasting Properties.» *Starch/Starke* (1999): 120–125.
- Lin, C., Pfaltzgraff, L., Herrero, L., et al. «Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective.» *Energy & Environmental Science* (2013): 426.
- Lindeboom, N., Chang, P. & Tyler R. «Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review.» *Starch - Stärke* (2004): 87-156.
- Mancebo, M., Merino, C., Martínez, M., & Gómez, M. «Mixture design of rice flour, maize starch and wheat starch for optimization of gluten free bread quality.» *Journal of Food Science and Technology* (2015): 6323–6333.
- Manriquez, N. & Conzáles, O. «Efectos del tratamiento químico en las propiedades físicas y mecánicas de las fibras naturales como sustitutos de fibras de vidrio.» 2007. *ESPOL*. <<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17049/1/Efectos%20del%20tratamiento%20qu%C3%ADmico%20en%20las%20propiedades%20f%C3%ADsicas>>

as%20y%20mec%C3%A1nicas%20de%20las%20fibras%20naturales%20como%20sustitutas%20de%20la%20fibra%20de%20vidrio%20en%20>.

- Novelo, C. & Betancur, A. «Chemical and functional properties of Phaseolus lunatus and Manihot esculenta starch blends.» *Starch/Stärke* (2005.): 431-441. web.
- Pacheco, E. & Techeira, N. «Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (dioscorea alata).» *Scielo* (2009): 280-285.
- Parfitt, J., Barthel, M. & Macnaughton, S. . «Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050.» 2010. *The Royal Society*. <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/365/1554/3065.short#ref-62>>.
- Pilco, S. «Optimización del proceso de extracción de aceite de unguahua (Oenocarpus bataua) en función del rendimiento.» 2015. *Universidad Técnica de Ambato* . <<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/9366/1/AL%20558.pdf>>.
- Pincirolí, M. «PROTEÍNAS DE ARROZ: Propiedades Estructurales y Funcionales .» 2010. *Universidad Nacional de la Plata* . <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/1828/Documento_completo_.pdf?sequence=3>.
- Primo-Martínez, C., van Nieuwenhuijzen, N., Hamerac, R. & van Vliet, T. . «Crystallinity changes in wheat starch during the bread-making process: Starch crystallinity in the bread crust.» *Cereal Science* (2007): 219-226.
- Puchongkavarin, H. , Varavinit, S. & Bergthaller, W. «Comparative study of pilot scale rice starch production by an alkaline and an enzymatic process.» *Starch/Stärke* (2005): 134-144.
- Ramezani, R., Aminlari, M., & Fallahi, H . «Effect of Chemically Modified Soy Proteins and Ficin-tenderized Meat on the Quality Attributes of Sausage.» *Food Chemistry and Toxicology* (2003): 85–88.
- Saldivar, S. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. México : AGT EDITOR,S.A., 2013.
- Salvador, G., Bultó, L. *Larousse de la Dietética y la Nutrición*. Spes Editorial, 2001.
- Shamekh, S. «Effects of lipids, heating and enzymatic treatment on starches.» *VTT Publications* (2002): 3–43.
- Sirisompong, W., Jirapakkul, W. & Klinkesorn, U. «Response surface optimization and characteristics of rambutan (Nephelium lappaceum L.) kernel fat by hexane extraction.» *LWT - Food Science and Technology* (2011): 1946-1951.
- Torres, A., Durán, M., & Montero, P. «Evaluación de las propiedades funcionales del almidón obtenido a partir de malanga (Colocasia esculenta).» *Ciencias E Ingeniería Al Día* (2013): 29–38.
- Villacres, E. «Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del chocho (lupinus mutabilis sweet).» 2001. *SENESCYT*. <<http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/365>>.
- Wahyuni, S., Susanti, R., & Iswari, R. «Isolation and characterization of ficin enzyme from Ficus septica Burm F stem latex.» *Indonesian Journal of Biotechnology* (2015): 161–166.

ANEXOS

Anexo 1: Curvas de cinética enzimática de papaína, ficina y bromelina con miga de pan como sustrato.

Figura 3: Tiempo de reacción de ficina, bromelina y papaína.

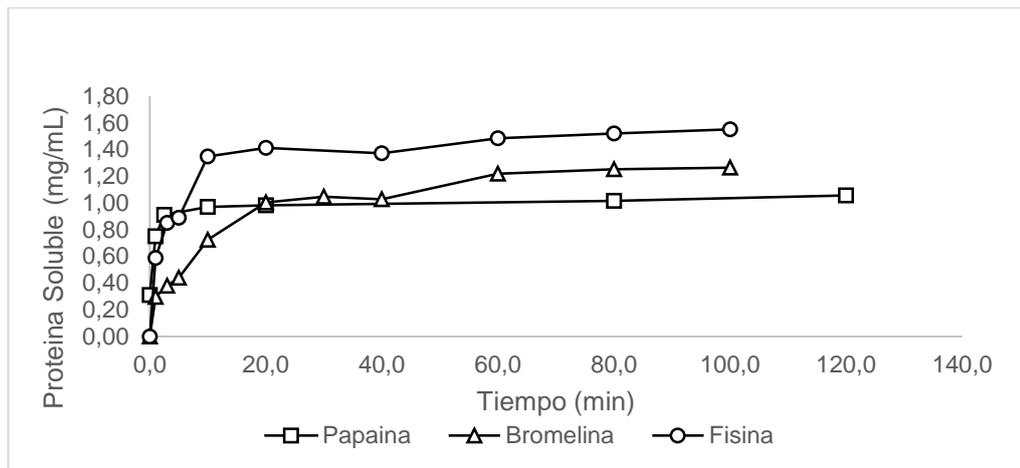


Figura 4: Curvas de proteína soluble en función del tiempo a diferentes concentraciones de: a) papaína, (pH 7,0, 50° C), b) ficina (pH 7,0, 39°C) y c) bromelina (pH 4,0, 40°C)

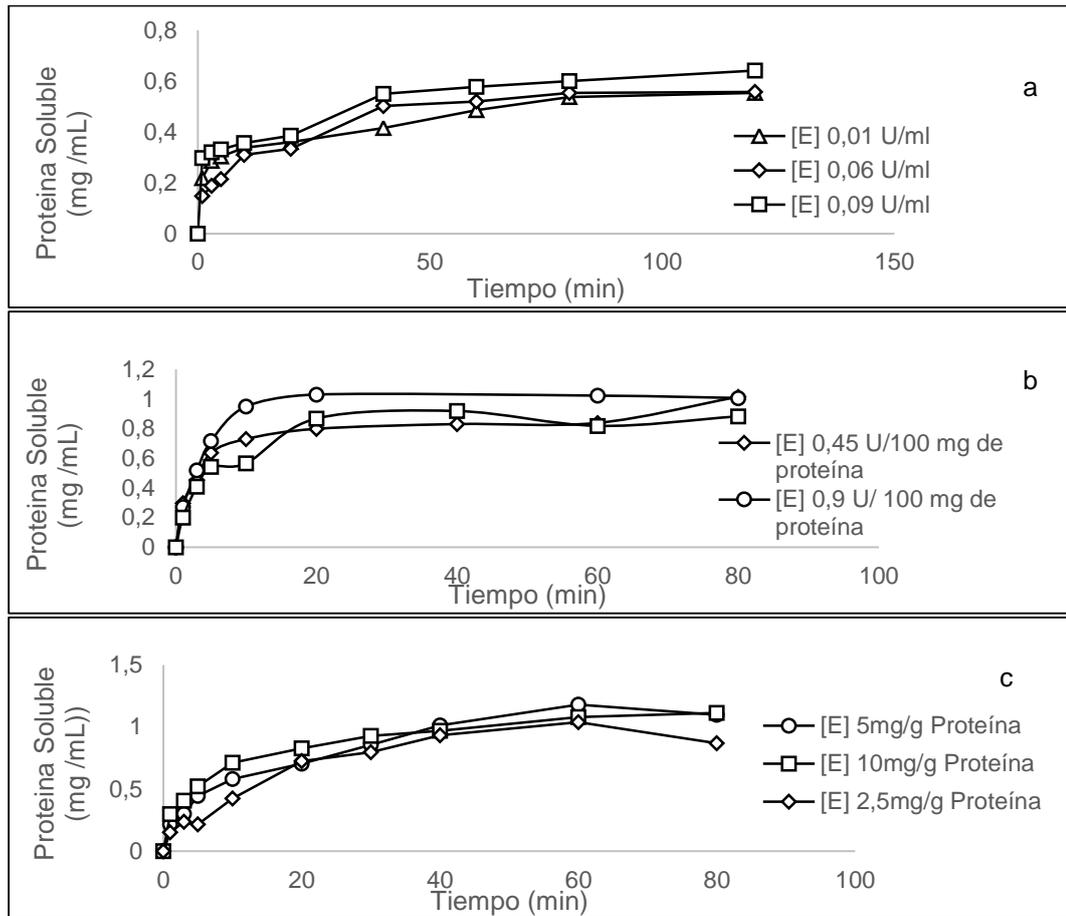


Figura 5: Curva de Michaelis-Menten para la hidrólisis con papaína, (pH 7,0, 50° C), ficina (pH 7,0, 39°C) y bromelina (pH 4,0, 40°C)

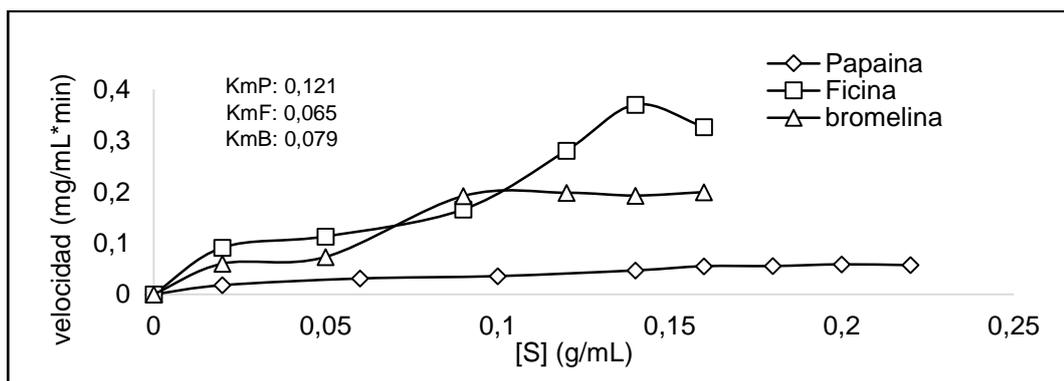


Figura 6: Regresión de Lineweaver-Burk para la hidrólisis con papaína, (pH 7,0, 50° C), ficina (pH 7,0, 39°C) y bromelina (pH 4,0, 40°C)

