

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**ACTIVIDADES AMIOLÍTICA Y PROTEOLÍTICA DEL EXTRACTO
CRUDO ENZIMÁTICO DE BAYAS DE *SOLANUM
ELAEAGNIFOLIUM* VAR. CAVANILLES Y SU USO POTENCIAL EN
TORTILLA A BASE DE HARINA DE TRIGO**

POR:

Lic. ARENIS JOSEFINA PIÑÓN MUÑIZ

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

AGOSTO DE 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 16 de noviembre del 2021.

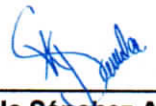
Oficio: 98/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **"Actividad amilolítica y proteolítica del extracto crudo enzimático de bayas de *Solanum elaeagnifolium* var Cavanilles y su uso potencial en tortilla a base de harina de trigo"**, presentada por la Lic. Arenis Josefina Piñón Muñiz, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
"Por la ciencia para bien del hombre"

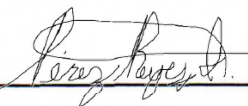

Dra. Daniela Sánchez Aldana Villarruel
Asesora de tesis


Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón
Asesora de tesis


Dr. Néstor Gutiérrez Méndez
Asesor de tesis


Dr. Tomás Galicia García
Asesor de tesis


Dra. Martha Yarely Leal Ramos
Directora de tesis


Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres y mi familia**, por escucharme y ayudar en cada obstáculo que se presentó en el camino, por enseñarme a entregarme y esforzarme más. Este proyecto no sería ni la mitad si no fuera por ustedes. Ojalá me alcance la vida para darles todo lo que se merece mi hermosa familia.

A **mi hermosa madre**, por su entrega cada día para que pudiéramos aprovechar las mejores oportunidades, por consolarme cuando lloré la quinta vez que no salían los experimentos, por emocionarse conmigo cuando tenía el corazón lleno de felicidad porque había terminado un proyecto más en el sexto intento, y por traerme fruta picada a mi recámara cuando estaba llena de trabajo y no podía dejar mi computadora. Te amo, mi preciosa mami.

A **Ever**, por animar mis días con su sonrisa y cariño para todos nosotros, llevarme de aquí a allá, y enorgullecerse de cada meta que logramos, sus hijos postizos.

A **mi hermano Edgar** por su disposición para seguirme en mis inventos en el laboratorio y ayudarme a montar una técnica sin la que no hubiera podido terminar este trabajo. Gracias por todo tu amor para conmigo, tu familia, tus hijos y tu esposa, y por mostrarme cada día que el amor de Dios se manifiesta en mi vida por tu presencia en ella.

A **mi hermana Marina**, por animarme (y casi apalearme) para hacer algo diferente una vez más, por cuidarme, amarme y ser mi inspiración para tomar el camino de la ciencia y la aventura, mi mejor amiga de toda la vida, y para toda la vida.

A **mi papá**, que me enseñó a reírme de mis caídas, te amo y te extraño.

A **mis amigos de vida**, por darle la alegría incluso a los momentos amargos del día. Jamás podré pagarles todas las risas y buenos momentos que me han dado, y todas las lágrimas que me han dejado derramar en sus hombros.

Agradezco a **mis compañeros de maestría y doctorado**, por su ayuda con los equipos y herramientas de investigación, los regaños para que usara el equipo de seguridad que terminó por salvar a mis ojos del Trompillo, las risas compartidas cada día y sus enseñanzas en el salón y el laboratorio.

A **Saúl y Karla**, por adoptarme y asegurarse de que no me cortara un brazo o se me derritieran los dedos en el laboratorio, mis cómplices en cada clase y práctica, tanto que no se veía a uno sin los otros dos al lado.

A **Mario**. Sufriste y te emocionaste tanto como yo, creíste en mí cuando yo ya no podía ni levantar un brazo, y te aseguraste de que comiera, durmiera, fuera al gimnasio y me sintiera amada en cada momento. Eres mi inspiración cada día. Ojalá pueda pagarte, mi amor, todo lo maravilloso que siempre eres, y la luz que tus ojos y tu sonrisa han traído a mi vida.

A mi directora de tesis, la **Dra. Martha Yarely Leal**, por ayudarme a creer que podía con este proyecto y más, y por no darse por vencida la cuarta, quinta o sexta vez que le hice una pregunta y responderlas todas con su paciencia y sonrisa habitual. A **mi comité de asesores, los Doctores Néstor Gutiérrez, Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón, Daniela Sánchez Aldana y Tomás Galicia García**, por la oportunidad de trabajar a su lado y utilizar sus recursos y experiencia como investigadores para formar a una estudiante más, escribir su nombre al lado del mío en esta tesis es un honor.

Gracias a la **Facultad de Ciencias Químicas de la UACH**, por darme la oportunidad de estudiar, intentar, fallar y aprender. No podría explicar nunca todo lo que significó para mí haber sido aceptada en este programa de posgrado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por los recursos para el logro de este proyecto durante dos años, por el financiamiento de muchas investigaciones más, por el apoyo a los sueños de tantos jóvenes que, como yo, anhelan hacer ciencia y aprender cómo funciona nuestro mundo, y más importante, cómo podemos hacerlo un lugar mejor.

DEDICATORIAS

*A mi **Dios**. Nada puedo si no es por tu misericordia y amor.*

*A **mi preciosa mami**. Eres mi ángel en la Tierra.*

*A **Mario**. Luz de mi vida.*

A cada una de las personas que me dijeron que podía lograr esto como si fuera la cosa más obvia, estén mencionadas personalmente o no, su certeza y confianza hizo este proyecto posible, incluso a pesar de que yo pensé más de varias (o muchas) veces, que no podía. He sido increíblemente afortunada de contar con tanto apoyo y cariño durante esta etapa.

A todos ustedes.



ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE APÉNDICES	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Trigo	17
2.2 Harina de trigo	18
2.3 Tortillas de harina	19
2.3.1 Análisis de las tortillas de harina	20
2.3.2 Peso, diámetro, ancho y volumen específico	20
2.3.3 Actividad de agua y humedad	20
2.3.4 Color	21
2.3.6 Características de las masas	22
2.4 Almidón de trigo	22
2.5 Gluten	23
2.6 Mejoradores en panificación	24
2.6.1 Enzimas en la industria de panadería	24
2.6.1.1 Amilasas	25
2.6.1.1.1 Endo-amilasas	25
2.6.1.1.2 Exo-amilasas	26
2.6.1.1.3 Amilasas en la industria de panadería	26
2.6.1.2 Proteasas	26
2.6.1.2.3 Proteasas de origen animal	28
2.6.1.2.4 Proteasas de microorganismos	28
2.6.1.2.5 Proteasas de origen vegetal	28
2.6.1.2.5.1 Trompillo (<i>Solanum elaeagnifolium</i> var. <i>cavanilles</i>) como agente amilolítico y proteolítico	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVO GENERAL	32

5.1 Objetivos específicos	32
5.1.1 Objetivo específico 1.....	32
5.1.2 Objetivo específico 2.....	32
5.1.3 Objetivo específico 3.....	32
5.1.4 Objetivo específico 4.....	32
5.1.5 Objetivo específico 5.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Materiales.....	33
6.1.1 Trompillo (<i>Solanum elaeagnifolium</i> var. Cavanilles).....	33
6.1.2 Gluten de trigo	33
6.1.3 Almidón.....	33
6.1.4 Tortillas de harina de trigo.....	33
6.2 Métodos.....	33
6.2.1 Análisis proximal de las bayas de Trompillo y Harina de trigo	33
6.2.2 Preparación de los extractos crudos concentrados de proteínas de Trompillo.....	36
6.2.2.1 Extracción de proteínas del Trompillo.	36
6.2.2.2 Concentración de extractos crudos.	36
6.2.2.3 Cuantificación de proteína.	37
6.2.3 Determinación de la actividad proteolítica del ECC utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	37
6.2.4 Determinación de actividad endoamilolítica <i>in vitro</i>.	38
6.2.5 Análisis de la masa y tortillas	40
6.2.5.1 Análisis de perfil de textura de la masa (TPA)	41
6.2.5.2 Análisis de extensibilidad de la masa	43
6.2.5.3 Análisis de las características físicas de las tortillas	45
6.2.5.4 Análisis de humedad y aw.....	45
6.2.5.5 Análisis de rolabilidad de las tortillas	45
6.2.5.6 Análisis de extensibilidad de las tortillas.....	46
6.2.6 Diseño de experimentos.....	48
6.2.6.1 Diseño central compuesto.....	48
6.2.6.2 Diseño factorial completo.....	52
6.2.7 Análisis estadístico.....	53
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	54



7.1 Análisis proximal de las bayas de <i>S. elaeagnifolium</i>	54
7.2 Análisis proximal de harina de trigo refinada.....	55
7.3 Rendimientos en la obtención de EC y ECC	56
7.4 Cuantificación de proteína.....	56
7.5 Determinación de la actividad proteolítica del ECC utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	57
7.4.1 Actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre caseína.....	61
7.5 Determinación de actividad endoamilolítica <i>in vitro</i>	63
7.6 Formulación de la masa y tortillas.....	67
7.7 Análisis de la masa y tortillas	67
7.7.1 Análisis de perfil de textura de la masa (TPA)	67
7.7.2 Análisis de extensibilidad de la masa.....	76
7.7.3 Análisis de las características físicas de las tortillas.....	78
7.7.4 Análisis de humedad y Aw	81
7.7.5 Análisis de colorimetría.....	85
7.7.6 Análisis de rolabilidad de las tortillas.....	91
7.7.7 Análisis de extensibilidad de las tortillas	96
8. CONCLUSIONES	102
9. REFERENCIAS.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulación de la masa para preparar tortillas de harina, Blanco (B), -1 con 80 ppm ECC, punto central (C) con 190 ppm de ECC y +1 con 300ppm de ECC.....	40
Tabla 2. Configuración para análisis TPA.....	43
Tabla 3. Configuración para análisis de extensibilidad	44
Tabla 4. Condiciones seleccionadas para el análisis de rolabilidad de las tortillas	46
Tabla 5. Condiciones seleccionadas para el análisis de extensibilidad de las tortillas	47
Tabla 6. Valores codificados y decodificados del diseño central compuesto utilizado para determinación de la actividad endoamilolítica.....	48
Tabla 7. Valores codificados y decodificados del diseño central compuesto utilizado para determinación de la actividad proteolítica	50
Tabla 8. Valores codificados y decodificados del diseño factorial completo utilizado para la formulación de las masas para las tortillas.....	52
Tabla 9. Análisis proximal de bayas de <i>S. elaeagnifolium</i> var. Cavanilles	55
Tabla 10. Análisis proximal Harina de trigo.....	55
Tabla 11. Resultados de la extracción y concentración del extracto crudo de las bayas de <i>S. elaeagnifolium</i>	56
Tabla 12. Análisis estadístico Actividad proteolítica <i>S. elaeagnifolium</i> sobre gluten de trigo	59
Tabla 13. Análisis estadístico de la actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre caseína.....	63
Tabla 14. Análisis estadístico de la actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre almidón de trigo.....	66
Tabla 15. Resultados actividad proteolítica y amilolítica por miligramo de proteína de ECC de <i>Solanum Elaeagnifolium</i>	67
Tabla 16. Resultados del análisis de perfil de textura (TPA). B1, 2 y 3 control sin adición de ECC; G1, 2 y 3 harina comercial sin adición de ECC	68
Tabla 17. Análisis de Varianza Dureza.....	69
Tabla 18. Análisis de varianza de Cohesividad.....	70
Tabla 19. Análisis de varianza de Adhesividad.....	72
Tabla 20. Análisis de varianza Esponjosidad.....	74
Tabla 21. Análisis de varianza Resistencia a la extensibilidad	76
Tabla 22. Análisis de varianza Extensibilidad máxima.....	77
Tabla 23. Resultados de la evaluación de Tortillas.....	79
Tabla 24. Resultados de análisis de Humedad, Actividad de agua y Análisis de colorimetría (columnas L, A y B)	82
Tabla 25. Análisis de Varianza sobre A_w	84
Tabla 26. Análisis de Varianza sobre L.....	87
Tabla 27. Análisis de Varianza sobre valores obtenidos sobre a.....	89
Tabla 28. Análisis de Varianza sobre valores obtenidos de b.....	91



Tabla 29. Resultados de análisis de Rolabilidad y Extensibilidad.....	92
Tabla 30. Análisis de Varianza Fuerza Máxima.....	93
Tabla 31. Análisis de varianza Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas	94
Tabla 32. Análisis de varianza módulo de deformación de la prueba de extensibilidad de las tortillas.....	96
Tabla 33. Análisis de varianza Fuerza máxima de la prueba de extensibilidad de las tortillas	97
Tabla 34. Análisis de varianza Trabajo de la prueba de extensibilidad de las tortillas.....	99
Tabla 35. Análisis de varianza distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de (a) amilosa y (b) amilopectina. (MacRitchie, 2010)	23
Figura 2 Enzimas, sitio de acción y productos de hidrólisis (Agah, 2018)	25
Figura 3 <i>Solanum elaeagnifolium</i> var. Cavanilles: A) flores, B) hojas, C) tallo, D) frutos verdes, E) frutos de color marrón oscuro, F) frutos maduros, G) semillas.(Gutiérrez-Méndez et al., 2012).....	29
Figura 4 Diagrama de metodología general del proyecto presente.	35
Figura 5. Método de preparación de las tortillas de harina de trigo	41
Figura 6. Ilustración del cilindro para análisis TPA	42
Figura 7. Análisis de extensibilidad de la masa	44
Figura 8. Extensibilidad de tortilla.....	48
Figura 9. Proteína en EC y ECC cuantificada por método Bradford	57
Figura 10. Actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre gluten de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-9) Vista 3D	58
Figura 11. Actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre gluten de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-9), gráfica de contornos	59
Figura 12. Interpretación del efecto de los factores (A) temperatura y (B) pH en el análisis de actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre gluten de trigo	60
Figura 13. Resultados del análisis de proteína por método Bradford en soluciones con gluten de trigo en un rango de pH, (A) previo a una homogenización parcial y (B) homogenizado parcialmente a 6500rpm por 30 segundos	61
Figura 14. Actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre caseína con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10) Vista 3D	62
Figura 15. Actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre caseína con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10), gráfica de contornos	62
Figura 16. Interpretación del efecto de los factores (A) temperatura y (B) pH en el análisis de actividad proteolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre caseína	63
Figura 17. Actividad endoamilolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre almidón de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10) Vista 3D	64
Figura 18. Actividad endoamilolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre almidón de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10), gráfica de contornos	65
Figura 19. Interacción de los factores (A) pH y (B) Temperatura en el análisis de actividad endoamilolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre almidón de trigo.....	66
Figura 20. Interpretación del efecto de los factores (A) pH y (B) Temperatura en el análisis de actividad endoamilolítica de <i>S. elaeagnifolium</i> sobre almidón de trigo	67
Figura 21. Gráfica de efectos principales para Dureza.....	69
Figura 22. Gráfica de interacción para Dureza	70
Figura 23. Gráfica de interacción para Cohesividad	71
Figura 24. Gráfica de efectos principales para Cohesividad	71
Figura 25. Gráfica de interacción para Adhesividad	72
Figura 26. Gráfica de efectos principales para Adhesividad	73
Figura 27. Gráfica de interacción para Esponjosidad	74
Figura 28. Gráfica de efectos principales para Esponjosidad.....	75

Figura 29. Gráfico de resultados de análisis de extensibilidad de la masa, resistencia a la extensibilidad (N). Masa reposada a 45°C con 300ppm ECC (1). Masa reposada a 30°C con 300ppm ECC (2). Masa reposada a 45°C con 80ppm ECC (3). Masa reposada a 37.5°C con 190ppm ECC (5). Masa reposada a 30°C con 80ppm ECC (8). Masa control reposada a 30°C sin ECC (B1). Masa control reposada a 37.5°C sin ECC (B2). Masa control reposada a 45°C sin ECC (B3). Masa de harina comercial reposada a 30°C sin ECC (G1). Masa de harina comercial reposada a 37.5°C sin ECC (G2). Masa de harina comercial reposada a 45°C sin ECC (G3)..... 76

Figura 30. Gráfico de resultados de análisis de extensibilidad de la masa, milímetros de extensibilidad. Masa reposada a 45°C con 300ppm ECC (1). Masa reposada a 30°C con 300ppm ECC (2). Masa reposada a 45°C con 80ppm ECC (3). Masa reposada a 37.5°C con 190ppm ECC (5). Masa reposada a 30°C con 80ppm ECC (8). Masa control reposada a 30°C sin ECC (B1). Masa control reposada a 37.5°C sin ECC (B2). Masa control reposada a 45°C sin ECC (B3). Masa de harina comercial reposada a 30°C sin ECC (G1). Masa de harina comercial reposada a 37.5°C sin ECC (G2). Masa de harina comercial reposada a 45°C sin ECC (G3)..... 78

Figura 31. Peso de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3) 79

Figura 32. Diámetro de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3) 80

Figura 33. Ancho de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3) 80

Figura 34. Volumen específico de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)..... 81

Figura 35. Resultados de análisis de porcentaje de humedad 82

Figura 36. Gráfica de efectos principales para Humedad..... 83

Figura 37. Gráfica de interacción para Humedad 83

Figura 38. Gráfica de efectos principales para AW. 84

Figura 39. Gráfica de interacción para AW..... 85

Figura 40. Gráfica de caja de L. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)..... 86

Figura 41 Gráfica de efectos principales para L 86

Figura 42 Gráfica de interacción para L 87

Figura 43 Gráfica de caja de a. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)..... 88

Figura 44 Gráfica de efectos principales para A..... 88

Figura 45 Gráfica de interacción para a 89

Figura 46 Gráfica de caja de b. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)..... 90

Figura 47 Gráfica de efectos principales para B..... 90

Figura 48 Gráfica de interacción para b 91

Figura 49. Resultados de Fuerza Máxima de la prueba de rolabilidad de las tortillas	93
Figura 50. Gráfica de efectos principales para Fuerza máxima de la prueba de rolabilidad de las tortillas	94
Figura 51. Gráfica de resultados de Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas. Tortillas Blanco (B), con 80ppm de ECC (80), con 190ppm de ECC (190), con 300ppm de ECC (300), formuladas con harina comercial (HC).....	95
Figura 52. Gráfica de efectos principales para Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas	96
Figura 53. Gráfica de efectos principales para Módulo de deformación de la prueba de extensibilidad de las tortillas.....	97
Figura 54. Gráfica de efectos principales para Fuerza máxima de la prueba de extensibilidad de las tortillas.....	98
Figura 55. Gráfica de efectos principales Trabajo de la prueba de extensibilidad de las tortillas	99
Figura 56. Gráfica de interacción para Distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas.....	100
Figura 57. Gráfica de efectos principales para Distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas.....	101
Figura 58. Curva de calibración con suero de albúmina bovina (BSA).....	110
Figura 59. Curva de calibración de Tirosina	110
Figura 60. Curva de calibración con almidón soluble para yodometría	111
Figura 61. Curva de perfil de textura típica para masa de harina de trigo (TPA).	111
Figura 62. Curva de extensibilidad de la masa.....	112
Figura 63. Curva de análisis de rolabilidad de tortillas de harina.....	112
Figura 64. Curva de análisis de extensibilidad de las tortillas.....	113



ÍNDICE DE APÉNDICES

10. APÉNDICES

10.1 Apéndice I: Curva de calibración para cuantificación de proteína con método Bradford.....	110
10.2 Apéndice II: Curva de calibración para determinación de actividad proteolítica por metodología modificada de McDonald et.al.	110
10.3 Apéndice III: Curva de calibración para la determinación de actividad amilolítica, metodología modificada de Machado de Castro y Días Ribeiro	111
10.4 Apéndice IV: Curva de perfil de textura típica para masa de harina de trigo (TPA).....	111
10.5 Apéndice V: Una curva típica para análisis de extensibilidad de la masa	112
10.6 Apéndice VI: Curva típica para análisis de rolabilidad de las tortillas	112
10.7 Apéndice VII: Curva típica para análisis de extensibilidad de las tortillas	113



LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
°C	grados centígrados
μL	microlitro
μm	micrómetro
μM	microMolar
AOAC	Association of analytical communities
AN/TN	Relación nitrógeno amino/nitrógeno total
Aw	Actividad de Agua
BSA	Suero de Albúmina Bovina
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa
Cm	centímetro
cm ³ /g	centímetro cúbico/gramo
Col.	Colaboradores
CONEVAL	Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social
CIELAB	modelo cromático que describe los colores que puede percibir el ojo humano.
DH	Grado de hidrólisis
EC	Extracto Crudo
ECC	Extracto Crudo Concentrado
EMIM	Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera
E.U.A.	Estados Unidos de América
g	gramo
G-1	Grupo 1
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
kDa	kiloDalton
Kg	Kilogramo
mg	miligramo
mg/mL	miligramo/mililitro
mg P	miligramo de proteína



Min	minuto/minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mm/s	milímetro/segundo
MW	Peso molecular
N	Newton
NaCl	Cloruro de Sodio
Nm	nanometro
NOM	Norma Oficial Mexicana
N/S	Newton/segundo
Núm.	Número
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	partes por millón
pps	pie por segundo
p/v	peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
S. elaeagnifolium	Solanum elaeagnifolium
SIAP – SAGARPA Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural	
S.	Solanum
Sp.	Especie
T. aestivum	Triticum aestivum
T. durum	Triticum durum
Temp.	Temperatura
TPA	Análisis de Perfil de Textura
Var.	Variedad

RESUMEN

En México, el trigo es parte de la cultura alimentaria. La calidad de los productos elaborados a partir de harina de trigo está determinada por una variedad de factores, como el origen de los ingredientes, la formulación así como la adición y dosificación de mejoradores. El empleo de enzimas para la mejora de los productos a base de harina de trigo es común en la industria, destacándose las proteasas y amilasas. Las proteasas asisten en la hidrólisis del gluten, lo que permite aumentar la flexibilidad de la masa, mientras las amilasas efectúan la hidrólisis del almidón, produciendo un aumento en el tamaño, cambios en el color y olor del producto. Tanto proteasas como amilasas se pueden obtener de cereales malteados, de origen fúngico, bacteriano o vegetal, pero deben adquirirse de manera independiente, lo que representa un gasto para la industria que se podría reducir con el uso de un complejo enzimático que contenga ambas. Asimismo, se han reportado dificultades en la dosificación para estandarizar el proceso y algunas de las enzimas presentan una termoestabilidad que impiden la inactivación aún después del horneado, provocando defectos de calidad en los productos finales. *Solanum elaeagnifolium* es una planta nativa de México y Estados Unidos de Norteamérica. Las proteasas contenidas en las bayas maduras de esta planta se han utilizado para hacer queso y para ablandamiento de masas, ambas de manera artesanal. Sin embargo, no se han reportado los efectos proteolítico y amilolítico del extracto crudo enzimático (ECE) de *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles sobre gluten y almidón de trigo respectivamente, así como el efecto sobre parámetros de textura de la masa y la tortilla de harina de trigo. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad proteolítica y amilolítica del ECE de *S. elaeagnifolium* a diferentes valores de pH (4-10) y temperatura (55°C-75°C). El ECE exhibió actividad proteolítica a pH 9 y temperaturas mayores a 70°C, y actividad amilolítica a valores de pH menores (4-5) y altas temperaturas (75°C). Los análisis de las masas adicionadas con 80, 190 y 300 ppm de ECC muestran una disminución en la fuerza necesaria para lograr la deformación, así como menor fuerza necesaria para enrollar la tortilla y una menor distancia de ruptura que se traduce en tortillas más suaves. Los análisis de porcentaje de humedad muestran una disminución a medida que aumenta la



cantidad de extracto añadido. En general, la adición del extracto mejoró las características evaluadas tanto de la masa como de las tortillas cocidas.

Palabras clave: Amilasas, proteasas, *S. elaeagnifolium*, tortillas de harina de trigo

ABSTRACT

In Mexico, wheat is part of the food culture. The quality of products made from wheat flour is determined by a variety of factors, such as the origin of the ingredients, the formulation as well as the addition and dosage of improvers. The use of enzymes for the improvement of products based on wheat flour is common in the industry, highlighting proteases and amylases. The proteases assist in the hydrolysis of gluten, which allows the increase in the flexibility of the dough, while the amylases produce the hydrolysis of the starch, obtaining an increase in size, changes in the color and smell of the product. Both proteases and amylases can be obtained from malted cereals, fungal, bacterial or vegetable origin, but they must be purchased independently, which presents an expense for the industry that could be reduced with the use of an enzyme complex that contains both. Besides that, difficulties have been reported in the dosage to standardize the process and some of the enzymes have a thermostability that prevents inactivation even after baking, causing quality defects in the final products. *Solanum elaeagnifolium* is a native plant of Mexico and the United States of America. The proteases contained in the ripe berries of this plant have been used to make cheese and to soften dough, both in an artisanal way. However, the proteolytic and amylolytic effects of the crude enzymatic extract (ECE) of *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles on gluten and wheat starch, as well as the effect on texture parameters of the dough and the wheat flour tortilla have not been reported. The objective of this study was to evaluate the proteolytic and amylolytic activity of *S. elaeagnifolium* ECE at different pH values (4-10) and temperature (55°C-75°C). The ECE exhibited proteolytic activity at pH 9 and temperatures higher than 70°C, and amylolytic activity at lower pH values (4-5) and high temperatures (75°C). The analyzes of the doughs added with 80, 190 and 300 ppm of ECC show a decrease in the strength necessary to produce deformation, as well as less strength to roll the tortilla and a smaller breaking distance that translates into softer tortillas. Percent moisture analyzes show a decrease as the amount of extract added increases. In general, the addition of the extract improved the evaluated characteristics of both the dough and the cooked tortillas.

Key words: Amylases, proteases, *S. elaeagnifolium*, wheat flour tortillas

1. INTRODUCCIÓN

En México, la producción de grano de trigo fue de 3701 miles de toneladas del 2012 al 2017, ocupando el vigésimo noveno lugar a nivel mundial. Para finales de 2020 la producción total fue de 5398 toneladas de rendimiento en el año agrícola (SIAP-SAGARPA, 2020). Los principales productores nacionales de trigo son Sonora, Baja California y Guanajuato, con el 70% de la producción nacional. Chihuahua ocupa el séptimo lugar nacional en producción de trigo con 95,092 toneladas anuales (SIAP-SAGARPA, 2018). Desde que el trigo fue introducido a México por los españoles, en la cultura gastronómica mexicana es innegable el lugar que ocupan los productos de panificación, utilizando técnicas traídas por los colonizadores y posteriormente evolucionando para crear productos propios, con técnicas artesanales que se perfeccionaron con el paso de los años, entre ellos, la tortilla de harina. A nivel industrial, para la producción de muchos productos de panificación, entre ellos las tortillas de harina de trigo, se emplean enzimas para mejorar la calidad de las harinas, masas y el producto final, lo que vuelve a las proteasas y amilasas vitales para la obtención de productos de calidad y mejor aceptación entre los consumidores. Las enzimas se utilizan para reducir el uso de aditivos, lograr una mayor elasticidad de la masa, menor fuerza para formar las tortillas y aumentar la vida de anaquel del producto final (Badui Dergal, 2016; Hemdane et al., 2016).

La elasticidad de la masa de harina de trigo se debe principalmente al gluten, una red continua y viscoelástica formada principalmente por proteínas del trigo, que se forma durante el proceso de mezcla de la masa. La estructura de la red de gluten puede verse alterada por la adición de diferentes compuestos. La suplementación con proteasas provoca cambios en la estructura de las proteínas del gluten, las propiedades reológicas de la masa y la calidad sensorial del producto final (Nawrocka et al., 2020). Para aumentar la flexibilidad de la masa y disminuir el tiempo de mezcla, se incluyen proteasas de origen fúngico, bacteriano o vegetal en la formulación de harina de trigo (Cauvain & Young, 2001).

El almidón representa aproximadamente el 75% del peso de la harina, desempeñando un papel importante en la calidad del grano y las funciones de la masa, no solo a través de su estructura interna y propiedades fisicoquímicas, sino

también de la interacción almidón-gluten (Cao et al., 2019). Las amilasas de cereales, hongos y bacterias se utilizan en la harina de trigo para cambiar las características de la masa, visibles en la barra de pan, simetría, textura, sabor y aroma del producto final (Kulp, 1993). Tanto proteasas como amilasas pueden emplearse de manera individual, o como un solo complejo enzimático. *Solanum elaeagnifolium* var. Cavanilles (conocida como “silverleaf nightshade” en inglés o “trompillo” en español) es una maleza nativa del noreste de México y el suroeste de E.U.A. que contiene proteasas en las bayas maduras, que se han utilizado durante décadas para hacer queso de manera artesanal (Gutiérrez-Méndez, Chávez Garay, & Jiménez Campos, 2012) y para ablandamiento de carne de vacas viejas (Carballo-Carballo & Leal-Ramos, 2015). Sin embargo, nunca han sido investigados los efectos proteolítico y amilolítico de las bayas de Trompillo sobre gluten y almidón de trigo respectivamente, así como el efecto del extracto crudo enzimático sobre parámetros de calidad de tortilla de harina de trigo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Trigo

El trigo (*Triticum*) es un cultivo importante dentro de los cereales y, junto con el maíz y el arroz, representa el 94% del consumo total de cereales en todo el mundo (OMS, 2019). Existen dos especies de Trigo: a) *T. aestivum* o trigo harinero panificable y b) *T. durum*, o trigo cristalino, que se destina para la producción de sémolas y pastas para sopa (Hemdane et al., 2016). La introducción del trigo a México no es muy clara. La historia dice que Cortez, al conquistar lo que sería la Nueva España, ordenó a uno de sus esclavos plantar las semillas de trigo, para luego diseminarlo por todo el territorio buscando satisfacer las preferencias alimenticias de los españoles, estableciendo granjas exclusivas para trigo en Puebla, Querétaro y Guanajuato para el siglo XVI (Rooney & Serna-Saldivar, 2015).

En la actualidad, en México se producen 3.5 millones de toneladas de trigo anualmente, colocando al país como el productor número 29 a nivel mundial. Al no ser suficiente la producción para satisfacer la demanda nacional, se importan hasta 4.9 millones de toneladas en promedio (SIAP-SAGARPA, 2018). Además, los datos indican que el subsector que más contribuye a la industria alimentaria mexicana es el de panadería y elaboración de tortillas, evidenciando el alto consumo de este grano. El trigo es parte considerado el segundo cereal más importante en la alimentación nacional (CEDRSSA, 2020) y se incluye en gran variedad de productos como panes, galletas, cereales para desayuno, pasta, snacks, pasteles y tortillas. Las cifras a finales de 2017 según la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (EMIM) del INEGI valoran las ventas de productos de panificación industrial y tradicional en más de 63 millones de pesos mensuales (Dun&Bradstreet, 2018). Del porcentaje representativo en el gasto de productos derivados del trigo, el 5.5% corresponde a la tortilla de harina de trigo, que son adquiridos en tiendas de abarrotes, supermercados, con vendedores ambulantes o en mercados, entre otros (CEDRSSA, 2020).

Son muchísimos los factores que afectan la calidad de un producto a base de harina de trigo, entre los cuales se encuentran la formulación, la calidad, temporada y variedad de la harina, si se agregan o no mejoradores o aditivos

como emulsificantes, grasas, enzimas, la cantidad de agente leudante añadido (en su caso), el tiempo de reposo de la masa, temperatura, pH, humedad y las condiciones del horno (Cauvain & Young, 2001). En el caso de los productos a base de trigo, se utilizan principalmente agua, algún tipo de grasa (mantequilla, grasa vegetal o animal o aceite) y la harina. Las características de cada uno de los ingredientes básicos, y la cantidad en la que sean añadidos impactarán en los atributos de la masa y consecuentemente en el producto cocido.

2.2 Harina de trigo

Una harina de trigo común contiene aproximadamente 74.5-80% de carbohidratos, 9.5-10% de proteínas, 0.3-2.5% de fibra, 1-1.2% de grasa y 0.314-0.44% de cenizas (Muñoz de Chávez et al., 2010; Pérez Lizaur, 2014). Una de las propiedades más importantes de la harina de trigo es la cantidad de proteína, las cuales comprenden albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas. Las gliadinas y gluteninas se destacan por conformar el gluten una vez añadida agua y energía, por medio de la formación de enlaces disulfuro, lo que le da a la masa la capacidad de retener gas e incrementar en volumen (Bijlwan, Naik, Sharma, Singh, & Kumar, 2019).

Por lo general, las harinas son clasificadas de acuerdo con el uso que se les dará. Las más comunes son las harinas para panificación, pastel, repostería, y las utilizadas comúnmente en casa llamadas “de todo propósito o familiar” (*all-purpose*). La harina que se utiliza para tortillas está enriquecida, ligeramente aclarada y es producida a partir de harina de trigo duro, de mezclas de trigo de invierno con un contenido de proteína de aproximadamente 11% (Rooney & Serna-Saldivar, 2015).

La capacidad de absorción de agua de una harina depende de diferentes propiedades, incluyendo las cantidades de humedad, de proteína (y en su caso, si se le añade gluten seco), la cantidad y calidad del almidón, y en general si es harina integral o refinada. Comúnmente las harinas integrales absorben mayor cantidad de agua. Adicionalmente, el nivel de actividad enzimática podría incrementar la capacidad de absorción de agua de la masa, y a medida que aumenta esta capacidad de absorción de agua, se observa una disminución en el

tiempo de mezcla, así como un aumento en la suavidad, la estabilidad de la masa y la altura máxima (Tufail et al., 2019).

En cuanto a la proteína, existen múltiples metodologías para evaluar su calidad, las más comunes incluyen el Farinógrafo, extensógrafo, alveógrafo, y reómetro, que evalúan la flexibilidad y otras características de la masa (Brandner, Becker, & Jekle, 2019).

2.3 Tortillas de harina

Los panes planos de harina de trigo funcionan como platos con otros alimentos que se sirven sobre ellos o como implementos para comer guisos o salsas. Son importantes entre la gente de la India y el Medio Oriente y se han extendido a los países occidentales donde su popularidad creció debido a su versatilidad. Dentro de este tipo de productos se encuentran el pan pita, la base para pizza y la tortilla de harina de trigo, entre otros alimentos (Parimala & Sudha, 2015).

La tortilla de harina consiste fundamentalmente en una mezcla de harina de trigo, agua, algún tipo de grasa y sal. Otros ingredientes que también pueden añadirse son polvos para hornear, emulsificantes, conservadores y gomas entre otros (Mancera-Valencia, 2016). Una vez que se mezclan los ingredientes, se separa la masa en porciones pequeñas para dejar reposar entre 10-30 minutos (normalmente a temperatura ambiente). Una vez preparada y reposada la masa se manifiestan los cambios en la textura, que se observan principalmente al extender y aplanar la porción de masa para formar la tortilla. Los cambios de textura de la masa pueden ser analizados con metodologías específicas para determinar la dureza, cohesividad, esponjosidad, la fuerza necesaria para la extensión, y la extensibilidad máxima de la masa. Estos parámetros de textura de la masa son relevantes para la formación de las tortillas, ya que impacta directamente en el diámetro y ancho del producto final (Rooney & Serna-Saldivar, 2015). Posteriormente las tortillas formadas son cocidas por aproximadamente 40 segundos por cada lado en un comal o plancha caliente que alcanza temperaturas entre 230 y 270°C (Barros, Alviola, & Rooney, 2010). Una vez cocidas, están listas para el consumo, y son empleadas como sustituto del pan de mesa en la comida mexicana. Las tortillas de harina son más consumidas en el norte de México, y se pueden nombrar usos de las tortillas en quesadillas, sincronizadas,

los mundialmente famosos burritos, chimichangas, buñuelos, gorditas y tacos de harina (Rooney & Serna-Saldivar, 2015).

2.3.1 Análisis de las tortillas de harina

Tanto las tortillas frescas como las que son almacenadas se analizan en su capacidad de enrollarse, su redondez, ancho, apariencia, color, volumen específico, pH, humedad, acidez, textura y características sensoriales (Rooney & Serna-Saldivar, 2015).

2.3.2 Peso, diámetro, ancho y volumen específico

El peso de una tortilla está relacionado principalmente con la formulación y temperatura de cocción (Barros et al., 2010). La formulación impactará múltiples aspectos del producto final; en el caso del peso se pueden tomar en cuenta los siguientes factores: Bajo condiciones específicas (temperatura y humedad principalmente), las moléculas de amilosa y amilopectina se hidratan y el gránulo de almidón incrementa varias veces su tamaño original (Fennema, 2017). La adición de mejoradores podría impactar la cantidad de agua que retienen los gránulos de almidón después de la cocción, así como la temperatura de la plancha de cocción.

El diámetro, ancho, y por consecuencia el volumen específico se ven impactados por la fuerza con la que se extienda la masa, pero a su vez se ha visto que masas con gran cantidad de gluten tienden a encogerse durante el prensado y cocción como resultado de las fuertes redes que se desarrollan durante el amasado, lo que resulta en tortillas de menor diámetro y más anchas (Liu, Hou, Cardin, Marquart, & Dubat, 2017).

2.3.3 Actividad de agua y humedad

El agua es un componente de control importante en la transferencia de masa, las reacciones químicas y la actividad de los microorganismos. La mayor parte de la industria de procesamiento de alimentos tiene como objetivo la eliminación de agua para estabilizar el material, inmovilizarla en geles o crear alimentos de humedad baja e intermedia. La inmovilización de agua se mide considerando la actividad de agua (A_w) y su relación con el contenido de humedad (Le Manguer, 2017). Se cree que el efecto combinado de la actividad de agua, el contenido de

humedad y la temperatura de transición vítrea, se relaciona con la adherencia de las tortillas, e impacta en la suavidad y flexibilidad del producto final. En diferentes formulaciones se ha visto que aquellas tortillas con una A_w mayor a 0.84, resulta en tortillas pegajosas o chiclosas, y aquellas con A_w menor a 0.84 no presentan adherencia. Así mismo, se encontró una relación directa entre A_w y humedad (Rathod, 2008).

2.3.4 Color

La relación entre el color del alimento y su aceptabilidad se observa constantemente, no es un secreto que los consumidores relacionan los colores oscuros en productos de panadería como “saludables” (Barros et al., 2010). En panes planos tradicionales como el *chapati*, *tandoori*, *parantha* y *puri* que son preparados con harina integral, son mejor aceptados en tonos oscuros y esa aceptación se ve disminuida al cambiar el color a cualquier tonalidad más clara o parda (Parimala & Sudha, 2015). En alimentos, se emplea la escala CIELAB para medición de color. Se define como un espacio de color definido por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) en 1976. Expresa el color en tres valores donde las siglas LAB se refieren al espacio de color tridimensional, en donde L o L^* es luminosidad de negro a blanco, A o a^* va de rojo a verde y B o b^* va de azul a amarillo. Los datos son empíricos, pero útiles para caracterización, control de procesos, control de calidad, especificaciones de compra, etc. (Nielsen, 2017).

2.3.5 Características de textura

La masa es un sistema complejo debido a las diferentes interacciones de los ingredientes como proteína-proteína, almidón-proteína y almidón-almidón. Los ingredientes, el amasado y el reposo, contribuyen al comportamiento reológico de la masa previo a y durante la cocción (Ribeiro De Barros, 2009).

Comúnmente se evalúan las características de textura de manera objetiva utilizando un analizador de textura y/o con pruebas subjetivas, así como evaluaciones sensoriales. En la tortilla cocida se evalúa principalmente la flexibilidad y trabajo requerido para enrollarla (rolabilidad) así como su extensibilidad máxima. En las masas se busca determinar la fuerza requerida para provocar una deformación constante y comprimir una pieza a un porcentaje

de su grosor, su flexibilidad hasta llegar al punto de ruptura y otras características (MacRitchie, 2010).

Las proteínas contribuyen a la estructura inicial de la tortilla y también a la flexibilidad durante el almacenamiento. Las transglutaminasas, oxidorreductasas y proteasas se utilizan para modificar las propiedades reológicas de las masas de tortilla de harina de trigo, disminuir el tiempo de mezclado al debilitar las redes de gluten y se pueden utilizar para reducir significativamente los tiempos de reposo o fermentación de las pelotillas de masa (Rooney & Serna-Saldivar, 2015).

2.3.6 Características de las masas

Fundamentalmente, para producir una masa hay tres requisitos: harina, agua y energía. Si falta alguno, no se formará una masa, y si se desea un producto con burbujas (como un pan), también se requerirá aire (Inglett & Munck, 2013).

Los principales parámetros a medir para las masas frescas y harina incluyen el tamaño de partícula, absorción de agua, solubilidad, viscosidad, color y pH, y características reológicas determinadas usualmente con Farinógrafo, alveógrafo, Mixolab e instrumentos relacionados.(Rooney & Serna-Saldivar, 2015). La viscosidad incrementa mientras el tamaño molecular del compuesto aumente. Esto se debe a que, al incrementar el área superficial, la molécula se enfrenta con una mayor fuerza de fricción (MacRitchie, 2010).

2.4 Almidón de trigo

El almidón es un polímero conformado por monómeros de D-glucosas y tiene dos componentes principales: amilosa y amilopectina. La primera es una molécula lineal en la cual las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces α 1-4. La segunda es una molécula ramificada que contiene enlaces α 1-4 de la misma manera, pero con ramificaciones con enlaces α 1-6 (Figura 1). En los cereales, existe en forma de gránulos, la relación de amilopectina-amilosa es aproximadamente 70:30 en una harina convencional, y sus pesos moleculares se encuentran entre unos cientos de miles para la amilosa y millones para la amilopectina (MacRitchie, 2010).

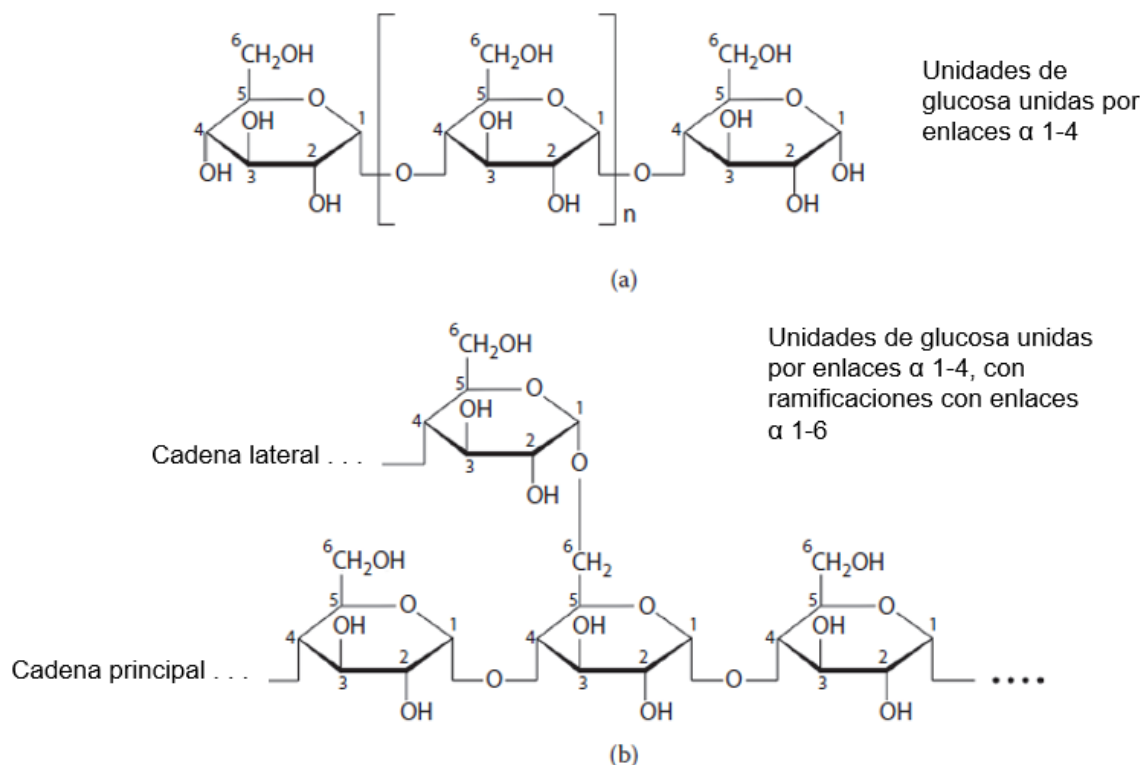


Figura 1 Estructura de (a) amilosa y (b) amilopectina. (MacRitchie, 2010)

Cuando una solución con almidón se calienta, los gránulos absorben agua hasta hincharse en un proceso reversible a temperaturas menores a 50°C, a temperaturas superiores ocurre el fenómeno conocido como gelatinización. Cuando se enfría, da paso a un proceso llamado retrogradación (MacRitchie, 2010).

2.5 Gluten

Clásicamente, las proteínas del trigo se subdividen en: albúminas solubles en agua, globulinas solubles en sales, gliadinas solubles en etanol al 70% y gluteninas solubles en ácidos o álcalis. El gluten está compuesto por la gliadina monomérica y la glutenina polimérica. La viscosidad y extensibilidad de la masa está determinada principalmente por la gliadina, mientras que las propiedades elásticas están sujetas a glutenina. Las proteínas de gluten contienen una mezcla de gliadinas de bajo peso molecular y en contraste, gluteninas de muy alto peso molecular. Las gluteninas están presentes como grandes complejos formados por subunidades unidas entre sí por enlaces disulfuro. Sus masas moleculares van de cientos de miles hasta varios millones de Dalton (Sliwinski, Kolster, Prins, & Van

Vliet, 2004). Se encuentran en una variedad de cereales como el trigo, centeno, cebada, avena y los derivados de estos granos, incluyendo la malta y levadura de cerveza (Rivera, 2017).

Entre los retos a enfrentar al momento de analizar las proteínas de gluten es su solubilización. No se ha reportado un solvente capaz de solubilizar completamente estas proteínas, incluso con solventes o soluciones de detergentes iónicos un 20-30% del total de la proteína no se solubiliza. Para acercarse a la solubilización completa, se opta por la aplicación de ultrasonido o sonicación, aunque esta práctica provoca la escisión de las moléculas de glutenina, induciendo de esta manera la solubilización hasta un 95% (MacRitchie, 2010).

2.6 Mejoradores en panificación

Los términos “mejoradores”, “acondicionadores de masa”, “aditivos”, entre otros, se usan para incluir un gran rango de materiales que se pueden añadir a la harina de trigo o a la masa para mejorar algún aspecto de esta o del producto terminado. La Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSAI-2008 define los aditivos como “cualquier sustancia que como tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características.” (NORMA OFICIAL MEXICANA, 2008). Algunos de los más comunes son preparaciones con enzimas, entre las que se encuentran las harinas malteadas, α -amilasas, etc.; harina de gluten, sustrato para levaduras, agentes oxidantes para ayudar en la retención de gas, suavizantes, o preparaciones para mejorar el color (como harina de soya).

2.6.1 Enzimas en la industria de panadería

Las lipasas son enzimas que se utilizan para modificar la grasa en la formulación, con el fin de generar estructuras similares a emulsionantes que son necesarias para la estabilidad de la celda de gas (Primo Martin, 2017). Las oxidasas,

modifican las proteínas del gluten para mejorar la estructura de la masa. Las xilanasas influyen generando estructuras que unen más agua. Otras enzimas más comúnmente empleadas son amilasas para producir modificación sobre amilosa y amilopectina y proteasas (Figura 2), que al igual que las oxidasas son empleadas para modificar la estructura del gluten en la masa (Kulp, 1993).

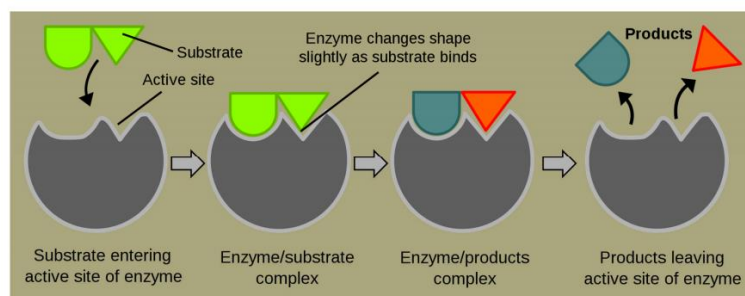


Figura 2 Enzimas, sitio de acción y productos de hidrólisis (Agah, 2018)

2.6.1.1 Amilasas

Los enlaces glucosídicos en los almidones pueden ser hidrolizados para producir azúcares diversos como glucosa, maltosa y otros oligosacáridos, y el control en el grado de hidrólisis puede ayudar en la producción de características deseadas en la tortilla. Las amilasas se pueden clasificar por su origen en fúngicas, bacterianas y maltogénicas, o por su mecanismo de acción sobre el almidón en endo- y exo-amilasas.

2.6.1.1.1 Endo-amilasas

Se refiere a aquellas enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico α 1-4 de la amilosa y la amilopectina, dando como resultado una disminución en la viscosidad de una solución de almidón gelatinizado (Inglett & Munck, 2013).

α -amilasas termoestables: amilasas obtenidas de *Bacillus subtilis* (Aladejana, Oyedeji, Omoboye, & Bakare, 2020) y *Bacillus licheniformis* (Hafeez, Jeyakumar, Singh, & Lawrence, 2016) principalmente, mostrando la mayor actividad enzimática a temperaturas alrededor de 60°C y hasta los 75°C.

α -amilasas termolábiles: aquellas amilasas que no son de utilidad en la industria de licuefacción de almidón, por su sensibilidad a altas temperaturas. Como la producida por *Aspergillus oryzae* (Naili, Sahnoun, Bejar, & Kammoun, 2016).

2.6.1.1.2 Exo-amilasas

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 en el almidón eliminando sucesivamente unidades de glucosa o maltosa del extremo de la cadena no reductora. Son divididas a su vez en dos grupos: exo-amilasas glucogénicas y exo-amilasas maltogénicas (Inglett & Munck, 2013).

Las exo-amilasas glucogénicas rompen los enlaces α -1,4 y también, aunque a un ritmo mucho más lento, los enlaces α -1,6. Se obtienen comúnmente de *Aspergillus niger* o *Rhizopus sp.* Las exo-amilasas maltogénicas, escinden solo los enlaces α -1,4. Se encuentran en cereales como cebada, trigo y centeno. (Saptadip, 2020).

2.6.1.1.3 Amilasas en la industria de panadería

Comúnmente, las amilasas se emplean para lograr la modificación del almidón. Los cambios en el almidón durante la cocción y el almacenamiento afectan la textura del producto ya que el almidón se gelatiniza (parcialmente) en las tortillas, y esta gelatinización limitada conduce a un mejor ablandamiento (influyendo en la capacidad de doblar y enrollar la tortilla) y la vida de anaquel del producto final. El efecto de las amilasas depende de su fuente, estabilidad y dosis (Primo Martin, 2017).

2.6.1.2 Proteasas

Las proteasas son enzimas encargadas de la hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas y una de las clases de enzimas más utilizadas en la industria alimentaria (Guadix et al., 2000). Se pueden encontrar en todos los organismos vivos (incluidos los mamíferos, las plantas y los microorganismos) ya que se utilizan para degradar proteínas no funcionales en aminoácidos (Gutiérrez-Méndez et al., 2013). Aunque se encuentran en una amplia diversidad de fuentes, como plantas, animales y microorganismos, son preferidas las fuentes microbianas para la producción de proteasas debido a ventajas técnicas y económicas. Sin embargo, enzimas obtenidas de bacterias como *B subtilis* se han mostrado difíciles de dosificar y producen defectos de calidad sobre productos a base de harina de trigo, debido a su termoestabilidad, como gomosidad en las barras de pan después del horneado (Singh, Mittal, Kumar, & Mehta, 2016).

La cantidad de proteína presente en la harina de trigo se toma como un indicador de la calidad de la tortilla. Un porcentaje menor a 9% de proteína se relaciona con tortillas que se rompen fácilmente y de mayor diámetro, una tortilla elaborada con harina con 12% de proteína o mayor presenta mayor facilidad para doblarse, menor diámetro y un mayor tiempo de mezcla y reposo en la masa (Primo Martin, 2017). Como práctica común, la proteólisis en harina de trigo se usa con el objetivo de “debilitar” la red de gluten y facilitar el manejo de la masa, y en otros estudios se busca la hidrólisis de la proteína para disminuir la respuesta inmunológica de aquellos que presentan enfermedad celíaca y alergia en personas genéticamente dispuestas, ya que las proteínas del gluten son altamente resistentes a la hidrólisis mediada por proteasas del tracto gastrointestinal humano (Balakireva & Zamyatnin, 2016). En investigaciones alternas, se busca el uso de cereales libres de gluten como el arroz (Bandyopadhyay, Misra, & Ghosh, 2008), la quinoa o el amaranto y el uso de proteínas alternas como la semilla de chía, sus hidrolizados y caracterización (López, Galante, Raimundo, Spelzini, & Boeris, 2019). La modificación de gluten en la producción de tortillas es a grandes rasgos para prevenir la formación de una red de gluten fuerte que reduciría el tamaño y aumentaría la contracción después del prensado. Las proteasas tienen efecto sobre la extensibilidad, elasticidad, retención de gas, flexibilidad y vida de anaquel de la tortilla (MacRitchie, 2010). En cuanto a la hidrólisis de gluten, se ha concluido que la presencia del almidón en la harina de trigo impide la agregación de gluten, facilitando la proteólisis (Hardt, Boom, & van der Goot, 2015).

Las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos según su actividad catalítica. Pueden ser endopeptidasas si rompen enlaces internos de la cadena proteica o exopeptidasas si hidrolizan el enlace terminal de la cadena. Estas últimas pueden dividirse a su vez en aminopeptidasas si actúan por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo C-terminal (Vioque, 2001). Adicionalmente, se pueden clasificar por su origen de fuentes animales, vegetales y microbianas.

2.6.1.2.3 Proteasas de origen animal

Las proteasas obtenidas de animales más conocidas y utilizadas son la tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina y renina, utilizadas para el control biológico de plagas de insectos, medios de crecimiento microbiano, algunas aplicaciones médicas y preparación de cuajada (Chávez-Garay et al., 2016; Gutiérrez-Méndez et al., 2019, 2012).

2.6.1.2.4 Proteasas de microorganismos

Este es el grupo más grande de enzimas industriales y representan más del 60% de la venta global total de enzimas. La fuente de hongos que producen estas enzimas hidrolíticas pertenecen al género *Aspergillus*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermomyces* etc. (Singh et al., 2016)

2.6.1.2.5 Proteasas de origen vegetal

Las proteasas vegetales más exploradas son bromelina, ficina y papaína encontradas en *Ananas comosus*, *Ficus carica* y *Carica papaya*, respectivamente. Estas proteasas se utilizan para diferentes aplicaciones tales como elaboración de cerveza, ablandamiento de la carne, y coagulación de la leche. Las proteasas vegetales han ganado atención a pesar de que su producción es un proceso que se considera consume mucho tiempo, sobre todo aquellas plantas con el potencial de varias enzimas de interés para la industria (Carballo-Carballo & Leal-Ramos, 2015).

2.6.1.2.5.1 Trompillo (*Solanum elaeagnifolium* var. *cavanilles*) como agente amilolítico y proteolítico

El trompillo es un arbusto considerado maleza, espinoso, cubierto por una delgada capa continua de pelos estrellados gris-plateados; tiene hojas simples con el margen entero a escasamente lobado, generalmente de menos de 4 cm de ancho; corola morada o azul de más de 2.5 cm de diámetro; fruto globoso, de hasta 15 mm de diámetro, café-amarillento, más o menos cubierto por pelos estrellados. Semillas de hasta 3 mm de diámetro (Figura 3).

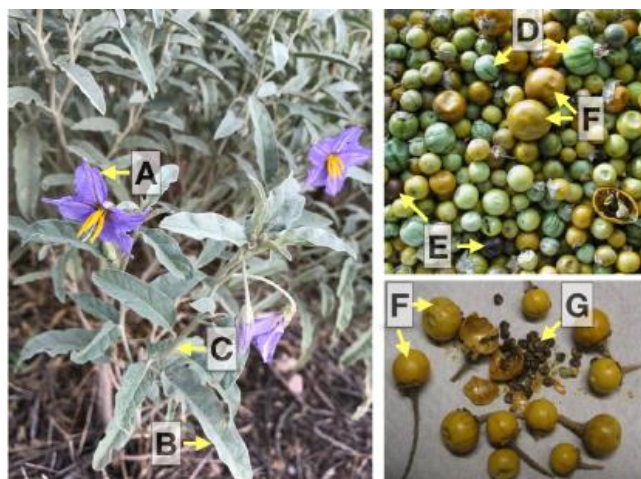


Figura 3 *Solanum elaeagnifolium* var. *Cavanilles*: A) flores, B) hojas, C) tallo, D) frutos verdes, E) frutos de color marrón oscuro, F) frutos maduros, G) semillas. (Gutiérrez-Méndez et al., 2012).

La planta es considerada maleza de impacto negativo, llevando incluso al abandono de Granjas por infestación, y disminuyendo el valor de las tierras infestadas (Boyd et al., 1984).

Por otra parte, dentro de los efectos positivos de esta planta está su actividad proteolítica, utilizada por los nativos de Nuevo México y la población Chihuahuense para cuajar la leche (Hernández-Ocura et al., 2018; Mancera-Valencia, 2016), así como para la producción de quesos artesanales en Chihuahua (Chávez-Garay et al., 2016; Gutiérrez-Méndez et al., 2019, 2012). En estudios realizados previamente por nuestro equipo de trabajo se reporta un efecto colagenolítico del extracto de bayas de trompillo (Carballo-Carballo et al., 2015), por lo que se podría sugerir el uso de este como agente proteolítico sobre el colágeno de bovino para el ablandamiento de carne a partir de la hidrólisis enzimática. Asimismo, otras plantas de la familia *Solanum* han sido estudiadas previamente por su actividad amilolítica, como la papa (*Solanum Tuberosum*) (Cottrell et al., 1993; Viksø-Nielsen, Christensen, Bojko, & Marcussen, 1997) y Berenjena (*Solanum melongena* y *S. aethiopicum*) (Agoreyo & Fregene, 2014; Sadik, Issa, & El-kabby, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples ingredientes sintéticos actualmente utilizados como aditivos de los alimentos, así como una creciente preocupación por su impacto en el organismo, incluyendo su potencial carcinogénico y toxicidad, mostrándose como materia prima viable todo aquello proveniente de la naturaleza. *Solanum elaeagnifolium* var. Cavanilles se presenta como una alternativa a las proteasas, amilasas y lipasas comerciales evidenciando un beneficio a costo, el empleo del complejo enzimático puede mejorar la solubilidad de proteínas, proveer funciones tecnológicas en alimentos y posiblemente disminuir la respuesta inmunológica de aquellos que padecen enfermedad celíaca en el caso del gluten, aumentar los azúcares fermentables para panificación por medio de la hidrólisis de almidón y la actividad lipolítica del complejo hacen que se presente la oportunidad de dar valor agregado a una planta considerada maleza en México y Estados Unidos y dar a conocer a la comunidad científica y público en general el potencial de *S. elaeagnifolium* en la industria alimentaria.

4. HIPÓTESIS

El complejo enzimático del extracto crudo de trompillo (*Solanum elaeagnifolium* var. *Cavanilles*), es capaz de actuar sobre el gluten y el almidón de trigo provocando su hidrólisis que producirán mejoras en las características de calidad de la masa y tortillas de harina de trigo refinada.

5. OBJETIVO GENERAL

El presente proyecto tiene como objetivo obtener hidrolizados de gluten y almidón de trigo a partir de una harina de trigo sin actividad enzimática o suplementada con gluten usando como agentes proteolítico y amilolítico el complejo enzimático de *S. elaeagnifolium* var. *Cavanilles*

5.1 Objetivos específicos

5.1.1 Objetivo específico 1

Optimizar el efecto de la proteasa de *S. elaeagnifolium* sobre la hidrólisis de gluten y almidón de trigo *in vitro* bajo diferentes condiciones (temperatura, pH)

5.1.2 Objetivo específico 2

Evaluar la actividad enzimática *in vitro* de la proteasa de *S. elaeagnifolium* sobre el gluten de trigo

5.1.3 Objetivo específico 3

Evaluar la actividad enzimática *in vitro* de la o las amilasas de *S. elaeagnifolium* sobre el almidón de trigo

5.1.4 Objetivo específico 4

Evaluar los cambios sobre las características de una masa de harina de trigo tratada con el complejo enzimático de *S. elaeagnifolium* usando como control una masa sin tratamiento enzimático.

5.1.5 Objetivo específico 5

Evaluar los cambios sobre las características de una tortilla de harina de trigo formulada con masa tratada con el complejo enzimático de *S. elaeagnifolium* usando como control una tortilla formulada con masa sin tratamiento enzimático.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Trompillo (*Solanum elaeagnifolium* var. Cavanilles)

Se recolectaron manualmente bayas maduras (amarillas) de plantas de Trompillo (*Solanum elaeagnifolium* var. Cavanilles) que no presentaron daños sobre su superficie. Las bayas fueron recolectadas en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México, entre los meses de octubre y noviembre del año 2018. Las bayas se almacenaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) en bolsas de papel kraft. Se utilizaron únicamente las bayas ya que estudios preliminares han demostrado que es la parte con actividad enzimática bien definida (Chávez-Garay et al., 2016; Gutiérrez-Méndez et al., 2012).

6.1.2 Gluten de trigo

Se empleó gluten de trigo en polvo marca Sigma-Aldrich (adecuado para sustrato de proteasas).

6.1.3 Almidón.

Se empleó almidón de papa soluble para yodometría marca Sigma-Aldrich (adecuado para sustrato de amilasas).

6.1.4 Tortillas de harina de trigo

Se obtuvo la harina de trigo refinada a través de la empresa Grupo Sabamex. Harina de trigo cachanilla F-2000 G-1, sin enzimas o harina de gluten adicionada.

6.2 Métodos

En la figura 4 se muestra el diagrama de la estrategia general que se siguió durante la investigación.

6.2.1 Análisis proximal de las bayas de Trompillo y Harina de trigo

Los contenidos de humedad, grasa, cenizas y proteína de las bayas de trompillo se determinaron de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC (1998) 934.01, 920.39, 942.05 y 954.01 respectivamente, en ensayos por triplicado. En la determinación de nitrógeno total Micro-Kjeldahl se utilizó un factor de conversión para el cálculo de nitrógeno soluble de 6.25 (Carballo-Carballo & Leal-Ramos, 2015). Para la determinación del pH de las bayas se seleccionó una muestra



representativa de bayas de Trompillo la cual se maceró con agua destilada (1:10 p/v) y se filtró. El filtrado se utilizó para determinar el pH.

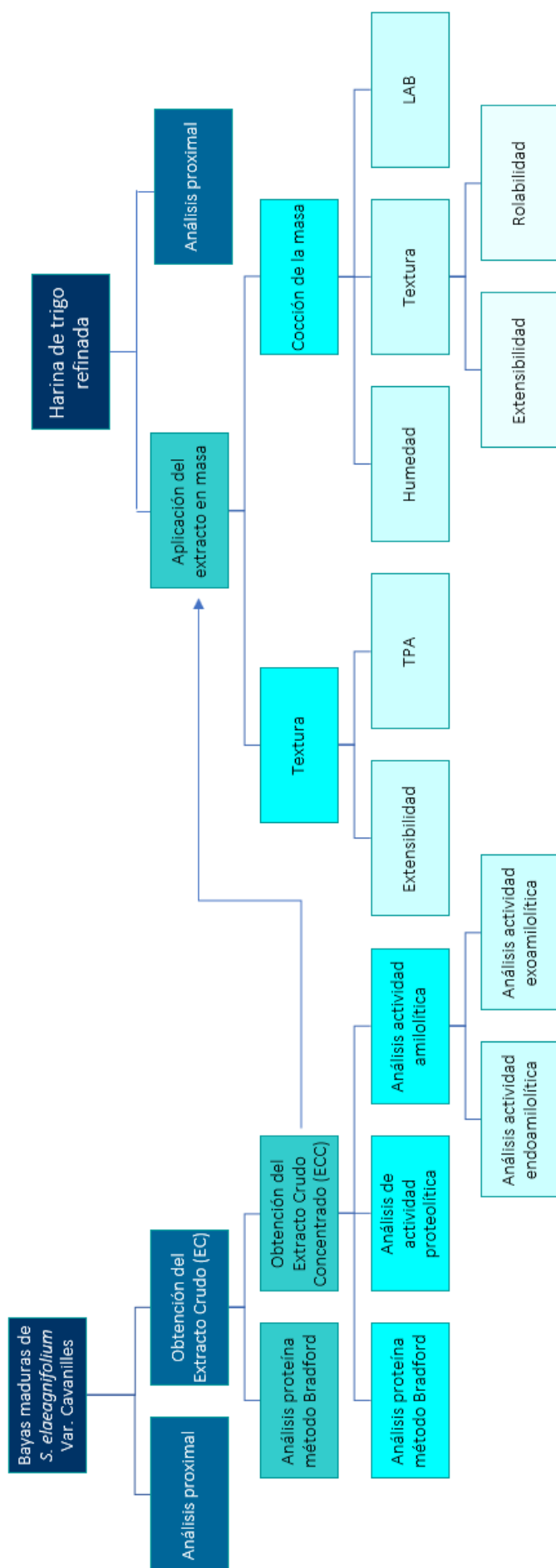


Figura 4 Diagrama de metodología general del proyecto presente.

6.2.2 Preparación de los extractos crudos concentrados de proteínas de Trompillo

6.2.2.1 Extracción de proteínas del Trompillo.

El método utilizado para la extracción de las proteínas del trompillo fué el descrito por Gutiérrez et al., (2012) con algunas modificaciones. Las bayas amarillas se molieron hasta obtener un polvo, utilizando un molino Thomas Wiley Fisher (Modelo 3383-L10, EUA), con una malla núm. 20 (850 μ). Después de este paso, la muestra obtenida, se mezcló con una solución amortiguadora de 50mM de acetato de sodio con un pH de 5 (relación 1:10 p/v) a la cual también se le agregó 5% de NaCl. La mezcla resultante permaneció en agitación constante durante 12 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, el residuo vegetal se pasó a través de 6 capas delgadas de gasa y el residuo filtrado resultante, colocado en tubos Falcón de 50 mL para su posterior centrifugación (Centrifuga Thermo IEC, Centra CL3R) a 4000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y fue nuevamente centrifugado bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante del extracto se filtró a través de un filtro millipore (Millex-HP Filters) con una membrana de 0.45 μ m, posteriormente se almacenó en un congelador a -18°C, éste fue considerado como el extracto crudo (EC).

6.2.2.2 Concentración de extractos crudos.

El EC de bayas amarillas fue colocado en un contenedor concentrador (Pierce Concentrator 9K, Thermo Scientific) con una membrana de 9 kDa. El concentrador se llenó con 20 mL del EC y se centrifugó a 2500 x g por 45 minutos a una temperatura de 4°C. La concentración del extracto se repitió 5 veces bajo las mismas condiciones. Lo obtenido del paso anterior fue considerado como extracto crudo concentrado (ECC) con NaCl. Del ECC obtenido, se tomó 1ml y se mezcló con 3 ml de solución amortiguadora 50 mM de acetato de sodio pH 5 (relación 1:10 p/v), posteriormente la mezcla fue colocada en un contenedor concentrador para su posterior centrifugación a 4000 rpm por 20 min a 4°C, el procedimiento se realizó 2 veces más, el resto del extracto obtenido fue considerado como ECC sin NaCl. El extracto crudo concentrado (ECC) se almaceno en congelación (-18°C).

6.2.2.3 Cuantificación de proteína.

El método de Bradford (Bradford, 1976) fue utilizado para la cuantificación de proteínas en el EC y ECC de los frutos de *Solanum elaeagnifolium*. Se realizó una curva de calibración con estándares de suero de albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) y reactivo de Bradford. Los valores de concentración y absorbancia obtenidos de los estándares de BSA, se graficaron y se ajustaron a un modelo de regresión lineal mediante el software Minitab 18. Por otra parte, la metodología que se realizó para la cuantificación de proteína, fue la descrita por Gutiérrez et al. (2012) en donde se colocó, por cada pozo de una microplaca de fondo plano (BD falcon), 300 μ L del reactivo de Bradford y 10 μ L de la muestra. El análisis se realizó, por triplicado, en un lector de microplacas para absorbancia Biotek Elx808 a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se interpolaron con los datos obtenidos en la curva de calibración, de tal manera que se estimó la concentración de proteína en cada muestra.

6.2.3 Determinación de la actividad proteolítica del ECC utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se analizó la actividad proteolítica por medio de la metodología modificada de McDonald et.al. (Freundt, 1983).

La curva de calibración se preparó con una solución de Tirosina (SIGMA-ALDRICH) 1.1mM a partir de la cual se diluyó en concentraciones de 5.5 μ M, 11 μ M, 27.5 μ M y 55 μ M. Los valores de concentración y absorbancia obtenidos de los estándares de Tirosina se graficaron y se ajustaron a un modelo de regresión lineal mediante el software Minitab 18.

Se preparó una solución de gluten al 0.666% con buffer de Tris-acetato (SIGMA-ALDRICH, CTR scientific) (10mM) adicionado con acetato de calcio (5mM) a pH 4, 5, 6.5, 8 y 9, y se homogenizó con un Ultraturrax (IKA T18, Alemania) a 6500 RPM por 30 segundos. La solución de caseína fue preparada con la misma metodología, con excepción de la homogenización con Ultraturrax. Estas soluciones se denominaron solución sustrato.

Se colocaron 130 μ L de solución sustrato en un tubo eppendorff de 2 ml y se adicionaron 25 μ L de la solución enzimática, se mezcló e incubó a 55°C, 60°C,

65°C, 70°C y 75°C por 10 minutos, se retiró de la temperatura de incubación y se adicionaron 130 µL de una solución de ácido tricloroacético (110mM) para detener la reacción, se mezcló e incubó nuevamente a la temperatura determinada por 20 minutos más, al terminar se centrifugó por 15 minutos a 10°C a 3000 x g. Al terminar se tomaron 250 µL con cuidado de no mezclar el sedimento en el tubo y se colocó en un nuevo tubo, adicionando 625 µL de una solución de carbonato de sodio (500mM) y 125 µL de una disolución del reactivo Folin-Ciocalteu (1:3 en agua desionizada) y se incubó nuevamente a la temperatura determinada por 30 minutos en obscuridad. Se tomó una alícuota de 300 µL y se colocó en una celda con 2700 µL de agua desionizada para lectura a una longitud de onda de 760nm en el espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis). Un blanco se preparó con 250 µL de agua desionizada en lugar del sobrenadante y se mezclaron con 625 µL de la solución de carbonato de sodio (500mM) y 125 µL de la disolución del reactivo Folin-Ciocalteu (1:3).

Se calculó la actividad proteolítica por medio de la siguiente ecuación:

$$U/mL = \frac{Tyr * Vr}{Vm * t * Vf}$$

Donde:

Tyr= concentración de tirosina (µmol)

Vr= Volumen de reacción (µL)

Vm= Volumen de muestra (mL)

Vf= Volumen final (mL)

t= tiempo de reacción enzimática (min)

Cada unidad proteolítica se definió como la cantidad de micro moles de tirosina hidrolizados durante el tiempo de reacción en las condiciones dadas.

6.2.4 Determinación de actividad endoamilolítica *in vitro*.

Se determinó la actividad amilolítica *in vitro* con la metodología descrita por Machado de Castro (Machado de Castro & Dias Ribeiro, 2013) con algunas modificaciones.

La curva de calibración se preparó con una solución de almidón soluble para yodometría de 0.5g en 100ml de buffer universal a pH determinado (4, 5.5, 7, 8.5 y 10) a partir de la cual se diluyó en concentraciones de 0.05g a 0.5g. a 100 µl de solución sustrato se adicionaron 90 µl de solución de Lugol y 1 ml de agua destilada, se transfirieron 600 µl de la solución anterior a la celda y se añadieron 2.4ml de agua destilada para insertar y leer en el espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis) a 640nm. Los valores de concentración y absorbancia obtenidos de los estándares de almidón se graficaron y se ajustaron a un modelo de regresión lineal mediante el software Minitab 18.

Para la determinación de la actividad amilolítica se distribuyeron en tubos eppendorff de 2 ml 10 µl de la solución enzimática (ECC), se agregaron 90 µl de solución de sustrato diluida con agua destilada (1:1) e inmediatamente se incubaron en un baño con agua a temperatura determinada (55, 60, 65, 70 y 75°C) por 3 minutos. Al terminar el tiempo de incubación se añadieron 90 µl de solución de Lugol a cada tubo, así como 1ml de agua destilada, se mezcló con ayuda del Vortex por 2 segundos, se transfirieron 600 µl de cada tubo a una celda y se añadieron 2.4ml más de agua destilada para lectura en el espectrofotómetro a 640nm.

Para la preparación del blanco de cada muestra se agregaron las mismas soluciones en el siguiente orden: 10 µl de la solución enzimática, 90 µl de la solución de Lugol y 90 µl de la solución sustrato, esto con la finalidad de evitar la reacción enzimática.

Para el cálculo de la actividad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{mL} = \frac{\alpha * (absb - abss) * fd}{t * v}$$

Donde:

α = pendiente de la curva de calibración

absb = valor de absorbancia del blanco

abss = valor de absorbancia de la muestra

fd = el factor de dilución

t = tiempo de reacción enzimática (min)

v = volumen de extracto enzimático (mL)

Una unidad de actividad endoamilolítica se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1.0mg de almidón por minuto, bajo las condiciones del ensayo.

6.2.5 Análisis de la masa y tortillas

En la Tabla 1 se muestra la formulación de los ingredientes. En la figura 5 se muestra el método de preparación de la masa y tortillas. Se incluyó harina, agua, manteca, polvo para hornear y sal como los ingredientes principales; metabisulfito de sodio y ácido sórbico como conservador; azúcar para minimizar el sabor de los aditivos, y ECC

Tabla 1. Formulación de la masa para preparar tortillas de harina, Blanco (B), -1 con 80 ppm ECC, punto central (C) con 190 ppm de ECC y +1 con 300ppm de ECC.

Ingrediente	B	-1	C	+1
	Cantidad (g)			
Harina	100	100	100	100
Agua destilada	53	52.12	50.9	49.7
Manteca	10	10	10	10
Metabisulfito de sodio (ppm)	30	30	30	30
Sal	1.67	1.67	1.67	1.67
Azúcar	0.83	0.83	0.83	0.83
Polvo para hornear	2.67	2.67	2.67	2.67
Ácido sórbico	0.67	0.67	0.67	0.67
ECC (ppm)	0	80	190	300
ECC (ml)	0	0.88	2.1	3.3

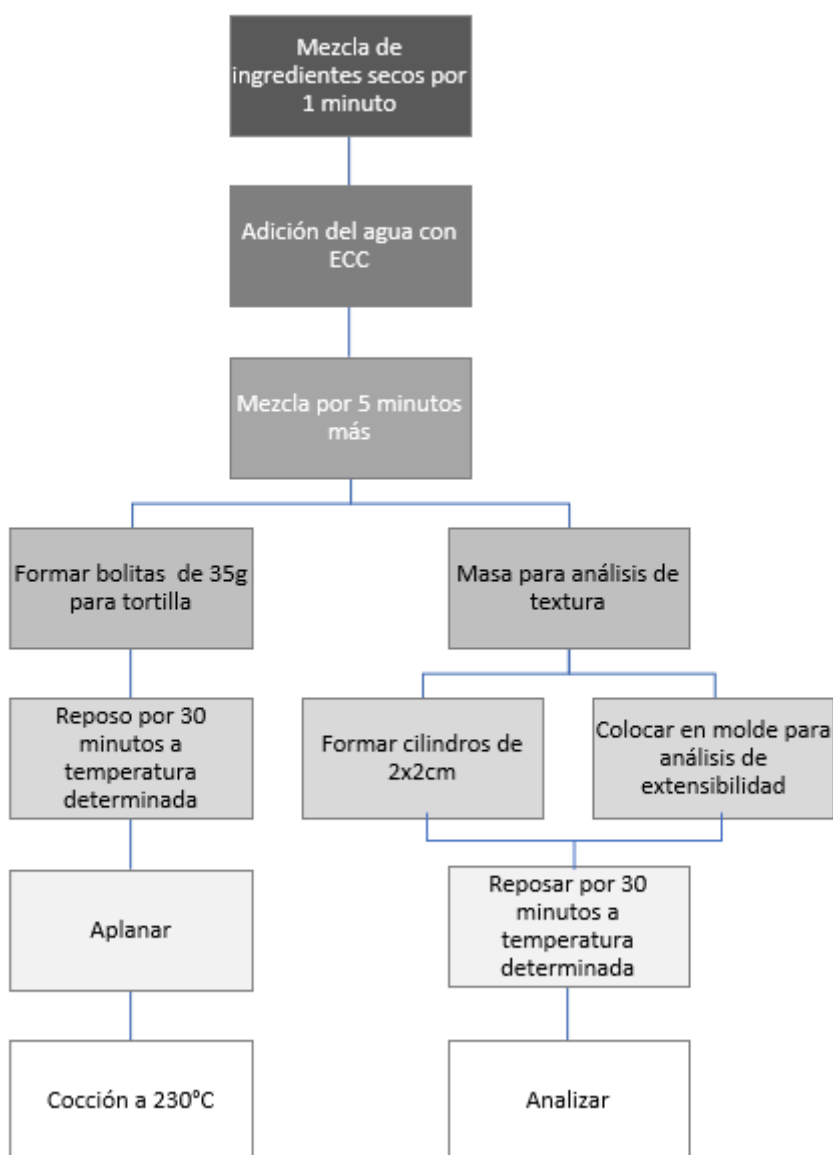


Figura 5. Método de preparación de las tortillas de harina de trigo

Con el fin de determinar la cantidad de ECC que se adicionó en la formulación se hizo una serie de extracciones y fueron homogenizadas para determinar la actividad amilolítica y proteolítica y evitar variaciones entre un lote de tortillas y otro.

6.2.5.1 Análisis de perfil de textura de la masa (TPA)

Las pruebas fueron realizadas con un Texturómetro TA XT plus (Stable Micro Systems, UK) y los resultados analizados con el software Texture Exponent 32. Se tomó una porción de la masa para posteriormente darle forma de cilindro con un ancho de 20mm, una vez alcanzada esa medida se cortó en trozos de 20mm

de manera que quedaran pequeños cilindros de la misma medida para ser analizados. Fueron colocados en la plataforma del texturómetro (figura 6) para ser comprimidos por una punta cilíndrica de 60mm de diámetro en dos ocasiones, hasta lograr un 70% de deformación con una velocidad de 10mm/s. Se determinó la dureza, cohesividad, adhesividad y esponjosidad por medio de este análisis.

El proyecto y condiciones utilizadas para el análisis se muestran en la tabla 2. Una gráfica típica del análisis de perfil de textura se muestra en el Apéndice 4, Figura 52.



Figura 6. Ilustración del cilindro para análisis TPA

Tabla 2. Configuración para análisis TPA

Parameters	TPA	
	Pre test speed	5 mm/s
	Test speed	10 mm/s
	Post test speed	5 mm/s
	Distance	14mm
	Time	5 sec
	Dataacquisition rate	200pps
	Load cell	5kg
Trigger	Type	Auto
	Force	0.05 N

6.2.5.2 Análisis de extensibilidad de la masa

La masa fue colocada en un molde de base ranurada previamente engrasada con aceite de maíz, se hizo con el fin de formar tiras con el mismo largo y ancho, eliminando con una espátula el exceso de masa si esta salía del molde. El molde con la masa se dejó reposar por 30 minutos a la temperatura determinada (30, 37 y 45°C). Pasado ese tiempo las tiras de masa fueron retiradas del molde con una espátula y colocadas entre dos placas de acrílico, que posteriormente fueron colocadas sobre el gancho de la punta del texturómetro sin tocarlo, luego se realizó el análisis de tensión estirando la masa hasta lograr la ruptura de la tira (Figura 7). Se determinaron la extensibilidad y la resistencia a la extensión. Las pruebas fueron realizadas con un Texturómetro TA XT plus (Stable Micro Systems, UK) y los resultados analizados con el software Texture Exponent 32.

El proyecto y condiciones utilizadas para el análisis se muestran en la tabla 3. Una gráfica típica del análisis de extensibilidad se muestra en el Apéndice V, Figura 53.

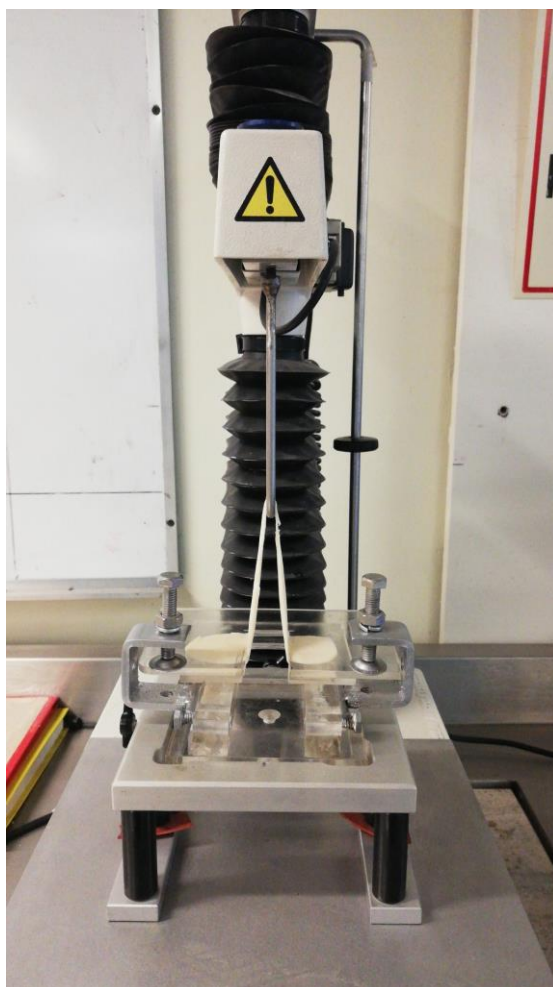


Figura 7. Análisis de extensibilidad de la masa

Tabla 3. Configuración para análisis de extensibilidad

Test mode	Measure force in tension: return to start	
Parameters	Pre test speed	2 mm/s
	Test speed	3.3 mm/s
	Post test speed	10mm/s
	Distance	105mm
	Dataacquisition rate	200 pps
	Load cell	5kg
Trigger	Type	Auto
	Force	0.05 N

6.2.5.3 Análisis de las características físicas de las tortillas

Después de la cocción de las tortillas fueron almacenadas en bolsas de barrera herméticas y analizadas una a la vez. Se seleccionaron 10 tortillas por lote para pesar en balanza analítica, se determinó el diámetro y ancho con una regla vernier y posteriormente fueron seleccionadas 2 muestras de manera aleatoria para analizar con un colorímetro digital (Aquatecnica CR-410, España) los valores L^* , a^* y b^* por triplicado en cada muestra.

6.2.5.4 Análisis de humedad y a_w

Se seleccionaron 3 muestras aleatoriamente para determinar actividad de agua (labmaster-aw neo, Novasina, Suiza), (Rathod, 2008), y 3 muestras para determinar humedad de acuerdo al método 930.15 de la AOAC (1999).

6.2.5.5 Análisis de rolabilidad de las tortillas

Las pruebas fueron realizadas con un Texturómetro TA XT plus (Stable Micro Systems, UK) y los resultados analizados con el software Texture Exponent 32. Se seleccionaron 5 muestras de cada lote de manera aleatoria para realizar la prueba empleando un accesorio diseñado para determinar rolabilidad (Ruiz-Gutiérrez et al., 2012). La tortilla fue colocada en la ranura del cilindro y sujeta con un trozo de cinta adhesiva, para posteriormente ser enrollada por acción de la punta en tensión anudada al accesorio con hilo encerado hasta lograr un giro completo del cilindro. Se determinaron la fuerza máxima y trabajo de rolabilidad.

El proyecto y condiciones utilizadas para el análisis se muestran en la tabla 4. Una gráfica típica del análisis de perfil de textura se muestra en el Apéndice VI, Figura 54.

Tabla 4. Condiciones seleccionadas para el análisis de rolabilidad de las tortillas

Test mode	Measure tensión	
Parameters	Settings	
	Pre test speed	10 mm/s
	Test speed	3 mm/s
	Post test speed	10 mm/s
	Distance	160 mm
	Data acquisition rate	200pps
	Load cell	5kg
Trigger	Type	Auto
	Force	0.4903 N

6.2.5.6 Análisis de extensibilidad de las tortillas

Las pruebas fueron realizadas con un Texturómetro TA XT plus (Stable Micro Systems, UK) y los resultados analizados con el software Texture Exponent 32. El aro de metal de la plataforma de seguridad se utilizó para sostener la tortilla en su lugar (Figura 8). La muestra sujeta se extendió hasta lograr la ruptura empleando una punta acrílica con forma de esfera para minimizar el desgarro de la tortilla. Se determinaron el módulo de deformación, fuerza máxima, trabajo y distancia de ruptura.

El proyecto y condiciones utilizadas para el análisis se muestran en la Tabla 5. Una gráfica típica del análisis de extensibilidad de las tortillas se muestra en el Apéndice VII, Figura 55

Tabla 5. Condiciones seleccionadas para el análisis de extensibilidad de las tortillas

Test mode	Measure force in compression: return to start	
Parameters	Settings	
	Pre test speed	5 mm/s
	Test speed	1mm/s
	Post test speed	5 mm/s
	Distance	30 mm
	Dataacquisition rate	200pps
	Load cell	5kg
Trigger	Type	Auto
	Force	0.05 N



Figura 8. Extensibilidad de tortilla

6.2.6 Diseño de experimentos

6.2.6.1 Diseño central compuesto

Para la determinación de la actividad endoamilolítica se emplearon en el diseño central compuesto 2 variables (pH y temperatura), con 6 repeticiones los puntos axiales y 5 en los centrales, con un total de 49 corridas, diseñado con el software Design Expert ver. 11 (Kingston, Ontario, Canadá). En la Tabla 6 se observan las combinaciones logradas con este diseño.

Tabla 6. Valores codificados y decodificados del diseño central compuesto utilizado para determinación de la actividad endoamilolítica

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	pH	Temperatura
1	+1	-1	10	55
2	+1	+1	10	75
3	+1	+1	10	75
4	+1	-1	10	55
5	+1	-1	10	55

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	pH	Temperatura
1	+1	-1	10	55
2	+1	+1	10	75
3	+1	+1	10	75
4	+1	-1	10	55
6	+1	-1	10	55
7	+1	-1	10	55
8	+2	-2	8.5	60
9	+2	-2	8.5	60
10	+2	-2	8.5	60
11	+2	-2	8.5	60
12	+2	-2	8.5	60
13	-2	+2	5.5	70
14	-2	+2	5.5	70
15	-2	+2	5.5	70
16	-2	+2	5.5	70
17	0	0	7	65
18	+1	-1	10	55
19	-1	-1	4	55
20	0	0	7	65
21	0	0	7	65
22	0	0	7	65
23	+2	+2	8.5	70
24	+2	+2	8.5	70
25	+2	+2	8.5	70
26	+2	+2	8.5	70
27	+2	+2	8.5	70
28	-1	-1	4	55
29	-1	-1	4	55
30	-1	+1	4	75
31	-1	+1	4	75
32	-1	-1	4	55
33	0	0	7	65
34	0	0	7	65
35	-1	+1	4	75

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	pH	Temperatura
1	+1	-1	10	55
2	+1	+1	10	75
3	+1	+1	10	75
4	+1	-1	10	55
36	-1	+1	4	75
37	-1	+1	4	75
38	+1	+1	10	75
39	+1	+1	10	75
40	+1	+1	10	75
41	-2	-2	5.5	60
42	-2	-2	5.5	60
43	-2	+2	5.5	70
44	-2	-2	5.5	60
45	-2	-2	5.5	60
46	+2	-2	8.5	60
47	-2	-2	5.5	60
48	-2	-2	5.5	60
49	+1	+1	10	75

En el caso de la determinación de la actividad proteolítica sobre gluten de trigo y caseína, se empleó el mismo diseño, con las mismas variables y analizadas con el mismo software, con 4 repeticiones en todos los puntos, con un total de 36 corridas. En la Tabla 7 se observan las combinaciones logradas con este diseño.

Tabla 7. Valores codificados y decodificados del diseño central compuesto utilizado para determinación de la actividad proteolítica

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	Temperatura	pH
1	2	-2	70	5
2	-2	-2	60	5
3	-2	-2	60	5
4	-2	2	60	8
5	-2	-2	60	5
6	2	-2	70	5

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	Temperatura	pH
1	2	-2	70	5
2	-2	-2	60	5
3	-2	-2	60	5
4	-2	2	60	8
5	-2	-2	60	5
6	2	-2	70	5
7	2	2	70	8
8	2	-2	70	5
9	2	-2	70	5
10	-2	2	60	8
11	-2	2	60	8
12	-2	2	60	8
13	0	0	65	6.5
14	2	2	70	8
15	2	2	70	8
16	2	2	70	8
17	1	-1	75	4
18	1	-1	75	4
19	1	-1	75	4
20	-1	-1	55	4
21	-1	-1	55	4
22	-1	1	55	9
23	0	0	65	6.5
24	0	0	65	6.5
25	1	1	75	9
26	0	0	65	6.5
27	-1	-1	55	4
28	-1	1	55	9
29	-1	1	55	9
30	1	1	75	9
31	1	1	75	9
32	-1	1	55	9
33	1	1	75	9
34	1	-1	75	4

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	Temperatura	pH
1	2	-2	70	5
2	-2	-2	60	5
3	-2	-2	60	5
4	-2	2	60	8
5	-2	-2	60	5
6	2	-2	70	5
35	-2	-2	60	5
36	-1	1	55	4

6.2.6.2 Diseño factorial completo

Con el fin de aleatorizar y determinar el efecto del ECC sobre la masa y tortillas formuladas se empleó un diseño factorial completo con 2 factores (Temperatura y cantidad de ECC añadido), 2 réplicas y 4 puntos centrales, con un total de 12 corridas. En la Tabla 8 se observan las combinaciones logradas con este diseño.

Tabla 8. Valores codificados y decodificados del diseño factorial completo utilizado para la formulación de las masas para las tortillas

Corrida	Variables codificadas		Variables decodificadas	
	A	B	Temperatura	ppm ECC
1	+	+	45	300
2	-	+	30	300
3	+	-	45	80
4	+	-	45	80
5	0	0	37.5	190
6	-	+	30	300
7	0	0	37.5	190
8	-	-	30	80
9	0	0	37.5	190
10	-	-	30	80
11	0	0	37.5	190
12	+	+	45	300



6.2.7 Análisis estadístico

Los resultados de actividad endoamilolítica y proteolítica fueron analizados mediante superficie de respuesta con el software Design Expert ver. 11 (Kingston, Ontario, Canadá).

Los análisis de las respuestas de la formulación de la masa y tortillas del factorial completo se realizaron por medio del software Minitab 18.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis proximal de las bayas de *S. elaeagnifolium*

Los contenidos de humedad, grasa, cenizas y proteína de las bayas de trompillo se muestran en la Tabla 9. El pH de la muestra representativa de bayas fue 4.88. Se puede rescatar de los resultados de humedad un porcentaje notablemente mayor en las muestras recolectadas en la presente investigación (41.49%) en comparación con Carballo (5.14%) y Chávez (4.9%), probablemente debido a una recolección temprana de las muestras. Inicialmente un alto porcentaje de humedad podría inducir una rápida descomposición de las muestras, sin embargo, este riesgo fue reducido al secar y congelar las bayas para la posterior extracción del complejo de interés. El porcentaje de grasa se fue superior a la investigación de Chávez et al. (0.559%) y menor a la investigación de Carballo-Carballo (3.57%). Los resultados de fibra muestran diferencia entre una investigación y otra, encontrándose en mayor cantidad en la investigación de Chávez-Garay (51.78%), en menor cantidad en la evaluación de Carballo (34.99%) y menor aún en la presente investigación (20.11%). El porcentaje de nitrógeno total o proteína se encontró en mayor cantidad en la investigación de Chávez-Garay (16.27%) y en cantidad similar a las bayas recolectadas por Carballo y colaboradores (13.58%) con un total de 13.71% en la investigación presente. Aunque todas las bayas fueron recolectadas en el estado de Chihuahua (Meoqui, Chih., y Chihuahua, Chih.), la diferencia en los resultados del análisis proximal podría estar relacionado tanto a las diferentes etapas de maduración de las bayas, así como las diferentes áreas donde éstas fueron colectadas por el equipo de investigación.

Tabla 9. *Análisis proximal de bayas de S. elaeagnifolium var. Cavanilles*

Parámetro (%)	Chávez et al. 2013	Carballo et al. 2015	Presente investigación 2018
Humedad	4.90 ± 0.32	5.14 ± 0.05	41.49 ± 2.21
Cenizas	6.78 ± 0.54	5.93 ± 0.31	4.21 ± 0.32
Grasa	0.559 ± 0.11	3.57 ± 0.31	1.14 ± 0.05
Fibra	51.78 ± 3.35	34.99 ± 0.58	20.11 ± 0.93
Proteína	16.27 ± 1.28	13.58 ± 0.045	13.71 ± 0.20
Carbohidratos*	19.7	36.79	19.34

**Obtenido por diferencia, ± desviación estándar*

7.2 Análisis proximal de harina de trigo refinada

Los contenidos de humedad, grasa, cenizas y proteína de la harina de trigo se muestran en la Tabla 10. La estimación de la cantidad de humedad (8.98%) coincide con los datos obtenidos en la bibliografía consultada, que la sitúa entre un 9 a un 12% (Muñoz de Chávez et al., 2010). El porcentaje de grasa es 0.59%, superior al promedio de Muñoz de Chávez y Pérez-Lizaur (0.314-0.44%). Los resultados de fibra se encuentran dentro del rango descrito por Pérez-Lizaur. El porcentaje de nitrógeno total o proteína se encuentra en mayor cantidad según la presente investigación (11.01%) en comparación con la composición reportada por Muñoz de Chávez (9.5-10%), que es de esperarse al no encontrarse formulada para su uso inmediato, siendo una harina industrial.

Tabla 10. *Análisis proximal Harina de trigo*

Parámetro	Porcentaje		
	Muñoz de Chávez (2010)	Pérez-Lizaur (2014)	Presente investigación
Humedad	12	-	8.98±0.175
Cenizas	0.314-0.44	-	0.59±0.006
Grasa	1.1	1	1.10±0.044
Fibra	0.3	2.5	2.13±0.089
Proteína	8.2	10.5	11.01±0.46
Carbohidratos	77.8	76.5	76.18*
*Obtenido por diferencia			

7.3 Rendimientos en la obtención de EC y ECC

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la extracción y concentración del extracto crudo de las bayas de *S. elaeagnifolium*. De los 20.008g de harina, se obtuvieron 128mL de EC y 5.2mL de ECC. Se muestra un 25% de rendimiento a partir del peso inicial de la harina, ligeramente inferior al encontrado en la extracción de Carballo-Carballo, con un 29% a partir del peso inicial. Es importante mencionar que en los 5.2mL de volumen total se encuentra un complejo de enzimas y agua, entre las cuales se encuentran enzimas proteolíticas, amilolíticas y probablemente lipolíticas y proteínas estructurales propias de la materia vegetal.

Tabla 11. Resultados de la extracción y concentración del extracto crudo de las bayas de *S. elaeagnifolium*.

	Carballo-Carballo (2015)	Presente investigación
Extracto Crudo		
Peso de la harina (g)	42.35	20.008
Buffer de acetato de sodio ¹ (mL)	381.17	180
Volumen total ²	423.52	200.008
Filtrado ³	378.16	128
Contenido de proteína (mg/mL)	3.6	2.06
Extracto Crudo Concentrado		
Volumen Total (mL) ⁴	12.16	5.2
Contenido de proteína (mg/mL)	7.8	8.16

¹ Solución amortiguadora de acetato de sodio 50mM pH5

² Volumen obtenido de la mezcla de harina y solución amortiguadora (1:10)

³ Volumen obtenido después de filtrar el volumen total a través de los filtros Milipore de 0.45 µm

⁴ Volumen obtenido después de concentrar el filtrado en tubos Centricones de 9kDa

7.4 Cuantificación de proteína.

En la Tabla 11 se observan los resultados de la cuantificación de proteína por método Bradford, en la figura 9 se observa una comparación de la presente investigación con los resultados obtenidos por Chávez et al., Y Carballo-Carballo:

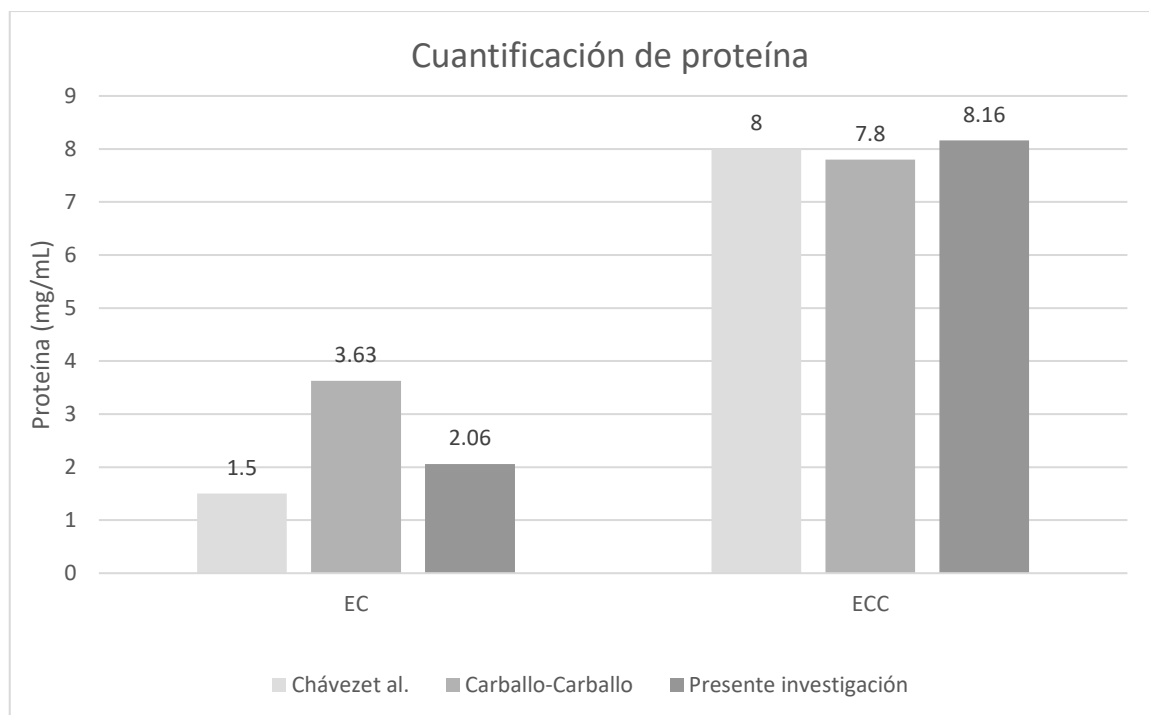


Figura 9. Proteína en EC y ECC cuantificada por método Bradford

7.5 Determinación de la actividad proteolítica del ECC utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En las figuras 10 y 11 se pueden observar los resultados del análisis de actividad proteolítica del ECC sobre gluten de trigo, evaluado a 55, 60, 65, 70 y 75°C y variando el pH entre 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Los resultados del gráfico muestran un interesante incremento en la actividad a medida que aumentan la temperatura y el pH, mostrando la mayor actividad proteolítica a 75°C y pH 9. Garg y colaboradores mencionan el incremento en la hidrólisis de gluten al aumentar la temperatura, produciendo ensayos a 80°C (Garg, Cran, & Mishra, 2019). Carballo-Carballo reportó una disminución de la actividad proteolítica del extracto conforme incrementaba la temperatura, sin embargo, esta no se ve inhibida en temperaturas incluso mayores (hasta 95°C). Asimismo, se muestra en la figura 10 un incremento en la actividad proteolítica en la mínima temperatura y pH (55°C, pH 4), reportando Carballo-Carballo una similitud en el aspecto de la temperatura, encontrando mayor actividad colagenolítica en las mínimas temperaturas de ensayo (4 y 65°C) y Garg reportando un incremento en la actividad proteolítica sobre gluten de trigo conforme disminuye el pH. El extremo de temperatura mínima y pH máximo (55°C y pH9) muestra un decremento inesperado en la actividad proteolítica sobre gluten de trigo, ya que se esperaba una alta

solubilidad de gluten a pH alcalino y una alta actividad proteolítica a temperaturas menores. Inicialmente, al tratarse de un extracto crudo y encontrar actividad a diferentes rangos de pH y temperaturas se puede concluir que se trata de varias proteasas y no de sólo una, sin embargo, al variar la solubilidad del gluten dependiendo del pH de la solución, serían necesarias pruebas subsecuentes para analizar el efecto del pH sobre el complejo enzimático de *S. elaeagnifolium*.

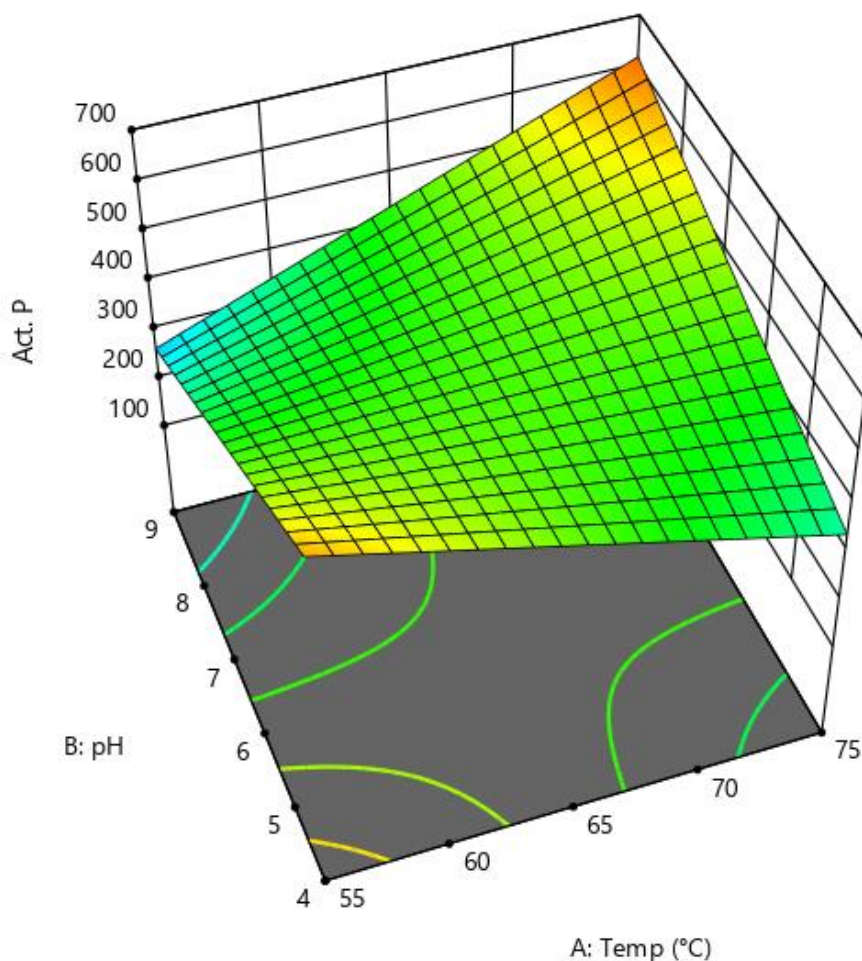


Figura 10. Actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre gluten de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-9) Vista 3D

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Act. P

(adjusted for curvature)

168.889 673.807

X1 = A: Temp

X2 = B: pH

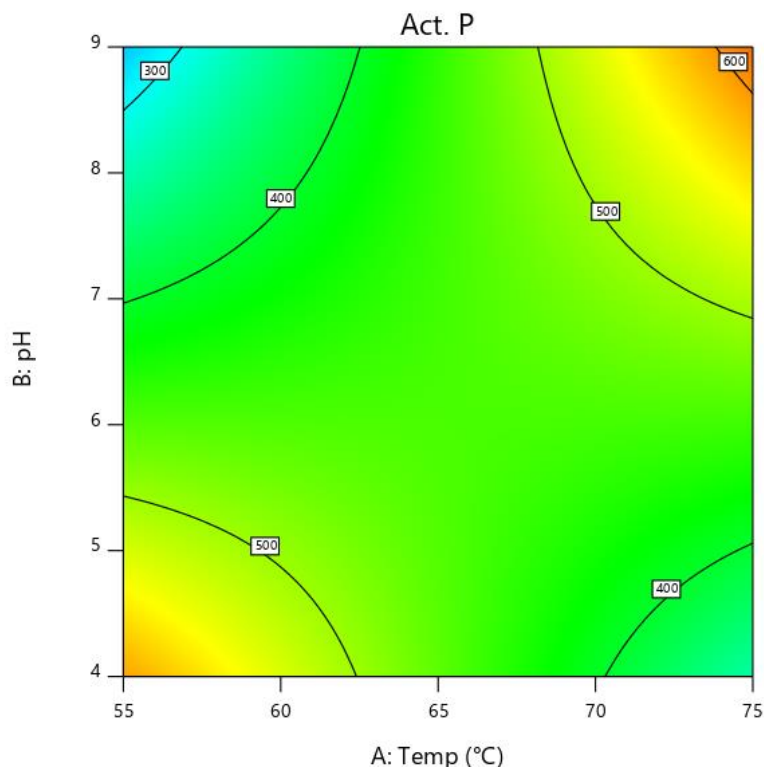


Figura 11. Actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre gluten de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-9), gráfica de contornos

El análisis estadístico revela que el modelo es significativo (valor $p < 0.05$), y tanto temperatura como la combinación de los factores de temperatura y pH son significativos ($p < 0.05$), con una r^2 de 0.8506, según los resultados encontrados en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis estadístico Actividad proteolítica *S. elaeagnifolium* sobre gluten de trigo

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	4.168E+05	3	1.389E+05	58.82	< 0.0001
A-Temp	12662.30	1	12662.30	5.36	0.0274
B-pH	2960.01	1	2960.01	1.25	0.2715
AB	4.012E+05	1	4.012E+05	169.86	< 0.0001
Curvature	2.094E+05	1	2.094E+05	88.64	< 0.0001
Residual	73220.71	31	2361.96		
Lack of Fit	63565.73	4	15891.43	44.44	< 0.0001
Pure Error	9654.98	27	357.59		
Cor Total	6.994E+05	35			

En la Figura 12 se pueden observar los efectos de los factores analizados, el incremento de la temperatura tiene un efecto positivo en la actividad proteolítica de la enzima y el pH tiende a disminuir el efecto sobre el gluten de trigo, según el análisis.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Act. P
(adjusted for curvature)

Actual Factors
A: Temp = 65
B: pH = 6.5

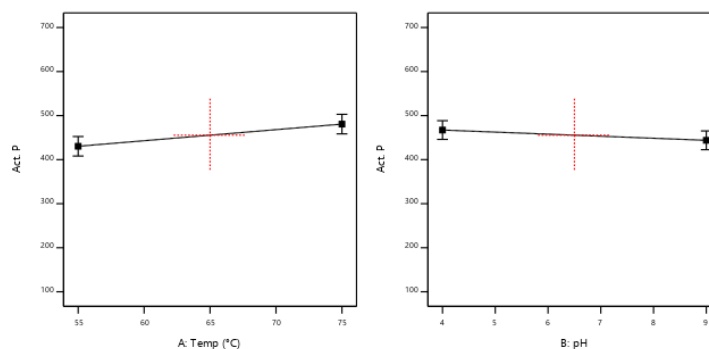


Figura 12. Interpretación del efecto de los factores (A) temperatura y (B) pH en el análisis de actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre gluten de trigo

Con el fin de minimizar el sesgo por causa de la poca solubilidad de gluten de trigo en agua, se realizó un análisis de proteína solubilizada a diferentes pH (2, 4, 6, 8, 10 y 12) por método Bradford, cuyos resultados se pueden observar en la Figura 13. Se observa el comportamiento de la proteína según la bibliografía, mostrando el incremento en la solubilidad del gluten en las soluciones ácidas y alcalinas, y la disminución en la solubilidad conforme se acerca a pH neutro y el punto isoeléctrico del gluten (7.5), así como una creciente solubilización del gluten al homogenizar la solución parcialmente a 6500rpm por espacio de 30 segundos, obteniendo hasta 14 mg de proteína por mililitro de solución, en comparación de un máximo de 11.2mg/mL previo a la homogenización parcial.

Gluten soluble

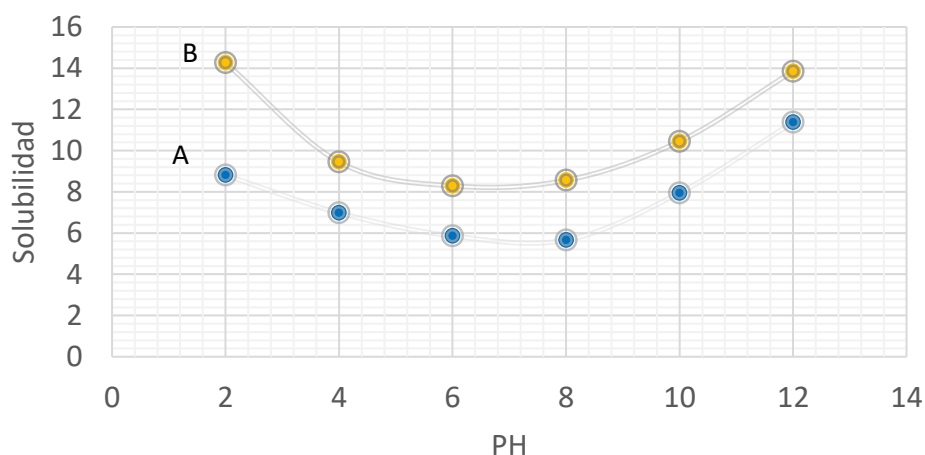


Figura 13. Resultados del análisis de proteína por método Bradford en soluciones con gluten de trigo en un rango de pH, (A) previo a una homogenización parcial y (B) homogenizado parcialmente a 6500rpm por 30 segundos

7.4.1 Actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre caseína

Se determinó analizar el efecto de las bayas sobre caseína ya que esta tiene una mejor solubilidad en agua comparado al gluten de trigo, cuyos resultados se pueden observar en las Figuras 14 y 15. El extracto muestra una actividad similar al ensayo sobre gluten de trigo, donde se muestra la mayor actividad proteolítica en los extremos de mayor temperatura (75°C) y pH alcalino (10), y el menor efecto de la enzima sobre la proteína en la menor temperatura (55°C) y pH ácido (4).

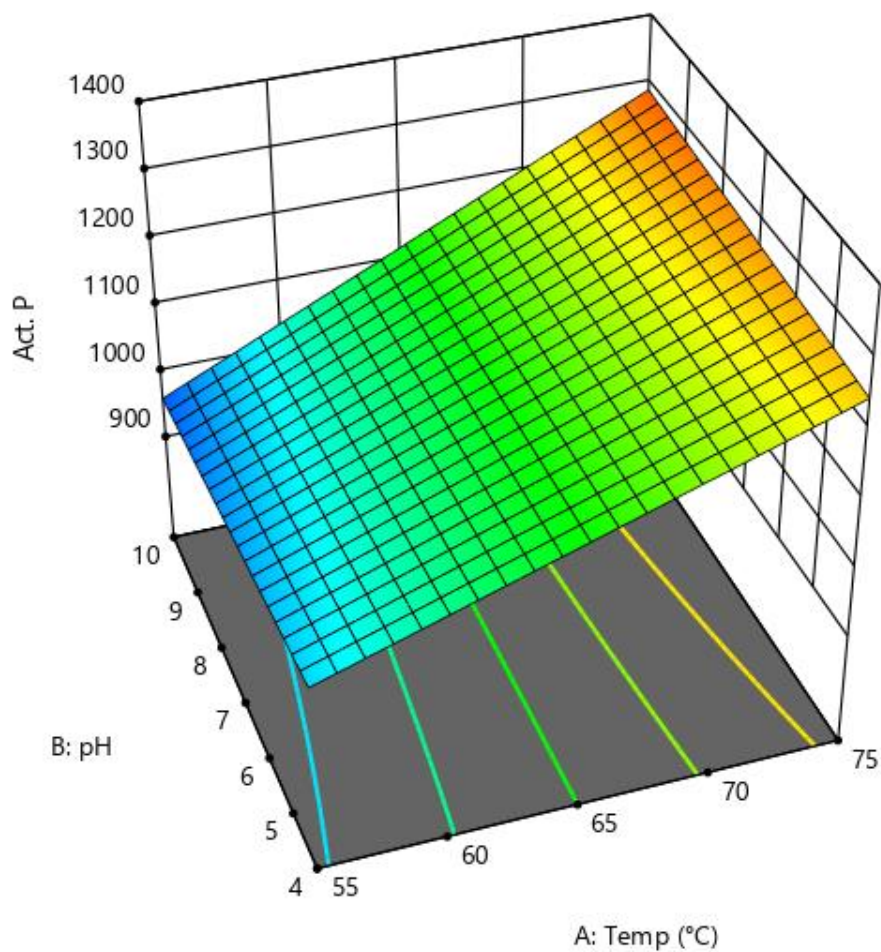


Figura 14. Actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre caseína con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10) Vista 3D

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Act. P
(adjusted for curvature)
924.577 1327.77

X1 = A: Temp
X2 = B: pH

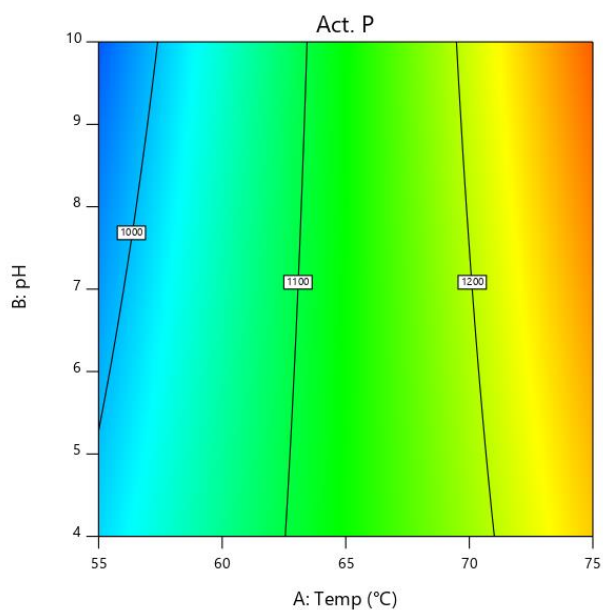


Figura 15. Actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre caseína con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10), gráfica de contornos

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la Tabla 13. El análisis sugiere que el modelo es significativo ($p < 0.05$). Al igual que en el análisis sobre gluten de trigo, el factor de temperatura y la combinación de los factores de temperatura y pH son significativos ($p < 0.05$) con una r^2 de 0.9186

Tabla 13. Análisis estadístico de la actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre caseína

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	4.624E+05	3	1.541E+05	90.25	< 0.0001
A-Temp	4.596E+05	1	4.596E+05	269.10	< 0.0001
B-pH	52.82	1	52.82	0.0309	0.8619
AB	12735.96	1	12735.96	7.46	0.0117
Curvature	35248.04	1	35248.04	20.64	0.0001
Pure Error	40987.26	24	1707.80		
Cor Total	5.386E+05	28			

En la Figura 16 se observan por separado los efectos de temperatura (A) y pH (B) sobre la enzima en la proteína. Se señala el incremento de la actividad a la par que aumenta la temperatura, en contraste con el efecto del pH, que parece tener de ninguno a ligeramente negativo impacto sobre la proteasa y la hidrólisis de la proteína.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Act. P
(adjusted for curvature)

Actual Factors
A: Temp = 65
B: pH = 7

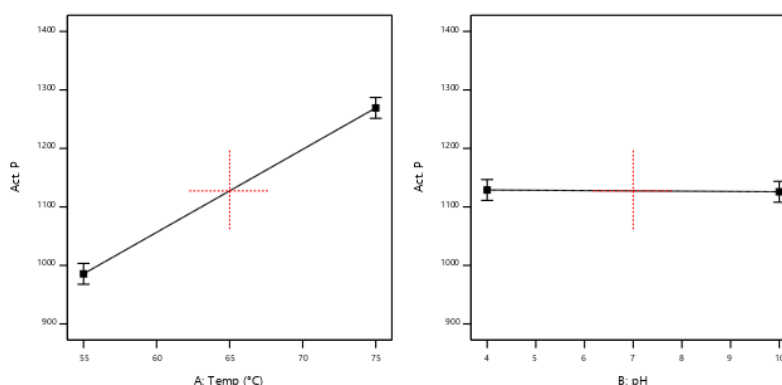


Figura 16. Interpretación del efecto de los factores (A) temperatura y (B) pH en el análisis de actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre caseína

7.5 Determinación de actividad endoamilolítica *in vitro*.

Los resultados del análisis del extracto para determinar si contiene amilasas activas se pueden observar en las Figuras 17 y 18. Ya que la unidad de actividad

endoamilolítica se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1.0mg de almidón por minuto, bajo las condiciones del ensayo, los mejores resultados de la amilasa se reflejan en el extremo de pH mínimo y temperatura máxima (pH4, 75°C), donde se requiere 1.54mg de enzima para la hidrólisis de 1.0mg de almidón por minuto.

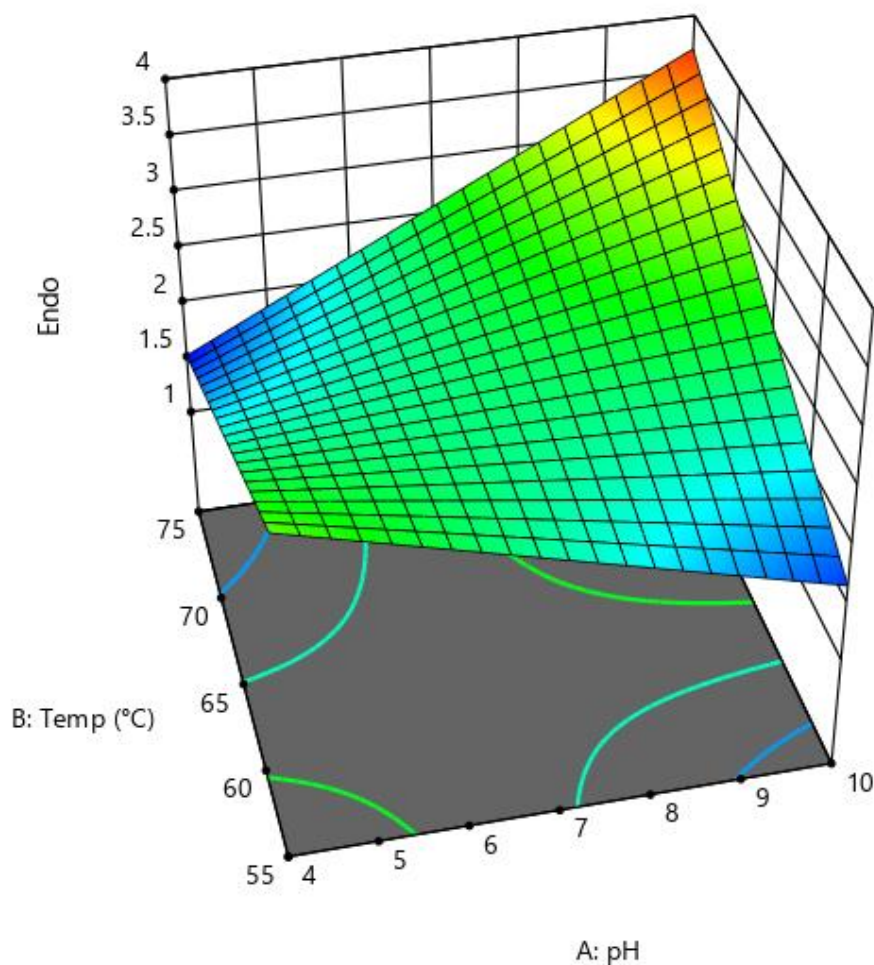


Figura 17. Actividad endoamilolítica de *S. elaeagnifolium* sobre almidón de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10) Vista 3D

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Endo

(adjusted for curvature)

1.54982 3.82697

X1 = A: pH

X2 = B: Temp

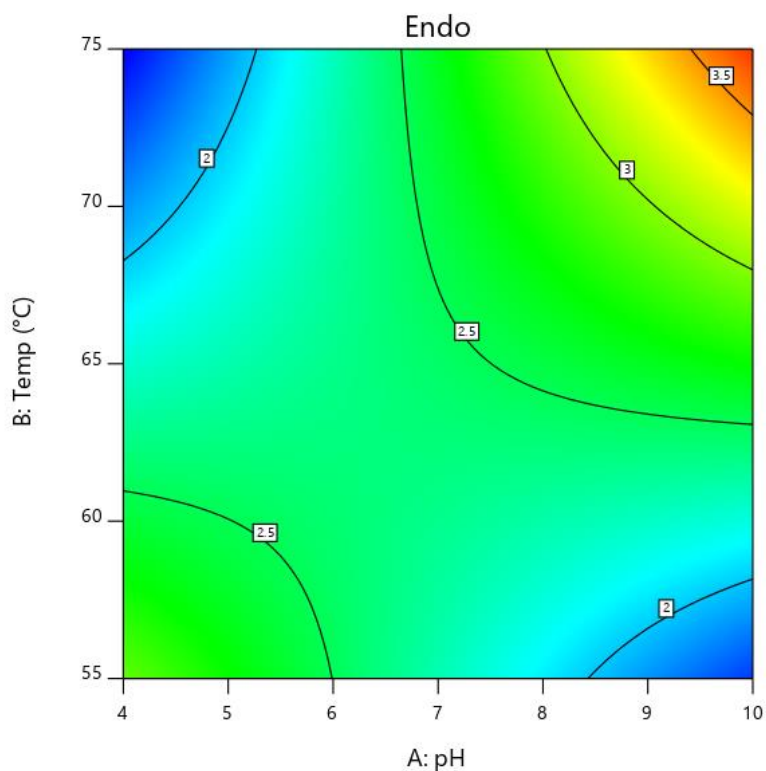


Figura 18. Actividad endoamilolítica de *S. elaeagnifolium* sobre almidón de trigo con variaciones de temperatura (55-75°C) y pH (4-10), gráfica de contornos

Los resultados del análisis estadístico se encuentran resumidos en la Tabla 14. El modelo se determinó como significativo ($p < 0.5$), y tanto los factores de temperatura y pH como la combinación de estos se mostraron significativos ($p < 0.05$) sobre la actividad de la amilasa contenida en las bayas de *S. elaeagnifolium*.

Tabla 14. Análisis estadístico de la actividad proteolítica de *S. elaeagnifolium* sobre almidón de trigo

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	18.09	3	6.03	183.61	< 0.0001
<i>A-pH</i>	1.41	1	1.41	42.88	< 0.0001
<i>B-Temp</i>	0.7017	1	0.7017	21.36	< 0.0001
<i>AB</i>	15.30	1	15.30	465.81	< 0.0001
<i>Curvature</i>	1.89	1	1.89	57.66	< 0.0001
Residual	1.41	43	0.0328		
<i>Lack of Fit</i>	0.6202	4	0.1550	7.63	0.0001
<i>Pure Error</i>	0.7923	39	0.0203		
Cor Total	21.40	47			

En la ilustración 19 se puede observar la interacción de los factores (A) pH y (B)temperatura y su efecto sobre la actividad amilolítica de la enzima. Cuando el ensayo se produce a 55°C y a pH bajo, la actividad se disminuye, contrario a 55°C y pH alcalino. Al incrementar la temperatura a 75°C, se observa un efecto opuesto, donde pH ácido incrementa la efectividad de la enzima y un pH alcalino disminuye la actividad.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Endo
(adjusted for curvature)

X1 = A: pH
X2 = B: Temp

■ B- 55
▲ B+ 75

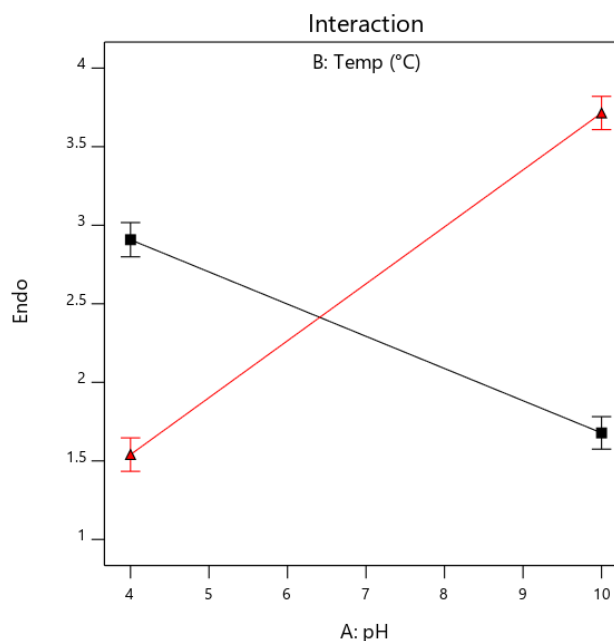


Figura 19. Interacción de los factores (A) pH y (B) Temperatura en el análisis de actividad endoamilolítica de *S. elaeagnifolium* sobre almidón de trigo

La interpretación de los efectos de los factores individuales se observa en la Figura 20. El pH (A) y la temperatura (B) tienen un comportamiento similar al incrementar, creciendo la actividad amilolítica en ambos casos.

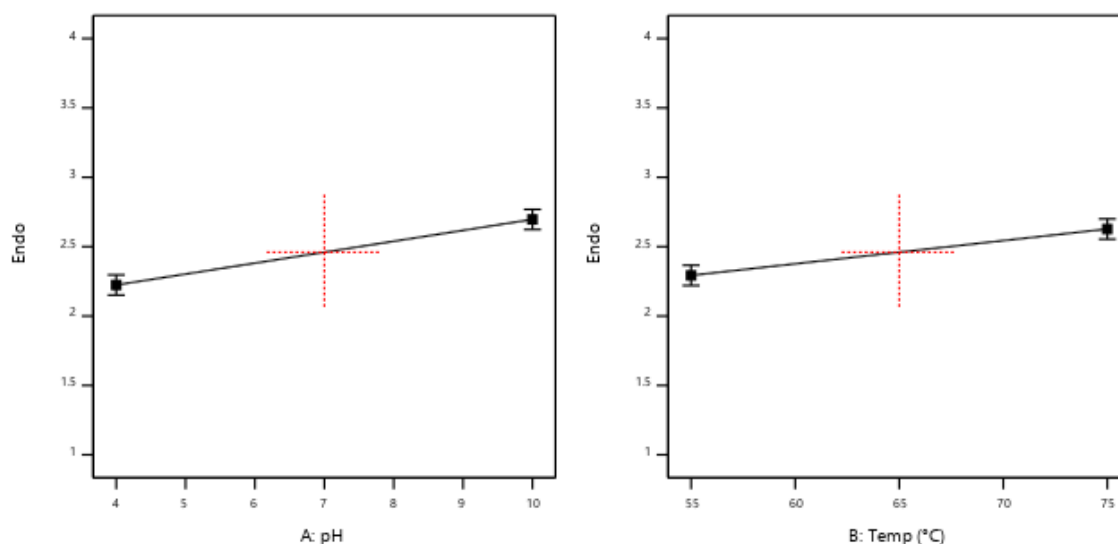


Figura 20. Interpretación del efecto de los factores (A) pH y (B) Temperatura en el análisis de actividad endoamilolítica de *S. elaeagnifolium* sobre almidón de trigo

7.6 Formulación de la masa y tortillas

En la Tabla 15 se observan los resultados de la cuantificación de proteína por método Bradford y el ensayo de actividad proteolítica del extracto empleado en la formulación de las tortillas, analizado por la metodología modificada de McDonald et.al. (Freundt, 1983) del extracto empleado en la formulación de la masa y tortillas.

Tabla 15. Resultados actividad proteolítica y amilolítica por miligramo de proteína de ECC de *Solanum Elaeagnifolium*

Proteína ECC mg/ml	Actividad Proteolítica /mg P	Actividad Endoamilolítica /mg P
4.82	1041.28	1.3375

7.7 Análisis de la masa y tortillas

7.7.1 Análisis de perfil de textura de la masa (TPA)

Los resultados del análisis de perfil de textura se observan en la Tabla 16. Se incluyen los valores de Dureza, cohesividad, adhesividad y esponjosidad. Una

curva de perfil de textura típica para masa de harina de trigo se muestra en el Apéndice IV, Figura 61.

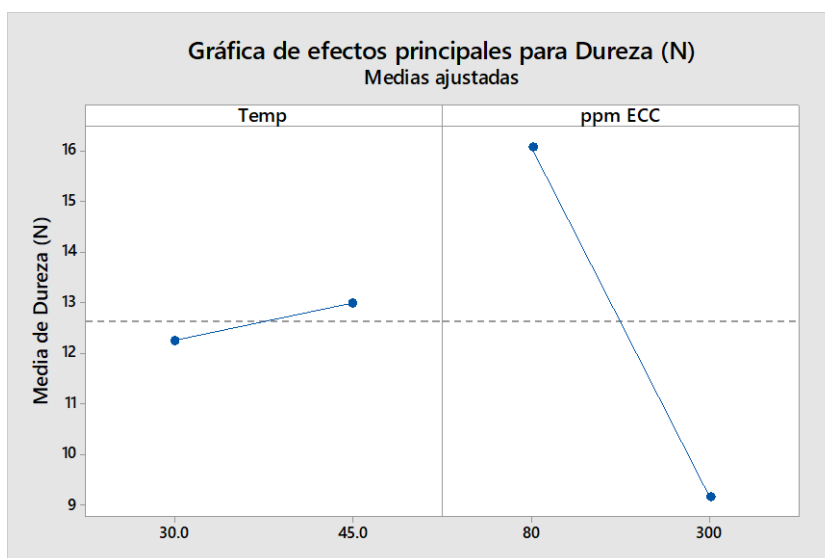
Tabla 16. Resultados del análisis de perfil de textura (TPA). B1, 2 y 3 control sin adición de ECC; G1, 2 y 3 harina comercial sin adición de ECC

Orden Corrida	Temp °C	ppm ECC	Muestra	Dureza (N)	Cohesividad	Adhesividad (N/s)	Esponjosidad (mm)
	30	0	B1	7.42±1.87	0.177±.01	0.08325±0.014	2.032±0.16
	37.5	0	B2	11.23 ± 1.51	0.187± .01	0.01125±0.005	2.674±0.38
	45	0	B3	8.241 ± 1	0.253 ±.01	0.12025±0.004	3.004±0.25
1	45	300	1	7.914 ± 0.44	0.189±0.1	0.0974±0.005	2.138±0.02
2	30	300	2	6.256 ±0.87	0.184±0.03	0.0304±0.001	2.244±0.21
3	45	80	3	15.575 ± 1.77	0.233±0.02	0.0944±0.009	2.286±0.15
4	45	80	4	15.441± 1.67	0.25±0.03	0.3112±0.01	2.456±0.35
5	37.5	190	5	11.391 ± 10.5	0.216±0.02	0.203±0.07	2.398±0.28
6	30	300	6	9.506 ± 0.38	0.149±0.004	0.0468±0.002	1.814±0.15
7	37.5	190	7	11.635 ± 1.18	0.193±0.02	0.1312±0.004	2.162±0.21
8	30	80	8	15.177 ± 1.57	0.19±0.02	0.0616±0.01	2.205±0.21
9	37.5	190	9	11.325 ± 1.47	0.169±0.01	0.1572±0.03	2.328±0.26
10	30	80	10	17.996 ± 2.34	0.205±0.07	0.32733±0.003	1.782±0.05
11	37.5	190	11	16.302 ± 2	0.152±0.01	0.0842±0.002	1.755±0.21
12	45	300	12	12.925 ± 1.37	0.267±0.02	0.3948±0.01	2.697±0.04
	30	0	G1	13.283 ± 1.15	0.233±0.02	0.1844±0.09	3.253±0.26
	37.5	0	G2	11.977 ± 1.16	0.241±0.02	0.1756±0.01	2.993±0.03
	45	0	G3	19.593 ± 1.85	0.258±0.02	0.3102±0.01	2.833±0.03

Las masas con menor cantidad de ECC fueron significativamente más duras (16.04 N) que las masas con más partes por millón según el análisis estadístico (9.15 N) ($p<0,05$) (Tabla 17). Esto hizo que las primeras fueran menos maleables, y hubo dificultad para dividir y redondear en relación con las masas tratadas con mayor cantidad de ECC, notando la diferencia al tacto y posteriormente al proceder con el análisis de textura. De manera general, se observa un comportamiento ligeramente al alza en los valores de dureza a medida que la temperatura incrementa, mientras que, de manera individual, esto solo sucede en las masas tratadas con 300ppm de ECC, observándose un efecto contrario en masas tratadas con 80ppm (Figuras 21 y 22).

Tabla 17. Análisis de Varianza Dureza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	102.744	34.2481	6.93	0.013
Lineal	2	96.203	48.1015	9.73	0.007
Temp	1	1.066	1.0658	0.22	0.655
ppm ECC	1	95.137	95.1372	19.25	0.002
Interacciones de 2 términos	1	6.541	6.5413	1.32	0.283
Temp*ppm ECC	1	6.541	6.5413	1.32	0.283
Error	8	39.537	4.9421		
Curvatura	1	0.011	0.0111	0.00	0.966
Error puro	7	39.526	5.6466		
Total	11	142.281			


Figura 21. Gráfica de efectos principales para Dureza.

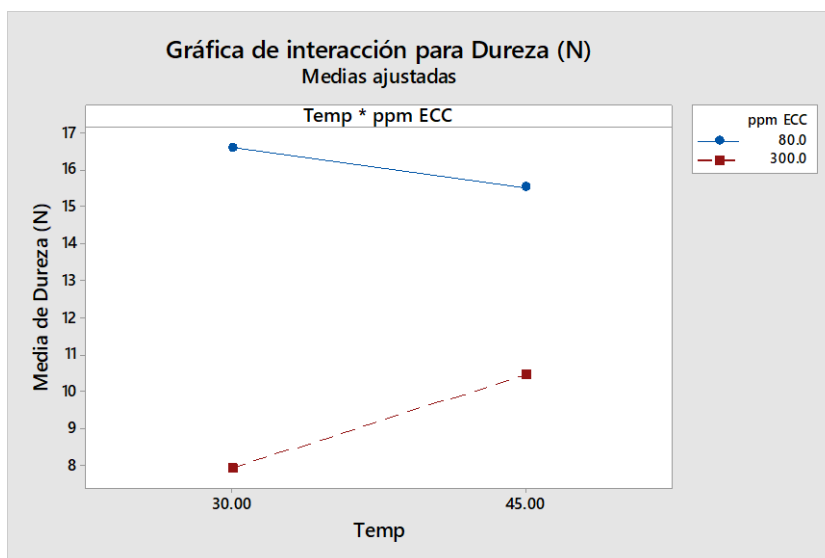


Figura 22. Gráfica de interacción para Dureza

Ya que la cohesividad consiste en determinar la resistencia que opone la masa a separarse o romperse cuando es aplanada en una tortilla, este parámetro se vuelve de importancia para el análisis de la formulación. Los resultados de cohesividad de las masas revelaron un incremento estadísticamente significativo en la cohesividad de las masas directamente relacionado al incremento de la temperatura de reposo ($p < 0.05$) (Tabla 18, Figuras 23 y 24).

Tabla 18. Análisis de varianza de Cohesividad

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.006708	0.002236	2.22	0.163
Lineal	2	0.006555	0.003278	3.26	0.092
Temp	1	0.005565	0.005565	5.54	0.046
ppm ECC	1	0.000990	0.000990	0.98	0.350
Interacciones de 2 términos	1	0.000153	0.000153	0.15	0.707
Temp*ppm ECC	1	0.000153	0.000153	0.15	0.707
Error	8	0.008042	0.001005		
Curvatura	1	0.001785	0.001785	2.00	0.200
Error puro	7	0.006257	0.000894		
Total	11	0.014750			

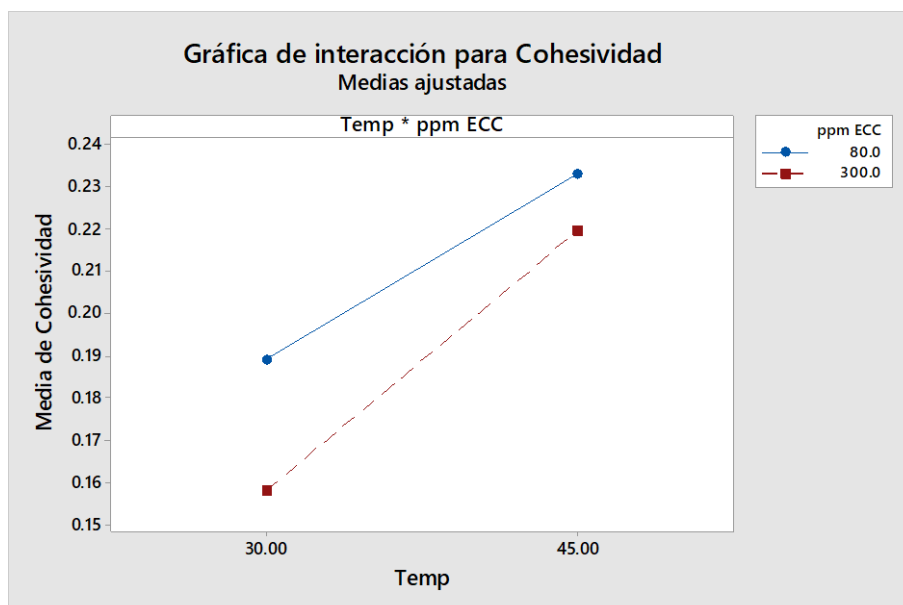


Figura 23. Gráfica de interacción para Cohesividad

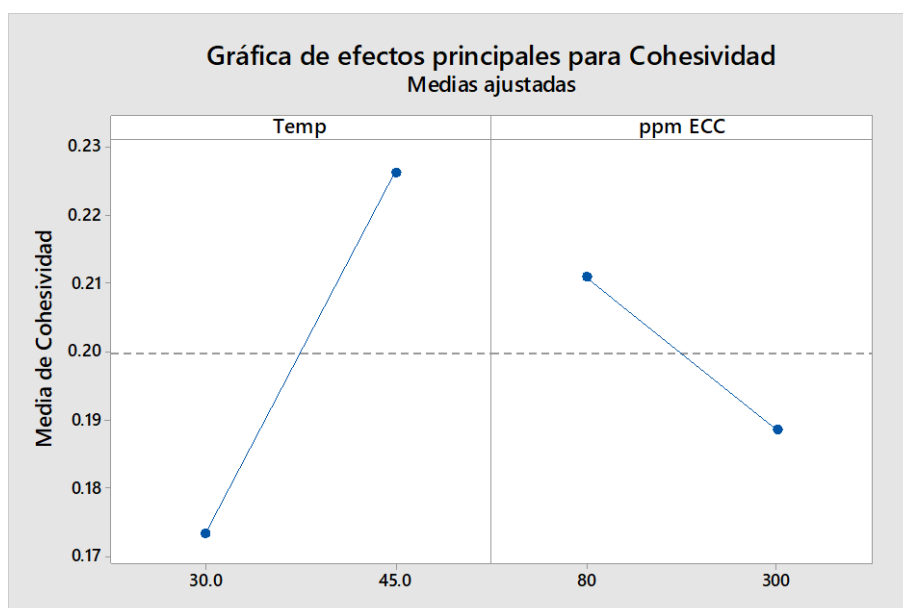


Figura 24. Gráfica de efectos principales para Cohesividad

La adhesividad es una propiedad de textura que evalúa el esfuerzo necesario para apartar la superficie del alimento de otra superficie (típicamente la lengua, dientes, o en este caso, a la plancha o rodillo para aplanar y dar la forma de tortilla). Los resultados del análisis estadístico se muestran en la Tabla 19. El análisis muestra un incremento en la adhesividad a la par del incremento de la temperatura de reposo, y un decremento en esta propiedad a medida que aumenta la cantidad de ECC agregado (Figura 25). Sin embargo, la gráfica de interacción para adhesividad muestra un incremento de la adhesividad en

aquellas masas con 300ppm de ECC a medida que la temperatura de reposo incrementó (Figura 26).

Tabla 19. *Análisis de varianza de Adhesividad*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.049461	0.016487	1.17	0.379
Lineal	2	0.029628	0.014814	1.05	0.392
Temp	1	0.023292	0.023292	1.66	0.234
ppm ECC	1	0.006335	0.006335	0.45	0.521
Interacciones de 2 términos	1	0.019833	0.019833	1.41	0.269
Temp*ppm ECC	1	0.019833	0.019833	1.41	0.269
Error	8	0.112446	0.014056		
Curvatura	1	0.001886	0.001886	0.12	0.740
Error puro	7	0.110560	0.015794		
Total	11	0.161907			

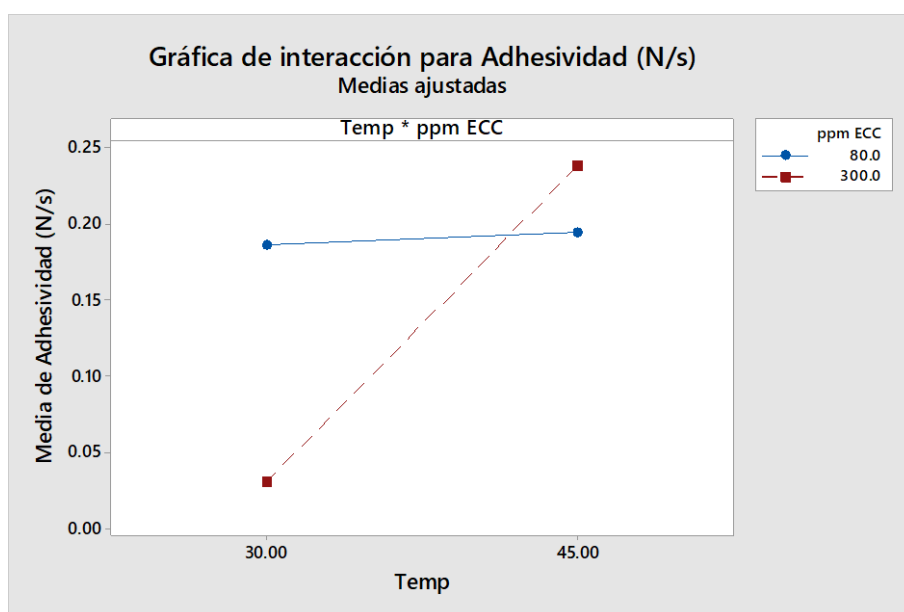


Figura 25. *Gráfica de interacción para Adhesividad*

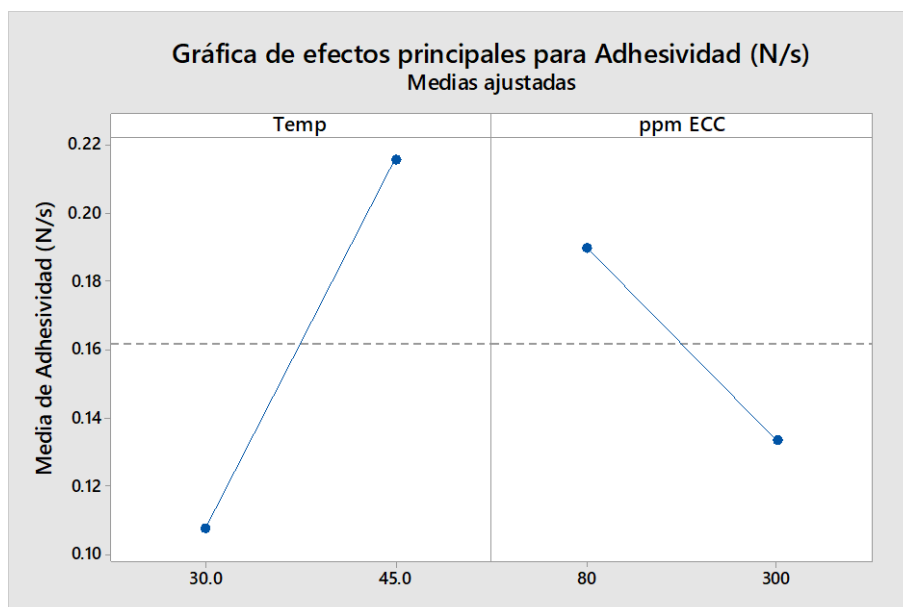


Figura 26. Gráfica de efectos principales para Adhesividad

En la prueba de esponjosidad se analiza la deformación de la masa por su compresión, es por eso que se encuentran los resultados en una medida de altura (mm) (Tabla 16). El análisis estadístico de los resultados (Tabla 20) determinó un incremento sinérgico de la esponjosidad tanto con el incremento de la temperatura (30-45°C) como con el incremento de ECC añadido a la formulación (80-300ppm) de 1.78mm a 2.69mm. Estos resultados indican una menor altura del cilindro de masa al inicio de la segunda compresión en comparación con aquella al inicio de la primera compresión, posiblemente debido al efecto de la proteasa concentrada en el extracto de trompillo sobre las redes de gluten formadas en la masa después de la formulación de la masa y hasta el final del tiempo de reposo.

Tabla 20. Análisis de varianza Esponjosidad

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.296800	0.098933	1.31	0.338
Lineal	2	0.296740	0.148370	1.96	0.203
Temp	1	0.293378	0.293378	3.87	0.085
ppm ECC	1	0.003362	0.003362	0.04	0.838
Interacciones de 2 términos	1	0.000060	0.000060	0.00	0.978
Temp*ppm ECC	1	0.000060	0.000060	0.00	0.978
Error	8	0.606204	0.075775		
Curvatura	1	0.004704	0.004704	0.05	0.822
Error puro	7	0.601500	0.085929		
Total	11	0.903004			

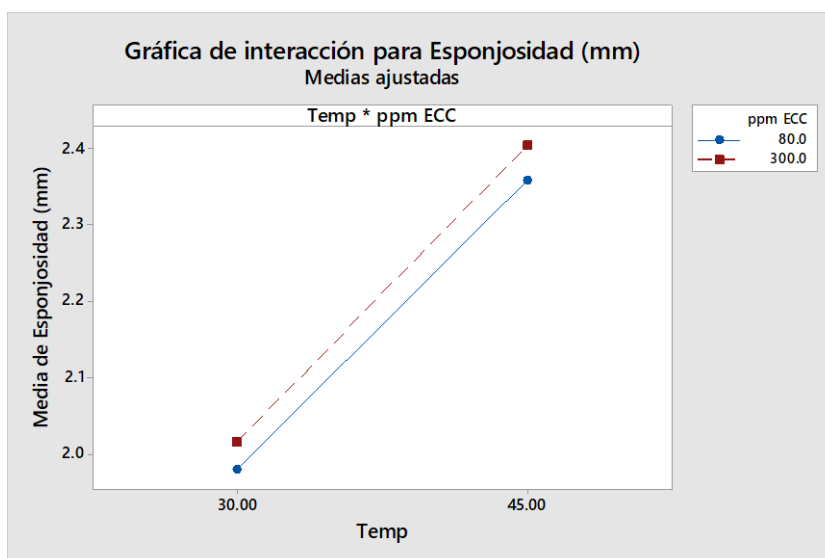


Figura 27. Gráfica de interacción para Esponjosidad

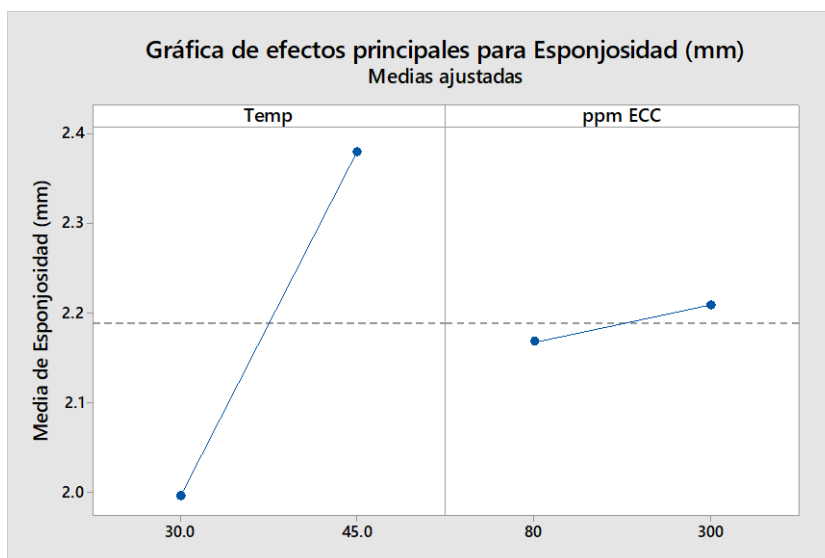


Figura 28. Gráfica de efectos principales para Esponjosidad

7.7.2 Análisis de extensibilidad de la masa

Los resultados del análisis de extensibilidad de las masas se muestran en las Figuras 29 y 30. Una curva típica para análisis de extensibilidad se muestra en el apéndice V, Figura 62. En general, la fuerza requerida para extender la masa disminuyó significativamente de acuerdo al análisis estadístico con el uso e incremento de la cantidad de ECC en las masas ($p < 0.05$) en comparación con las masas blanco y harina comercial (Tabla 21), de 0.72N a 0.21N. Se observa un decremento en la resistencia a la extensión en aquellas masas reposadas en la temperatura mayor (45°C), comparadas con aquellas reposadas a 30° , tendencia que no se observa en las masas blanco pero si en las masas formuladas con harina comercial.

Tabla 21. Análisis de varianza Resistencia a la extensibilidad

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.100587	0.033529	5.31	0.026
Lineal	2	0.090056	0.045028	7.14	0.017
Temp	1	0.016332	0.016332	2.59	0.146
ppm ECC	1	0.073724	0.073724	11.69	0.009
Interacciones de 2 términos	1	0.010531	0.010531	1.67	0.232
Temp*ppm ECC	1	0.010531	0.010531	1.67	0.232
Error	8	0.050468	0.006309		
Curvatura	1	0.007372	0.007372	1.20	0.310
Error puro	7	0.043097	0.006157		
Total	11	0.151056			

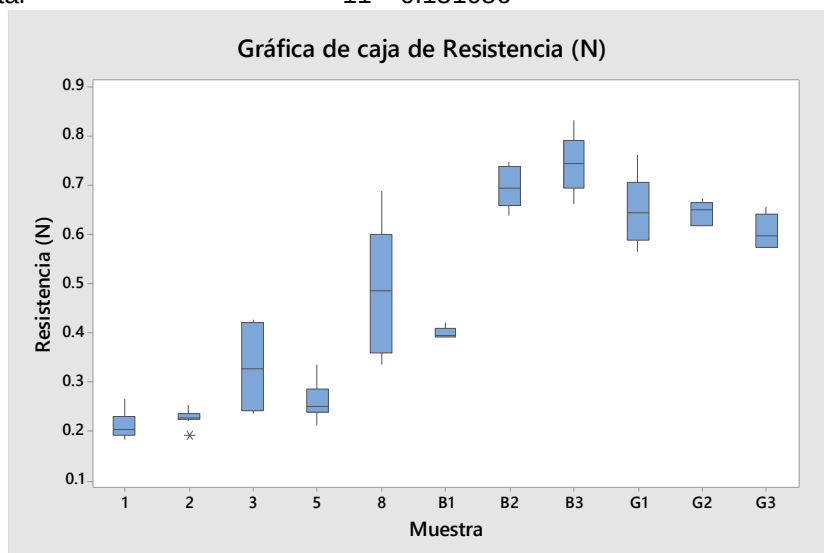


Figura 29. Gráfico de resultados de análisis de extensibilidad de la masa, resistencia a la extensibilidad (N). Masa reposada a 45°C con 300ppm ECC (1). Masa reposada a 30°C con 300ppm ECC (2). Masa reposada a 45°C con 80ppm ECC (3). Masa reposada a 37.5°C con 190ppm ECC (5). Masa reposada a 30°C con 80ppm ECC (8). Masa control reposada a 30°C sin

ECC (B1). Masa control reposada a 37.5°C sin ECC (B2). Masa rcontrol eposada a 45°C sin ECC (B3). Masa de harina comercial reposada a 30°C sin ECC (G1). Masa de harina comercial reposada a 37.5°C sin ECC (G2). Masa de harina comercial reposada a 45°C sin ECC (G3).

Los resultados de las medidas máximas de extensibilidad de las masas se observan en la Figura 30, y los resultados del análisis estadístico se muestran en la Tabla 22. En general, las masas formuladas con la mayor cantidad de ECC mostraron la menor extensibilidad (21mm) en comparación con las que contenían la menor cantidad de extracto (28mm) y las masas blanco (28-42mm) ($p < 0.05$) mostrando la mayor extensibilidad aquellas masas formuladas con harina comercial (42-53mm). La tendencia también indica que el aumento de la temperatura también afecta en este sentido, disminuyendo la extensibilidad máxima de la masa en aquellas reposadas a 45°C en comparación con aquellas reposadas a 37 o 30°C.

Tabla 22. Análisis de varianza Extensibilidad máxima

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	58.787	19.5956	2.57	0.127
Lineal	2	58.385	29.1927	3.82	0.068
Temp	1	8.367	8.3673	1.10	0.326
ppm ECC	1	50.018	50.0180	6.55	0.034
Interacciones de 2 términos	1	0.402	0.4016	0.05	0.824
Temp*ppm ECC	1	0.402	0.4016	0.05	0.824
Error	8	61.070	7.6337		
Curvatura	1	36.152	36.1523	10.16	0.015
Error puro	7	24.917	3.5596		
Total	11	119.857			

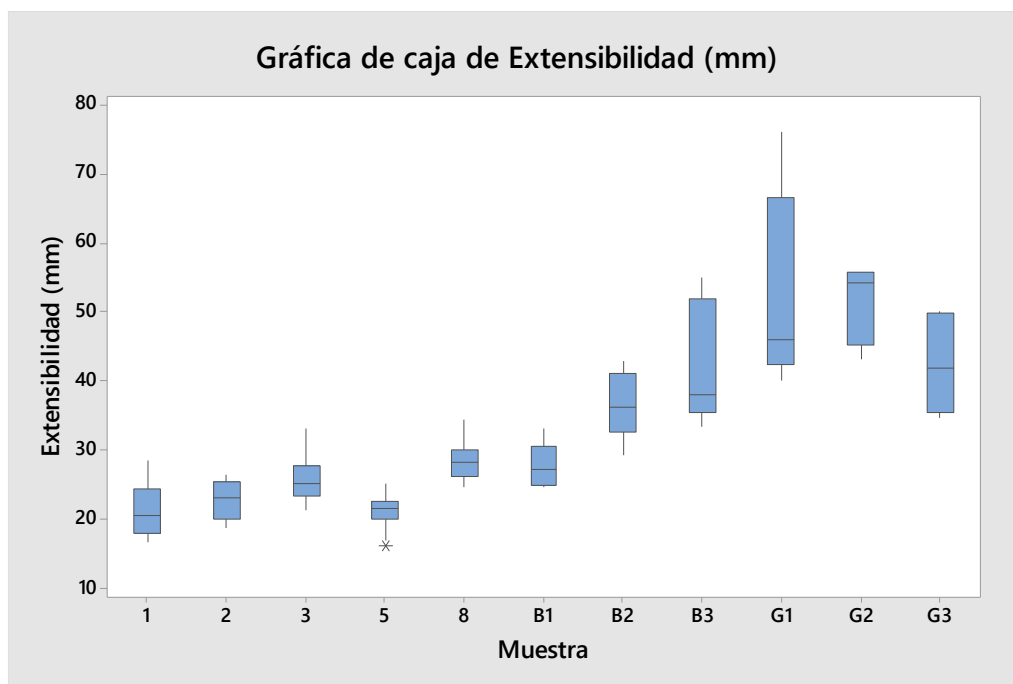


Figura 30. Gráfico de resultados de análisis de extensibilidad de la masa, milímetros de extensibilidad. Masa reposada a 45°C con 300ppm ECC (1). Masa reposada a 30°C con 300ppm ECC (2). Masa reposada a 45°C con 80ppm ECC (3). Masa reposada a 37.5°C con 190ppm ECC (5). Masa reposada a 30°C con 80ppm ECC (8). Masa control reposada a 30°C sin ECC (B1). Masa control reposada a 37.5°C sin ECC (B2). Masa control reposada a 45°C sin ECC (B3). Masa de harina comercial reposada a 30°C sin ECC (G1). Masa de harina comercial reposada a 37.5°C sin ECC (G2). Masa de harina comercial reposada a 45°C sin ECC (G3).

7.7.3 Análisis de las características físicas de las tortillas

Los resultados de peso, diámetro, ancho y volumen específico se pueden encontrar en la tabla 23. En general, las tortillas tratadas presentaron un menor peso, mayor diámetro, fueron más delgadas y presentaron un volumen específico mayor en comparación con aquellas masas no adicionadas con ECC. Las tortillas tratadas con ECC presentaron un peso de 1 a 4 gramos menor en comparación a aquellas de masas no tratadas o preparadas con harina comercial (Figura 31). El diámetro de las tortillas incrementó de 12.08% hasta un 23.27% en comparación con aquellas preparadas en una formulación sin ECC (Figura 32). El ancho de las tortillas preparadas sin extracto fue hasta 2.4mm más ancha (6mm) en comparación con aquellas masas tratadas con ECC, que en promedio tuvieron 3.6mm de ancho. Incluso en comparación con las tortillas preparadas con harina comercial se mostró una tortilla más delgada, ya que estas tuvieron en promedio 4.7mm de ancho (Figura 33). En cuanto al volumen específico, las tortillas tratadas mostraron un incremento (con un promedio de 3.66cm³/g) en comparación con la masa blanco (2.42cm³/g) y la harina comercial (3.706cm³/g), es decir, a pesar de ser más delgadas y ligeras, son más esponjosas (Figura 34). En general, no se encontraron diferencias significativas en estos 4 valores

($p > 0.05$).

Tabla 23. Resultados de la evaluación de Tortillas

Temp °C	ppm ECC	Muestra	Peso (g)	Diámetro (cm)	Ancho (mm)	Volumen específico (cm ³ /g)
30	0	B1	32.48±1.16	10.47±0.47	5±0.24	2.65±0.20
37.5	0	B2	34.99±0.68	10.08±0.26	6.6±0.26	2.28±0.12
45	0	B3	32.92±0.67	9.89±0.35	6.4±0.84	2.33±0.19
45	300	1	33.27±0.67	12.32±0.44	3.9±0.63	3.58±0.26
30	300	2	31.26±0.6	11.94±0.28	3.4±0.41	3.58±0.18
45	80	3	32.51±0.66	11.25±0.27	4.1±0.63	3.06±0.16
45	80	4	31.94±0.72	12.57±0.2	3.7±0.72	3.88±0.17
37.5	190	5	31.05±0.66	12.89±0.43	3.3±0.57	4.21±0.34
30	300	6	31.43±0.3	12.02±0.37	4.1±0.45	3.61±0.25
37.5	190	7	30.72±0.53	12.58±0.41	3.4±0.74	4.05±0.28
30	80	8	31.61±0.74	11.27±0.19	3.6±0.97	3.15±0.13
37.5	190	9	31.41±0.5	12.21±0.39	3.5±0.42	3.73±0.24
30	80	10	31.95±1.03	11.77±0.34	3.8±0.53	3.40±0.20
37.5	190	11	31.28±0.74	12.62±0.5	3.4±0.59	4.00±0.33
45	300	12	31.1±0.44	12.24±0.45	3.4±0.41	3.78±0.28
30	0	G1	33.35±0.68	10.24±0.34	4.9±0.89	2.47±0.15
37.5	0	G2	32.96±0.58	11.01±0.38	4.1±0.46	2.89±0.20
45	0	G3	33.173±0.77	10.81±0.32	5.2±0.53	2.76±0.16

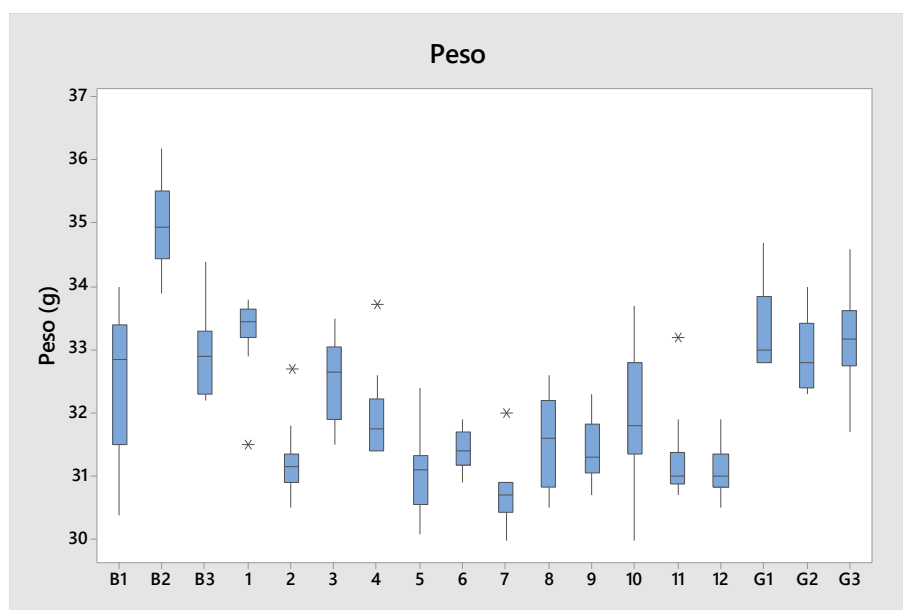


Figura 31. Peso de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

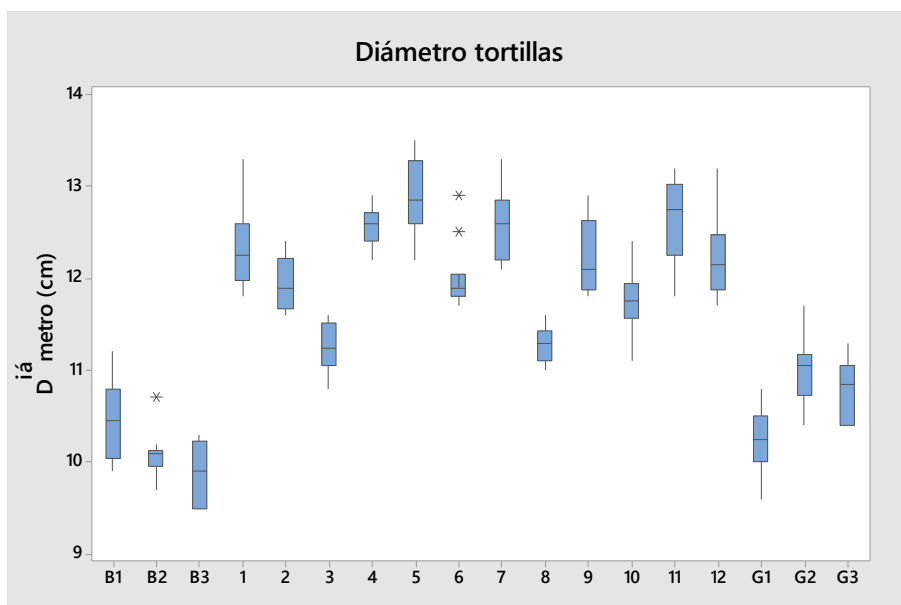


Figura 32. Diámetro de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

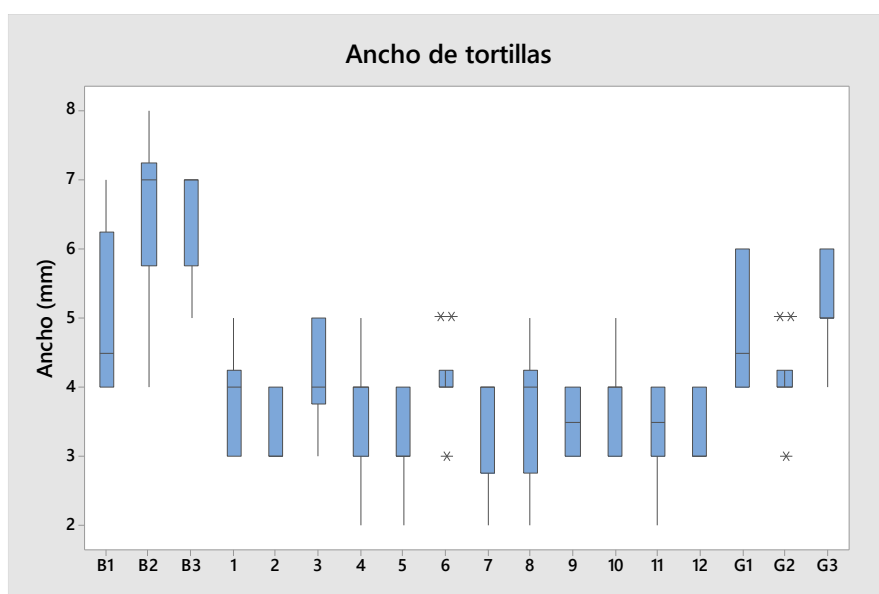


Figura 33. Ancho de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

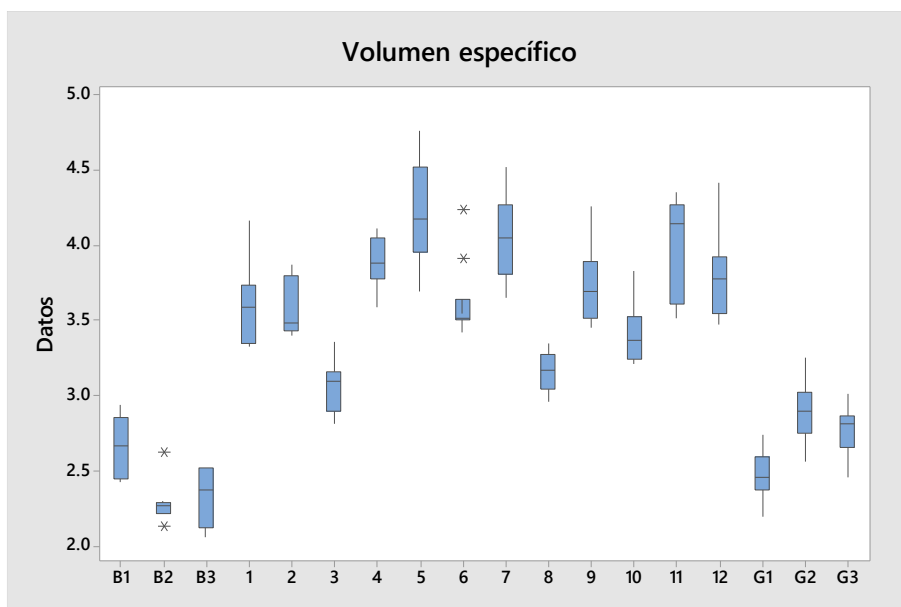


Figura 34. Volumen específico de las tortillas según su formulación. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

7.7.4 Análisis de humedad y A_w

Los resultados de los análisis de humedad y A_w se muestran en la Tabla 24. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, pero se observa un decremento claro de la cantidad de humedad conforme aumenta la cantidad de extracto añadido a la formulación (Figura 36). Se observa un promedio de 31% de humedad en las tortillas blanco, 29% en la formulación con harina comercial, 27% en la formulación con 80ppm de ECC, 24% en la formulación con 190ppm de extracto y un promedio de 23% en la formulación con la máxima cantidad de ECC, 300ppm (Figura 36).

De la misma manera se observa el comportamiento de la cantidad de humedad con el incremento de la temperatura, en especial con las masas con 300ppm de ECC (Figura 37) de 27.2% en masas reposadas a 30°C a 23.5% en masas reposadas a 45°C.

En cuanto a la actividad de agua (A_w) se aprecia diferencia significativa ($p > 0.05$) en la variable de adición de extracto de trompillo en la formulación (Tabla 25). Principalmente, se observa una disminución de la actividad de agua a medida que incrementa la cantidad de ECC añadido, así como con el incremento de la temperatura (Figuras 38 y 39).

Tabla 24. Resultados de análisis de Humedad, Actividad de agua y Análisis de colorimetría (columnas L, A y B)

Temp °C	ppm ECC	Muestra	Humedad (%)	AW	L	A	B
30	0	B1	28.62±1.36	0.9±0.01	75.342±2.77	0.508±0.02	18.748±0.78
37.5	0	B2	31.23±2.19	0.87±0.024	75.726±1.21	1.946±1.39	21.056±1.68
45	0	B3	30.34±0.92	0.92±0.01	77.422±0.85	1.272±0.47	22.208±0.79
45	300	1	24.16±0.50	0.88±0.021	54.37±1.62	1.514±0.62	16.56±1.26
30	300	2	25.10±0.90	0.8±0.011	56.264±1.84	1.23±0.20	17.606±0.93
45	80	3	27.49±0.56	0.89±0.015	59.022±2.93	1.64±0.39	18.792±0.81
45	80	4	26.99±1.39	0.91±0.005	75.892±1.75	1.66±0.22	24.058±1.06
37.5	190	5	20.80±0.95	0.88±0.01	72.834±0.69	1.608±0.73	23.176±1.62
30	300	6	29.3±4.18	0.84±0.02	67.808±2.11	1.454±0.34	20.642±1.95
37.5	190	7	21.56±0.41	0.89±0.022	72.506±1.75	1.3±0.61	17.488±2.18
30	80	8	27.23±0.68	0.91±0.002	77.382±1.71	0.246±0.3	20.362±0.97
37.5	190	9	24.68±1.46	0.9±0.007	72.98±1.70	1.85±0.93	23.188±1.49
30	80	10	28.09±0.47	0.91±0.006	75.174±1.48	1.794±0.62	23.544±0.70
37.5	190	11	22.57±0.46	0.87±0.012	71.682±1.92	1.832±0.24	22.58±2.56
45	300	12	22.84±0.52	0.71±0.018	68.692±1.74	2.48±0.66	22.67±1.68
30	0	G1	29.12±0.18	0.93±0.005	78.04±2.15	2.326±0.79	20.956±1.64
37.5	0	G2	28.99±0.73	0.91±0.003	76.906±1.73	2.336±0.30	22.584±2.50
45	0	G3	29.55±0.44	0.92±0.009	75.504±1.01	3.898±0.45	25.156±0.66

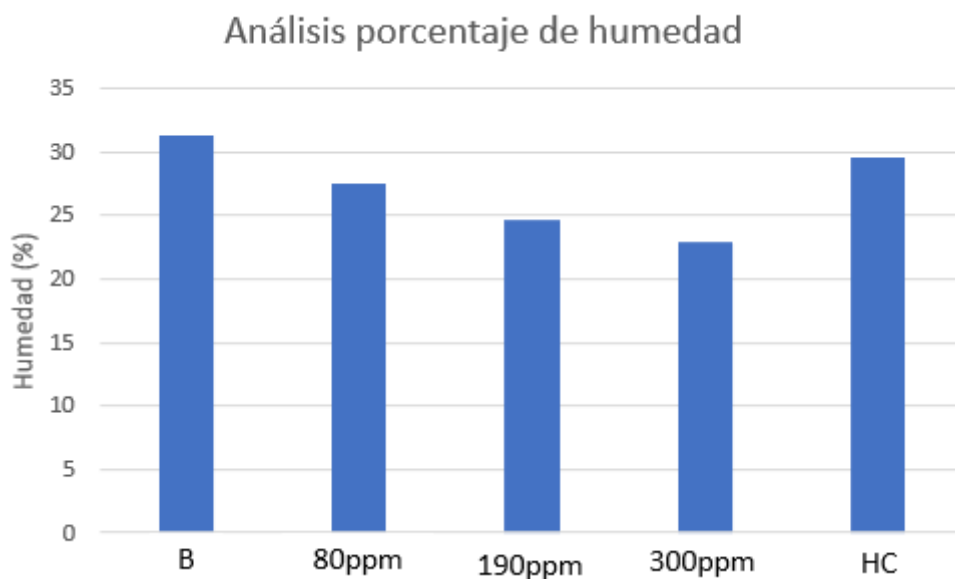


Figura 35. Resultados de análisis de porcentaje de humedad

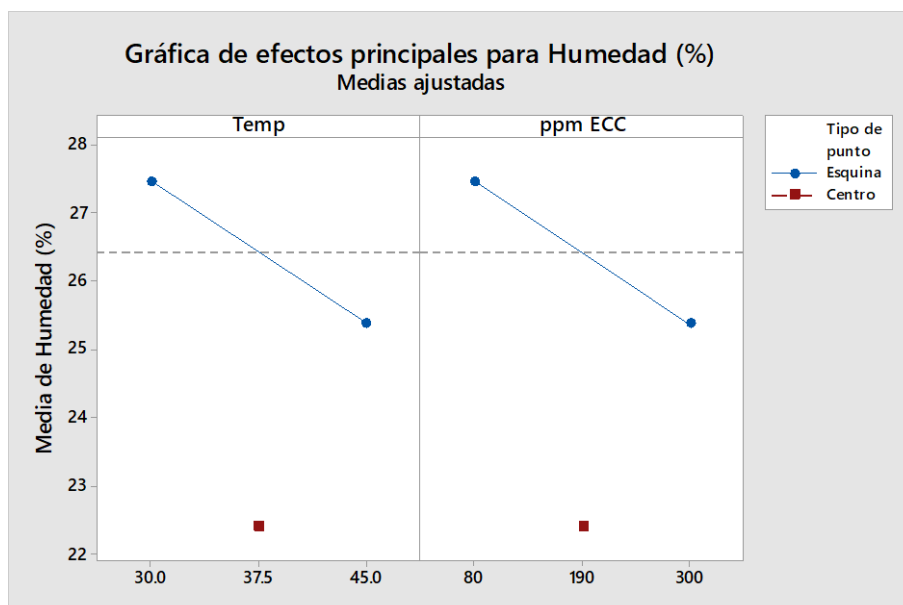


Figura 36. Gráfica de efectos principales para Humedad

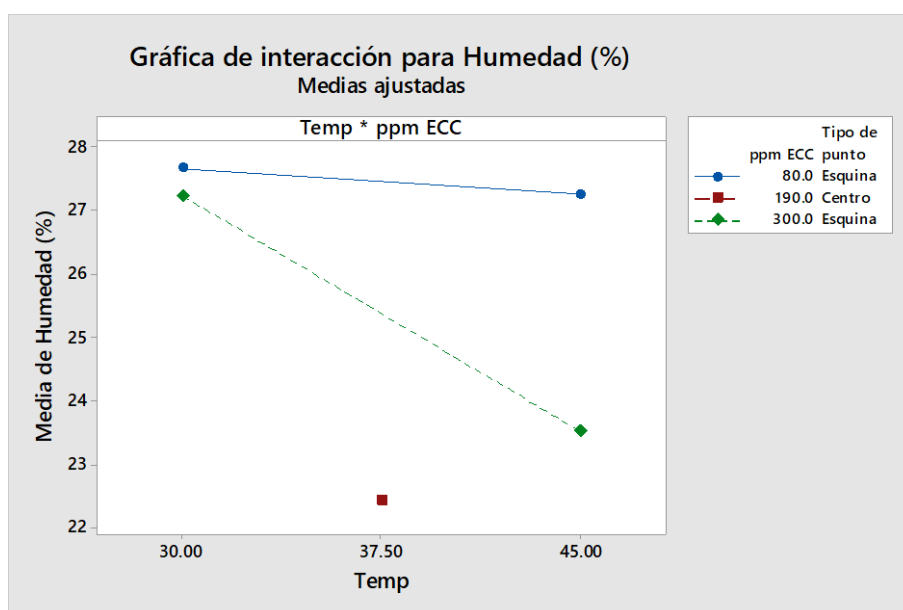


Figura 37. Gráfica de interacción para Humedad

Tabla 25. Análisis de Varianza sobre Aw

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.019738	0.006579	2.90	0.102
Lineal	2	0.019625	0.009813	4.32	0.053
Temp	1	0.000612	0.000612	0.27	0.617
ppm ECC	1	0.019013	0.019013	8.38	0.020
Interacciones de 2 términos	1	0.000112	0.000112	0.05	0.829
Temp*ppm ECC	1	0.000112	0.000112	0.05	0.829
Error	8	0.018154	0.002269		
Curvatura	1	0.002204	0.002204	0.97	0.358
Error puro	7	0.015950	0.002279		
Total	11	0.037892			

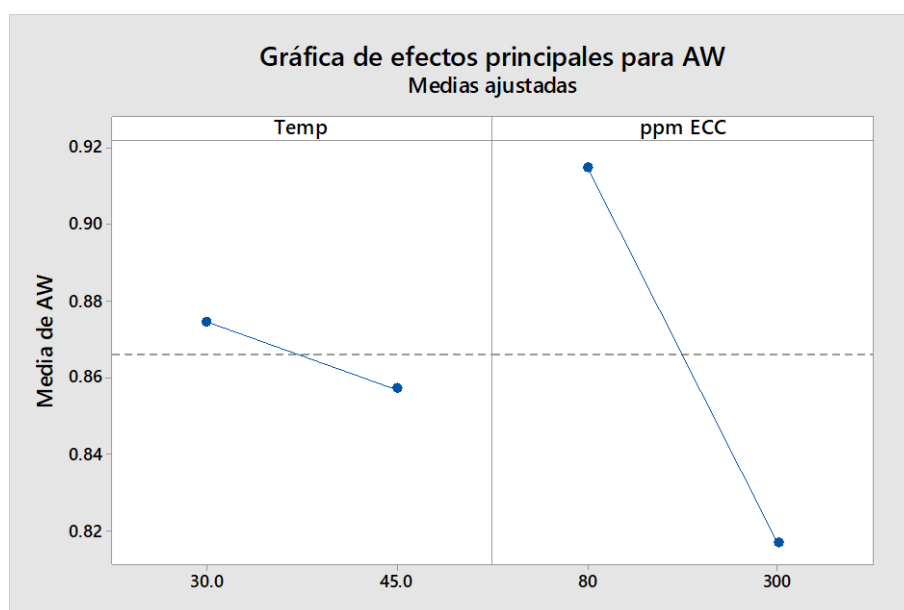


Figura 38. Gráfica de efectos principales para AW.

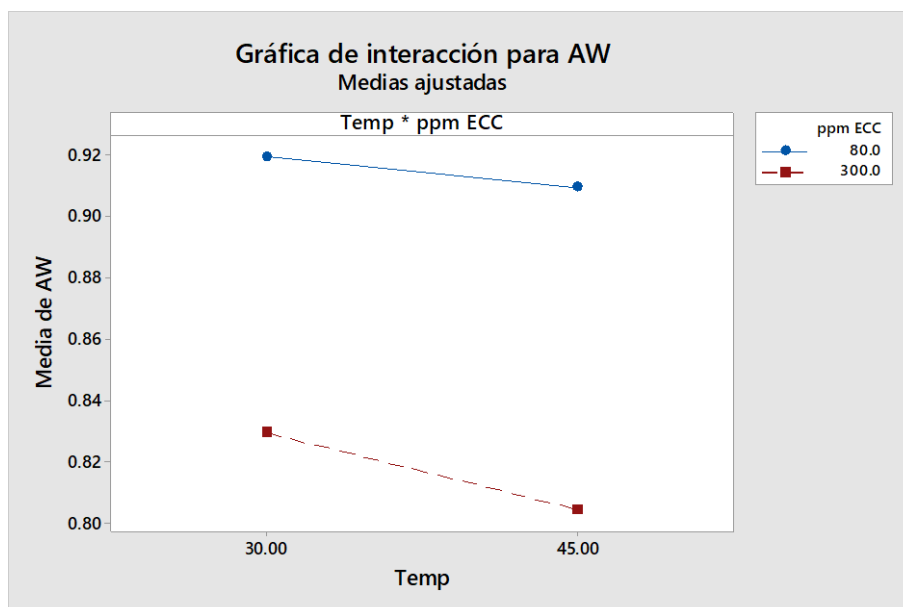


Figura 39. Gráfica de interacción para AW

7.7.5 Análisis de colorimetría

Los resultados de los análisis de colorimetría sobre los valores L , a y b de las diferentes masas tratadas se muestran en la Tabla 24. La evaluación del parámetro (L) mostró que aquellas masas sin tratamiento o con harina comercial tendían a tener tonos más claros que aquellas masas tratadas (Fig. 40). El gráfico de efectos principales para los valores de L se muestra en la Figura 41. La tendencia indica que tanto el incremento de temperatura como de la cantidad de ECC producen tortillas con menores valores de luminosidad, por lo cual la combinación de los factores resulta en valores menores de luminosidad (Figura 42). La Figura 43 muestra los resultados del valor de a en masas tratadas, blanco y de formulación con harina comercial. La tendencia de los valores indica que a medida que se incrementó tanto la temperatura de cocción de la masa, como la cantidad de ECC se observaron valores mayores de a , indicando tonos más rojizos en las tortillas (Figuras 44 y 45). Los valores obtenidos por b se pueden encontrar en la Figura 46. El análisis estadístico indica que el incremento de extracto producía tortillas con valores b menores que aquellas masas sin tratar o con menor cantidad de extracto (Figuras 47 y 48).

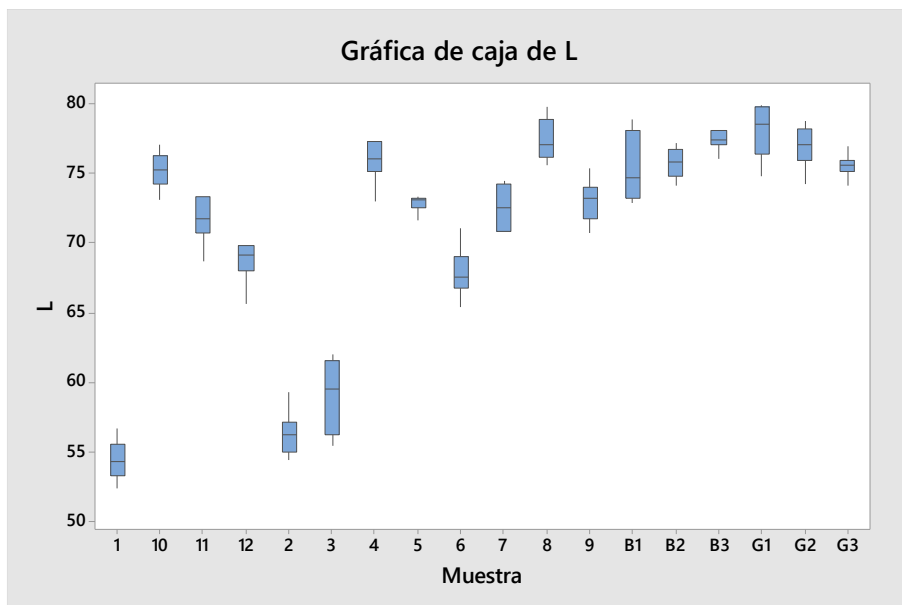


Figura 40. Gráfica de caja de L. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

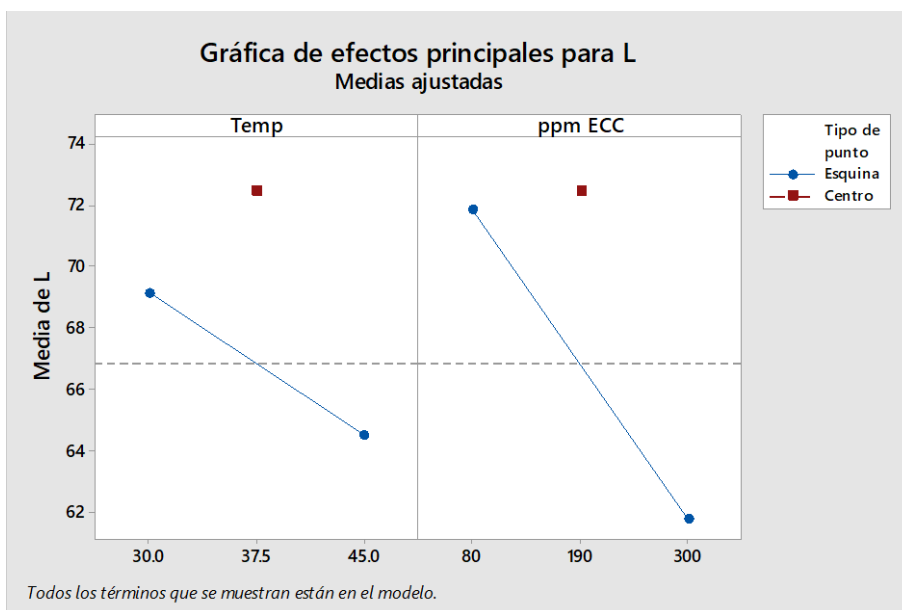


Figura 41 Gráfica de efectos principales para L

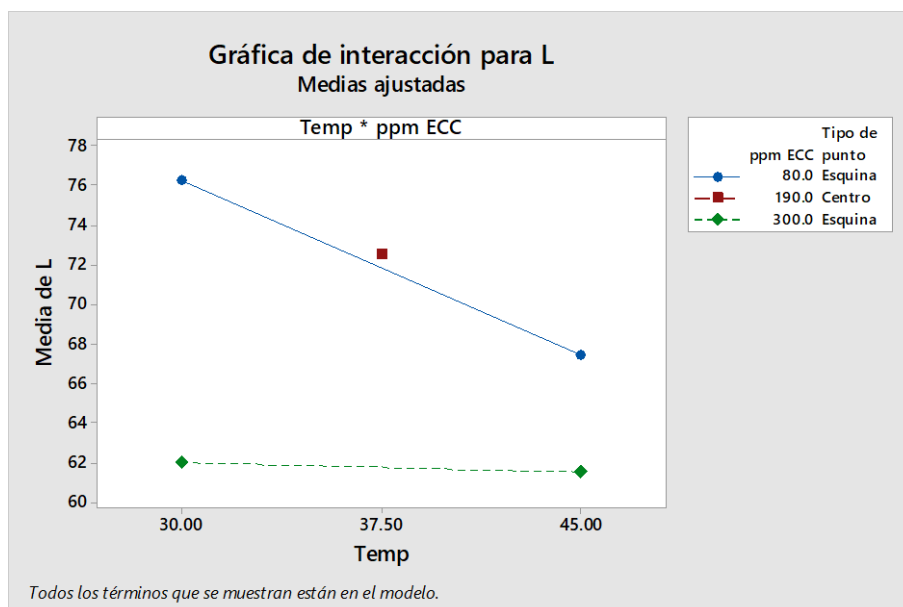


Figura 42 Gráfica de interacción para L

Tabla 26. Análisis de Varianza sobre L

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	367.32	91.83	2.04	0.193
Lineal	2	246.86	123.43	2.74	0.132
Temp	1	43.49	43.49	0.97	0.358
ppm ECC	1	203.37	203.37	4.52	0.071
Interacciones de 2 términos	1	34.58	34.58	0.77	0.410
Temp*ppm ECC	1	34.58	34.58	0.77	0.410
Curvatura	1	85.88	85.88	1.91	0.210
Error	7	314.94	44.99		
Total	11	682.26			

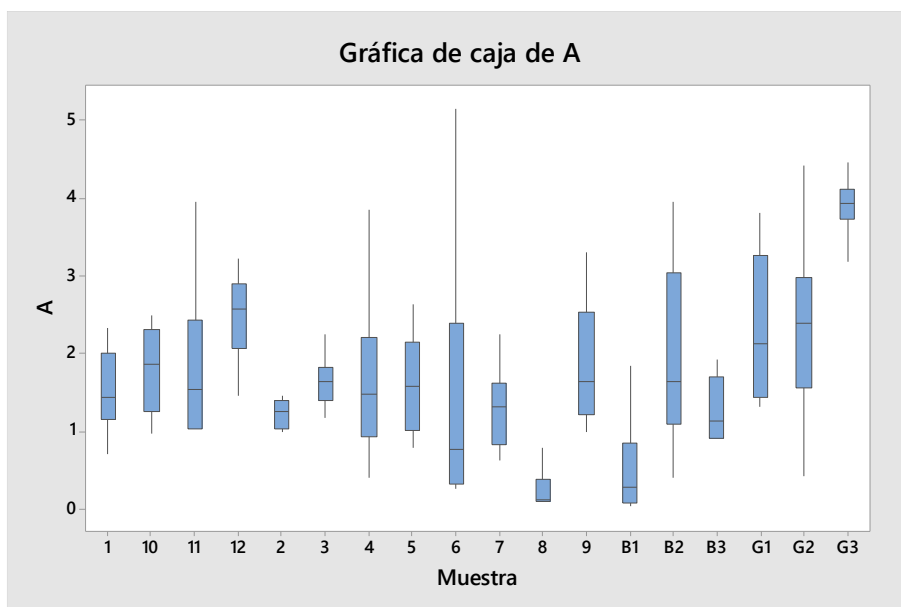


Figura 43 Gráfica de caja de a. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

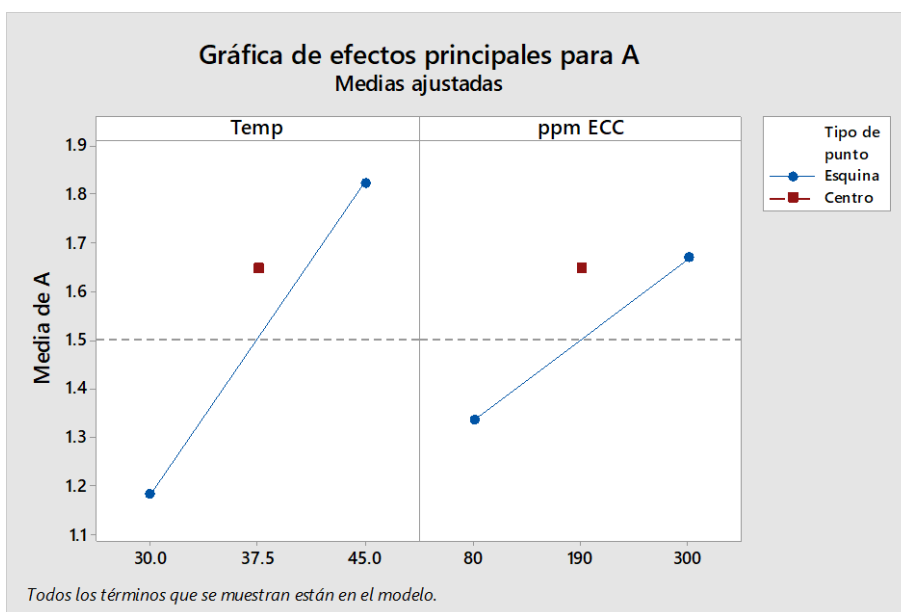


Figura 44 Gráfica de efectos principales para A

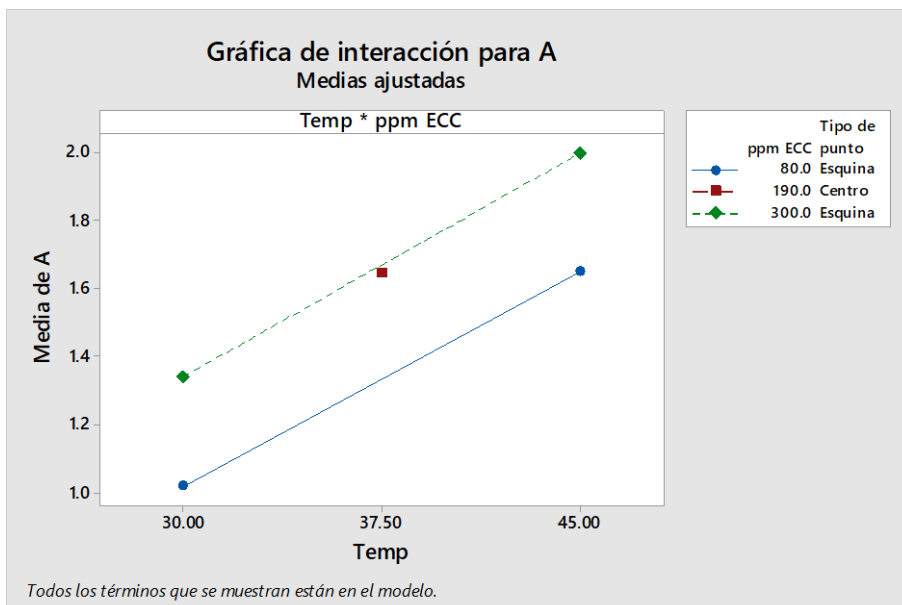


Figura 45 Gráfica de interacción para a

Tabla 27. Análisis de Varianza sobre valores obtenidos sobre a

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	1.10597	0.276491	1.03	0.456
Lineal	2	1.04939	0.524697	1.95	0.213
Temp	1	0.82561	0.825613	3.06	0.124
ppm ECC	1	0.22378	0.223781	0.83	0.393
Interacciones de 2 términos	1	0.00031	0.000313	0.00	0.974
Temp*ppm ECC	1	0.00031	0.000313	0.00	0.974
Curvatura	1	0.05626	0.056260	0.21	0.662
Error	7	1.88738	0.269626		
Total	11	2.99335			

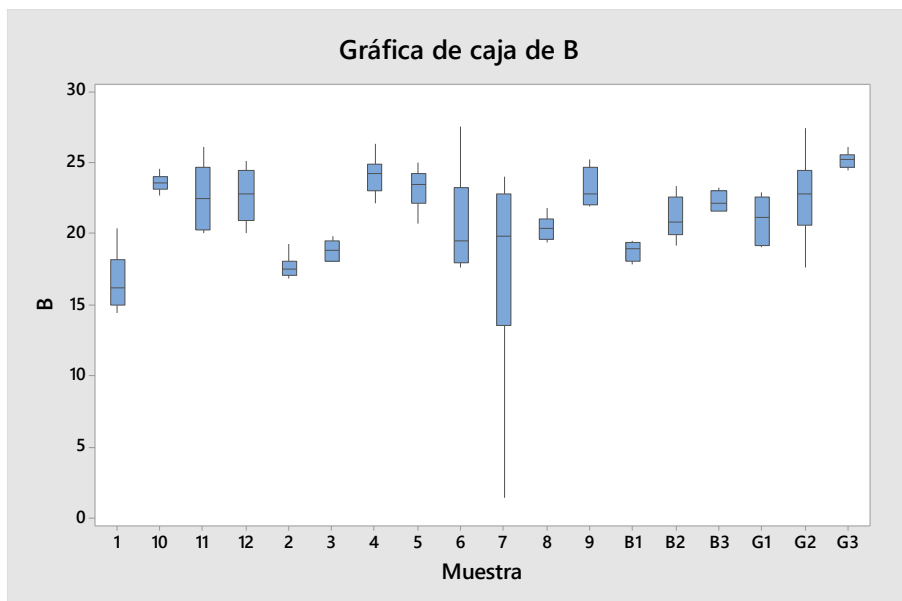


Figura 46 Gráfica de caja de b. Muestras blanco (B1-3), Muestras 1 a 12, formulación con harina comercial (G1-G3)

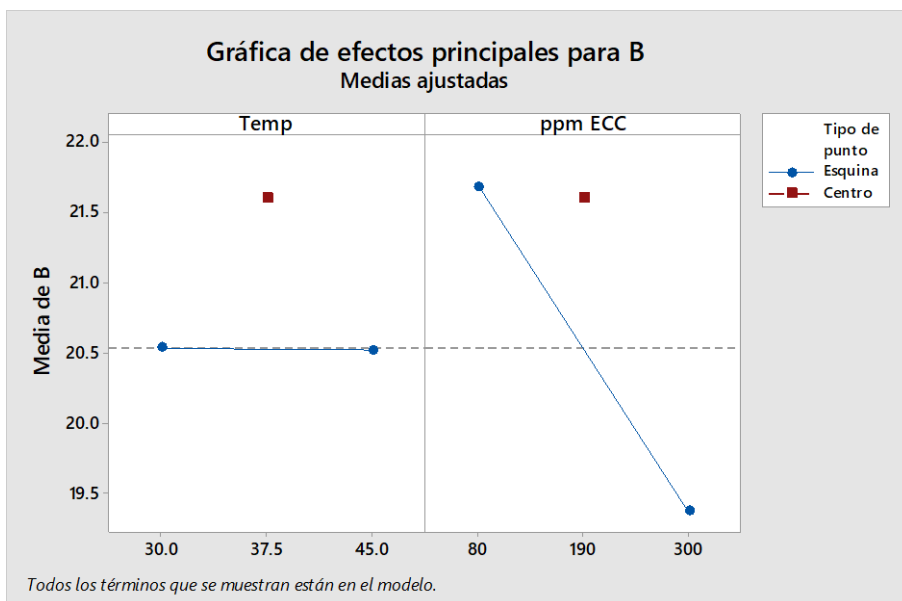


Figura 47 Gráfica de efectos principales para B

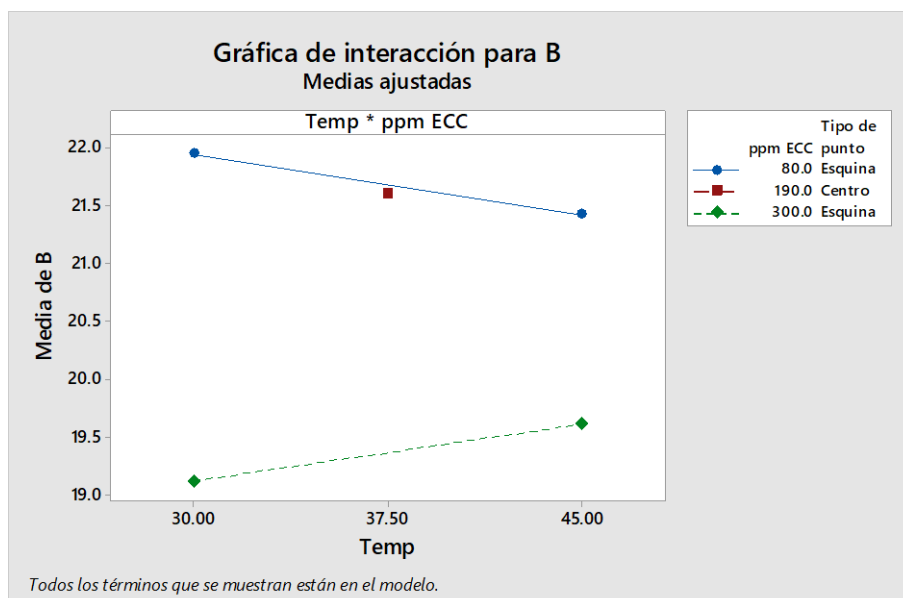


Figura 48 Gráfica de interacción para *b*

Tabla 28. Análisis de Varianza sobre valores obtenidos de *b*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	14.3832	3.5958	0.39	0.812
Lineal	2	10.7608	5.3804	0.58	0.585
Temp	1	0.0007	0.0007	0.00	0.993
ppm ECC	1	10.7602	10.7602	1.16	0.318
Interacciones de 2 términos	1	0.5192	0.5192	0.06	0.820
Temp*ppm ECC	1	0.5192	0.5192	0.06	0.820
Curvatura	1	3.1032	3.1032	0.33	0.582
Error	7	65.0768	9.2967		
Total	11	79.4601			

7.7.6 Análisis de rolabilidad de las tortillas

Los resultados de los análisis de textura sobre la rolabilidad de las tortillas se muestran en la Tabla 29. Una curva típica para análisis de rolabilidad se muestra en el Apéndice VI, Figura 63.

El análisis de rolabilidad de las tortillas se realizó con la finalidad de medir objetivamente la fuerza necesaria para enrollar una tortilla y la fuerza máxima que la tortilla podría oponer a esa acción. Los resultados del análisis estadístico (Tabla 30) muestran como significativo el uso del complejo enzimático ($p > 0.05$). Los resultados reflejan una disminución de la fuerza máxima a medida que aumenta la

cantidad de extracto añadido de 3.9N en la masa blanco, 2.3N en la masa formulada con 80ppm 1.2N en la masa con 190ppm, 0.9N en la masa con 300ppm, en contraste, se observa la masa formulada con harina comercial con 3.7N (Figura 40), y aumenta ligeramente al incrementar la temperatura de reposo (Figura 41).

Tabla 29. Resultados de análisis de Rolabilidad y Extensibilidad

Temp °C	Rolabilidad				Extensibilidad			
	ppm ECC	Muestra	Fuerza máxima (N)	Trabajo (Nmm)	Módulo de deformación (N/mm)	Fuerza máxima (N)	Trabajo (Nmm)	Distancia de ruptura (mm)
30	0	B1	1.89±0.54	119.49±5.46	0.291±0.04	4.27±0.55	77.80±9.70	18.48±2.06
37.5	0	B2	3.78±0.36	234.20±31.11	0.232±0.02	4.02±0.16	90.66±5.58	17.69±0.81
45	0	B3	3.89±0.68	244.88±30.60	0.273±0.06	4.47±0.53	92.01±10.2	16.42±2.00
45	300	1	0.97±0.11	87.25±15.24	0.119±0.014	1.15±0.14	20.41±1.17	11.64±0.65
30	300	2	0.94±0.17	73.61±18.52	0.113±0.008	1.32±0.07	22.16±4.03	11.51±0.99
45	80	3	2.38±0.18	158.99±21.72	0.336±0.071	2.56±0.18	59.29±4.99	15.53±0.80
45	80	4	2.18±0.38	163.91±12.58	0.339±0.057	1.98±0.29	44.23±5.53	11.75±0.57
37.5	190	5	1.18±0.37	87.65±14.26	0.190±0.015	1.90±0.03	35.99±2.36	11.94±1.19
30	300	6	0.80±0.16	65.60±7.00	0.136±0.029	1.24±0.09	21.94±1.86	10.47±2.55
37.5	190	7	1.09±0.12	74.94±0.54	0.232±0.098	1.64±0.42	35.83±7.07	10.71±2.44
30	80	8	1.88±0.06	137.97±5.82	0.159±0.028	2.10±0.18	41.48±3.18	12.58±0.92
37.5	190	9	1.00±0.08	70.13±4.088	0.120±0.02	1.20±0.13	22.77±2.79	11.23±2.23
30	80	10	2.32±0.48	175.02±22.77	0.296±0.047	2.25±0.39	48.46±4.55	11.80±1.38
37.5	190	11	1.09±0.20	75.67±5.41	0.082±0.028	1.26±0.25	25.38±4.32	13.49±0.31
45	300	12	1.22±0.10	95.13±11.36	0.082±0.007	1.00±0.13	17.51±2.30	12.23±0.35
30	0	G1	3.66±0.42	207.15±16.66	0.442±0.101	4.79±0.82	116.7±9.62	16.42±1.48
37.5	0	G2	2.85±0.25	197.14±3.75	0.446±0.037	4.34±0.22	104.2±5.	14.03±1.88
45	0	G3	3.10±0.52	202.58±29.71	0.423±0.118	4.80±0.80	115.9±3.35	15.25±0.71

Tabla 30. Análisis de Varianza Fuerza Máxima

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	3.64288	0.91072	36.65	0.000
Lineal	2	2.99022	1.49511	60.17	0.000
Temp	1	0.08270	0.08270	3.33	0.111
ppm ECC	1	2.90752	2.90752	117.02	0.000
Interacciones de 2 términos	1	0.00098	0.00098	0.04	0.848
Temp*ppm ECC	1	0.00098	0.00098	0.04	0.848
Curvatura	1	0.65168	0.65168	26.23	0.001
Error	7	0.17393	0.02485		
Total	11	3.81680			

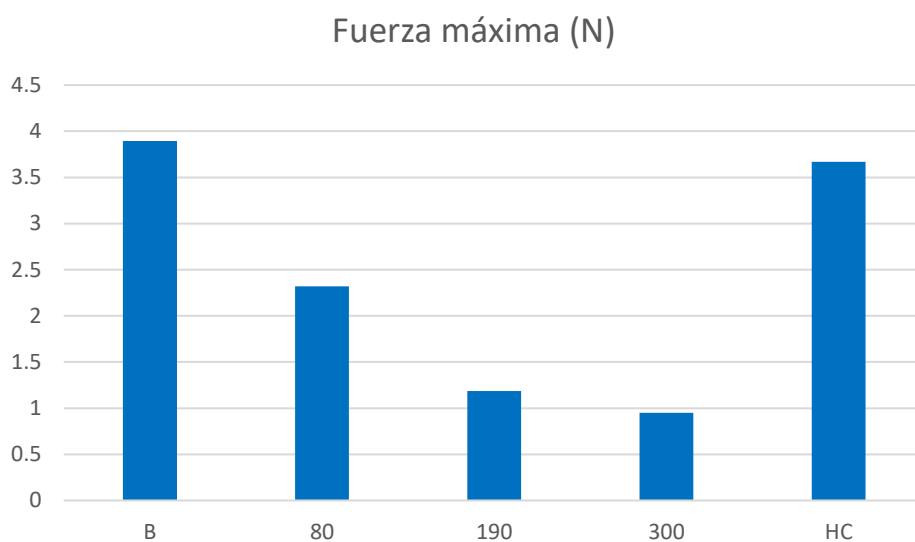


Figura 49. Resultados de Fuerza Máxima de la prueba de rolabilidad de las tortillas

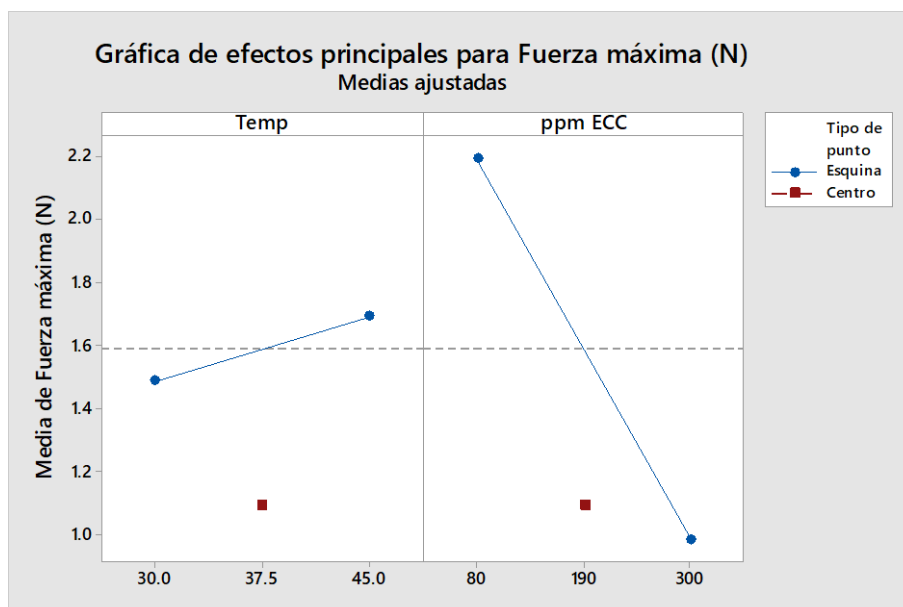


Figura 50. Gráfica de efectos principales para Fuerza máxima de la prueba de rolabilidad de las tortillas

Los resultados del análisis de varianza de Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas se muestran en la Tabla 31. El análisis estadístico nota como significativa la adición de ECC en la formulación ($p > 0.05$), se observa que a medida que incrementa la cantidad de extracto añadido, disminuye la cantidad de trabajo necesario para enrollar la tortilla (Figura 50), de 244.88Nmm en las tortillas blanco y 207.15 en las tortillas formuladas con harina comercial a 175.02Nmm en aquellas adicionadas con 80ppm de ECC, 87.65Nmm en aquellas formuladas con 190ppm de extracto y 74.71Nmm en las tortillas con la mayor cantidad de extracto añadido (300ppm). La gráfica de efectos principales para Trabajo (Figura 52) muestra un ligero incremento de la cantidad de Trabajo necesario para enrollar la tortilla a medida que incrementa la temperatura de reposo de la masa, pero una marcada disminución del trabajo con el incremento de ECC.

Tabla 31. Análisis de varianza Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	17674.2	4418.6	33.33	0.000
Lineal	2	12700.1	6350.1	47.90	0.000
Temp	1	352.2	352.2	2.66	0.147
ppm ECC	1	12348.0	12348.0	93.14	0.000
Interacciones de 2 términos	1	138.2	138.2	1.04	0.341
Temp*ppm ECC	1	138.2	138.2	1.04	0.341
Curvatura	1	4835.9	4835.9	36.48	0.001
Error	7	928.0	132.6		
Total	11	18602.2			

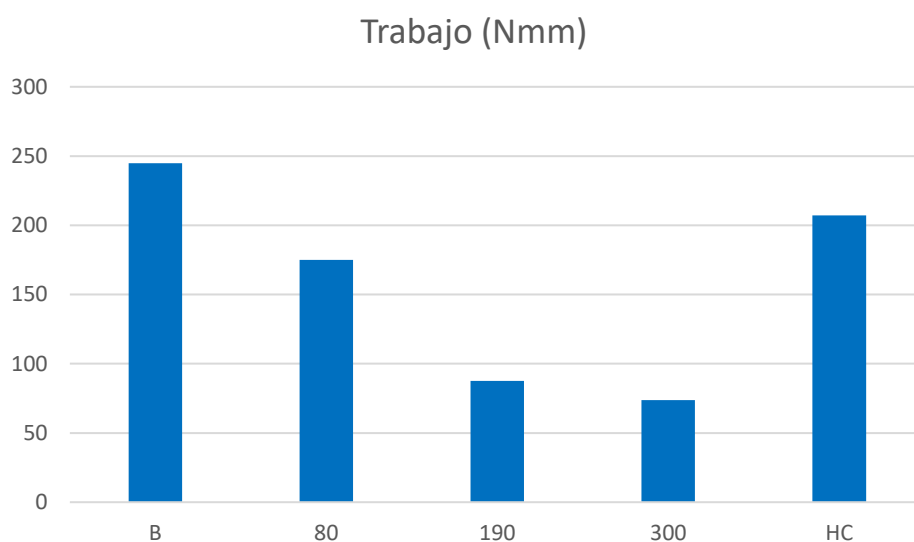


Figura 51. Gráfica de resultados de Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas. Tortillas Blanco (B), con 80ppm de ECC (80), con 190ppm de ECC (190), con 300ppm de ECC (300), formuladas con harina comercial (HC)

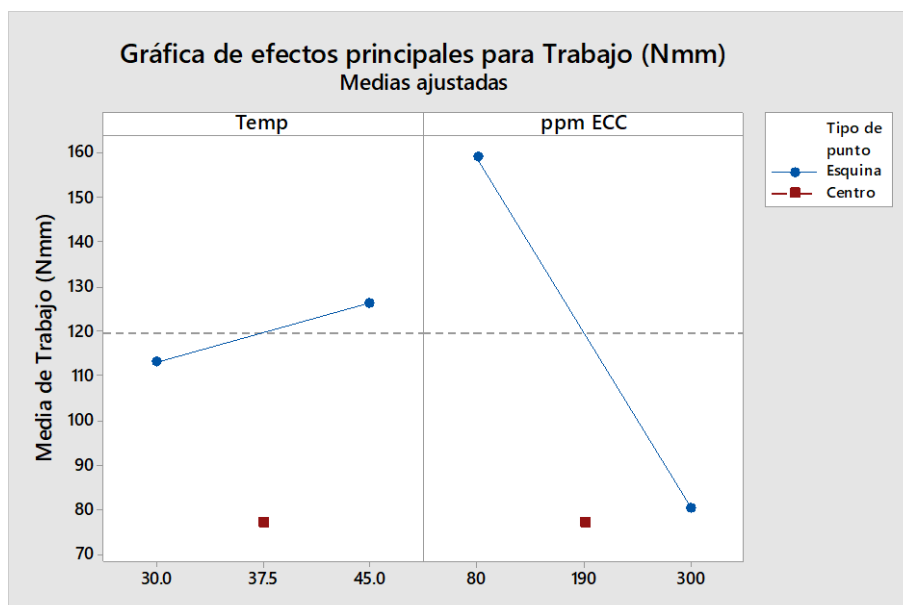


Figura 52. Gráfica de efectos principales para Trabajo de la prueba de rolabilidad de las tortillas

7.7.7 Análisis de extensibilidad de las tortillas

Los resultados de los análisis sobre la extensibilidad de las tortillas se muestran en la Tabla 29. Una curva típica para análisis de extensibilidad de las tortillas se muestra en el Apéndice VII, Figura 64. El análisis de varianza sobre el módulo de deformación (Tabla 32) muestra como significativa la variable de ECC ($p < 0.050$), disminuyendo el resultado a medida que incrementa la cantidad de extracto añadido en las formulaciones (Figura 53).

Tabla 32. Análisis de varianza módulo de deformación de la prueba de extensibilidad de las tortillas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	0.075273	0.018818	5.48	0.026
Lineal	2	0.061798	0.030899	8.99	0.012
Temp	1	0.003741	0.003741	1.09	0.331
ppm ECC	1	0.058057	0.058057	16.90	0.005
Interacciones de 2 términos	1	0.008863	0.008863	2.58	0.152
Temp*ppm ECC	1	0.008863	0.008863	2.58	0.152
Curvatura	1	0.004612	0.004612	1.34	0.285
Error	7	0.024050	0.003436		
Total	11	0.099324			

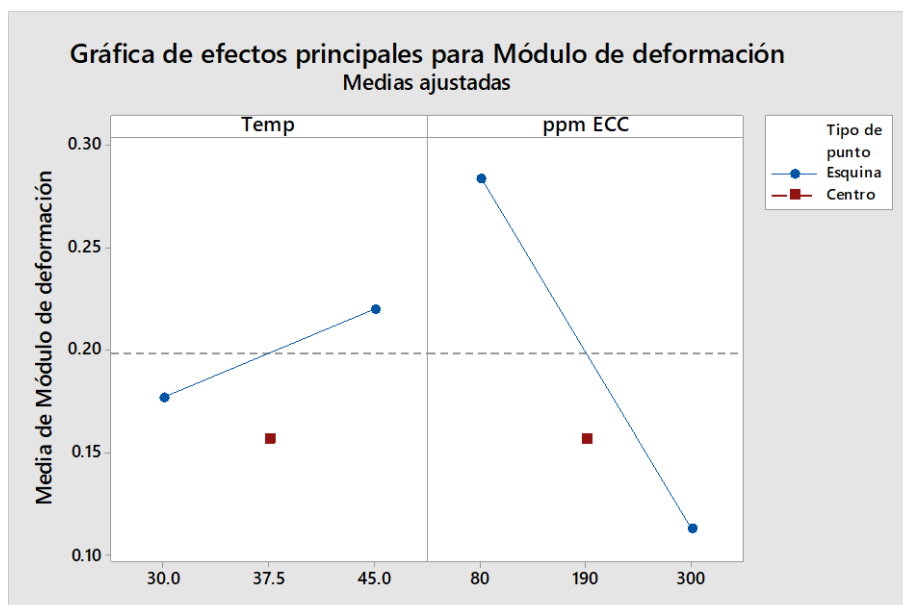


Figura 53. Gráfica de efectos principales para Módulo de deformación de la prueba de extensibilidad de las tortillas

El análisis de varianza sobre los resultados de Fuerza máxima para la prueba de extensibilidad de las tortillas se observa en la Tabla 33. El análisis señala al igual que en los resultados de módulo de deformación como variable significativa la cantidad de extracto añadido en la formulación. Se observa una marcada disminución en la fuerza máxima necesaria para llegar al límite de extensibilidad a medida que incrementa la cantidad de ECC (Figura 54), así como una mínima disminución de fuerza máxima conforme incrementa la temperatura de reposo de la masa.

Tabla 33. Análisis de varianza Fuerza máxima de la prueba de extensibilidad de las tortillas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	2.32718	0.58180	7.78	0.010
Lineal	2	2.17311	1.08655	14.54	0.003
Temp	1	0.00615	0.00615	0.08	0.783
ppm ECC	1	2.16695	2.16695	28.99	0.001
Interacciones de 2 términos	1	0.04631	0.04631	0.62	0.457
Temp*ppm ECC	1	0.04631	0.04631	0.62	0.457
Curvatura	1	0.10776	0.10776	1.44	0.269
Error	7	0.52323	0.07475		
Total	11	2.85041			

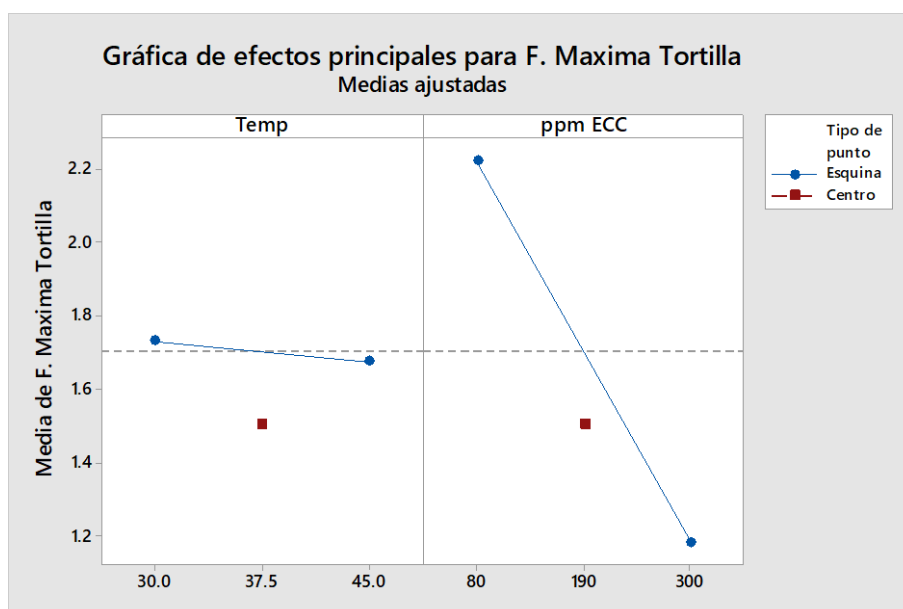
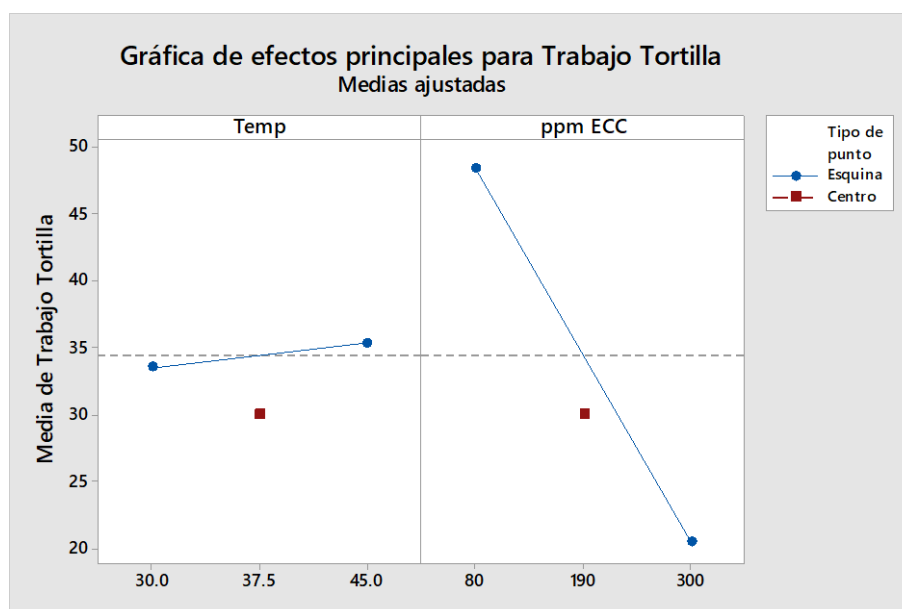


Figura 54. Gráfica de efectos principales para Fuerza máxima de la prueba de extensibilidad de las tortillas

Los resultados del análisis de varianza de los resultados de Trabajo se observan en la Tabla 34. Se señala como significativa la variable de ECC, a medida que se incrementa la cantidad de extracto en la formulación, menor es la variable de trabajo sobre la tortilla (Figura 55).

Tabla 34. *Análisis de varianza Trabajo de la prueba de extensibilidad de las tortillas*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	1660.73	415.18	10.18	0.005
Lineal	2	1559.20	779.60	19.11	0.001
Temp	1	6.84	6.84	0.17	0.694
ppm ECC	1	1552.36	1552.36	38.06	0.000
Interacciones de 2 términos	1	48.85	48.85	1.20	0.310
Temp*ppm ECC	1	48.85	48.85	1.20	0.310
Curvatura	1	52.68	52.68	1.29	0.293
Error	7	285.52	40.79		
Total	11	1946.26			


Figura 55. *Gráfica de efectos principales Trabajo de la prueba de extensibilidad de las tortillas*

Los resultados del análisis de varianza con respecto a la distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas se muestran en la Tabla 35. A diferencia de los análisis anteriores, no se señala como significativa la variable de ECC. Sin embargo, se observa un comportamiento interesante con relación a las temperaturas de reposo (Figura 56), donde se muestra un paralelismo en la disminución de la distancia de ruptura en aquellas tortillas reposadas en las temperaturas mínimas (30°C) comparadas con aquellas reposadas en la temperatura media (37.5) y las reposadas a 45°C, sin importar la cantidad de ECC añadido.

El gráfico de efectos principales muestra una comparación del comportamiento de los resultados con relación a las variables de temperatura de reposo, donde la distancia de ruptura se ve incrementada conforme aumenta la temperatura de reposo, y la variable de ECC, donde la distancia de ruptura disminuye conforme incrementa la cantidad de extracto añadido (Figura 57).

Tabla 35. Análisis de varianza distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	7.5158	1.8789	1.05	0.447
Lineal	2	7.0739	3.5370	1.97	0.209
Temp	1	2.8706	2.8706	1.60	0.246
ppm ECC	1	4.2033	4.2033	2.34	0.170
Interacciones de 2 términos	1	0.1265	0.1265	0.07	0.798
Temp*ppm ECC	1	0.1265	0.1265	0.07	0.798
Curvatura	1	0.3153	0.3153	0.18	0.688
Error	7	12.5492	1.7927		
Total	11	20.0649			

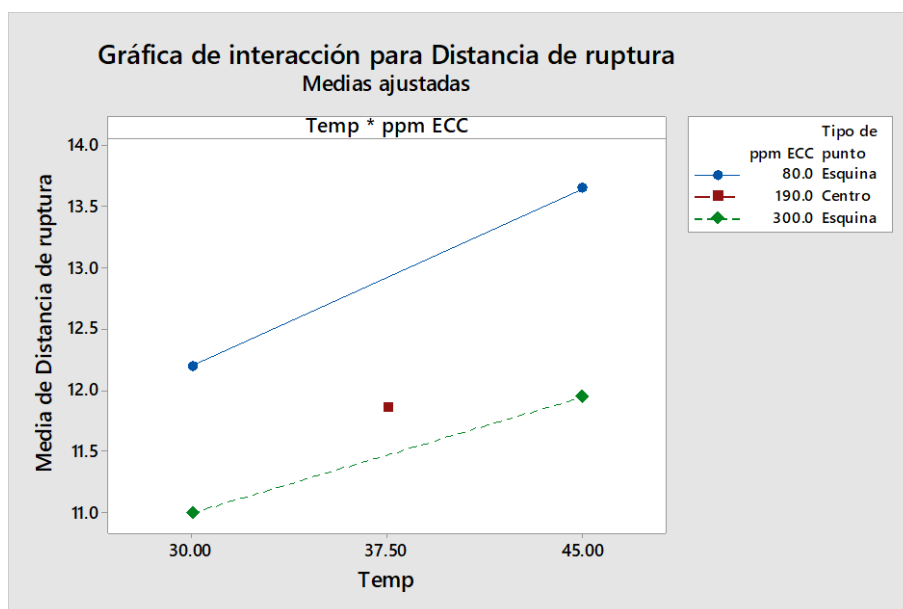


Figura 56. Gráfica de interacción para Distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas

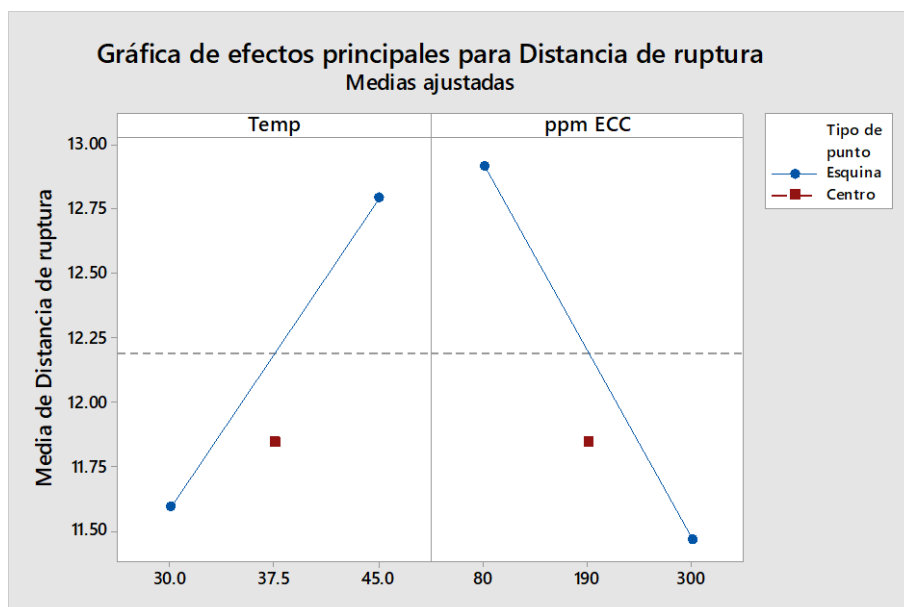


Figura 57. Gráfica de efectos principales para Distancia de ruptura de la prueba de extensibilidad de las tortillas

8. CONCLUSIONES

El complejo enzimático contenido en el extracto crudo de *S. elaeagnifolium* demostró tener actividad amilolítica y proteolítica. En los resultados del análisis de actividad proteolítica se observa que el extracto exhibió actividad en las temperaturas mayores a 70°C y en pH 9, y el análisis de actividad amilolítica muestra que el ECC tiene mayor efecto en los pH menores (4-5) y altas temperaturas (75°C), pero ambos mostraron actividad enzimática en pH y temperatura de procesamiento de las masas formuladas.

Los análisis de textura sobre las masas tratadas mostraron una dureza significativamente menor conforme incrementaba la cantidad de extracto añadido ($p < 0.05$), incrementó la cohesividad y la adhesividad de las masas con las temperaturas de reposo más cálidas. En el caso particular de la esponjosidad, ésta incrementó tanto con las temperaturas elevadas como con la adición de una mayor cantidad de ECC. En cuanto a la fuerza requerida para extender la masa, los análisis señalan como variable significativa la adición de extracto, que podía indicar que se trata de masas más flexibles. Esto también se ve reflejado en los análisis de resistencia a la extensión, donde además las masas reposadas a 45°C opusieron una menor resistencia en comparación a aquellas reposadas a temperaturas distintas. Sin embargo, el análisis estadístico señala como variable significativa la adición de ECC en las pruebas de extensibilidad, donde se observa una menor extensibilidad conforme aumenta la cantidad de extracto añadido.

Las tortillas tratadas presentaron un menor peso, mayor diámetro, fueron más delgadas, presentaron volumen específico mayor y un decremento en la humedad en comparación con aquellas no adicionadas con ECC. También se observa una disminución significativa en la A_w conforme incrementa la cantidad de extracto añadido. Las pruebas de textura de las tortillas muestran una disminución significativa en la fuerza necesaria para enrollar la tortilla, el trabajo y el módulo de deformación, fuerza máxima y trabajo evaluados en las pruebas de extensibilidad con la adición de extracto. La distancia de ruptura también muestra disminución, aunque no significativa, con la adición de ECC en la formulación.

Las proteasas de origen vegetal, y en especial *S. elaeagnifolium*, son enzimas que pueden ser empleadas en la industria de panadería como agente proteolítico



sobre la red de gluten tanto para ablandar y formular una masa que se expanda con mayor facilidad como para obtener tortillas con un mayor diámetro y más delgadas, con características de textura deseables.

9. REFERENCIAS

- Agoreyo, B. O., & Fregene, R. O. (2014). Variations in Amylase and Invertase activities in *Solanum* species (Eggplants) during ripening. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 18(2), 283. <https://doi.org/10.4314/jasem.v18i2.20>
- Aladejana, O. M., Oyedeji, O., Omoboye, O., & Bakare, M. (2020). Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (*Dioscorea rotundata*) tuber. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(1), 154–171. <https://doi.org/10.15835/nsb12110521>
- Badui Dergal, S. (2016). Salvador Badui Dergal. In *Química de los alimentos*.
- Balakireva, A. V., & Zamyatnin, A. A. (2016). Properties of gluten intolerance: Gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/nu8100644>
- Bandyopadhyay, K., Misra, G., & Ghosh, S. (2008). Preparation and characterization of protein hydrolysates from Indian defatted rice bran meal. *Journal of Oleo Science*, 57(1), 45–52. <https://doi.org/10.5650/jos.57.47>
- Barros, F., Alviola, J. N., & Rooney, L. W. (2010). Comparison of quality of refined and whole wheat tortillas. *Journal of Cereal Science*, 51(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.10.001>
- Bijlwan, M., Naik, B., Sharma, D., Singh, A., & Kumar, V. (2019). *Recent developments in dough based bakery products : A mini review*. 8(5), 654–658.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandner, S., Becker, T., & Jekle, M. (2019). Classification of starch-gluten networks into a viscoelastic liquid or solid, based on rheological aspects — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.160>
- Cao, X., Tong, J., Ding, M., Wang, K., Wang, L., Cheng, D., ... Gao, X. (2019). Physicochemical properties of starch in relation to rheological properties of wheat dough (*Triticum aestivum* L.). *Food Chemistry*, 297(June), 125000. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125000>

- Carballo-Carballo, D. E., & Leal-Ramos, M. Y. (2015). *Evaluación de La Actividad Proteolítica de Las Bayas de Trompillo (Solanum Elaeagnifolium Var. Cavanilles) Sobre La Terneza y Propiedades FísicoQuímicas de La Carne de Vacas Viejas*. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Cauvain, S., & Young, L. (2001). 4 Improvers. In *Baking problems solved* (pp. 41–47). Boca Raton, FL: Woodhead Publishing Limited.
- CEDRSSA. (2020). *Distribución de granos básicos: Lugar de adquisición o compra* (Vol. 148).
- Chávez-Garay, D. R., Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, M. E., & García-Triana, A. (2016). Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries of *Solanum elaeagnifolium*. *CYTA - Journal of Food*, 14(2), 200–205. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1080763>
- Cottrell, J. E., Duffus, C. M., Paterson, L., Mackay, G. R., Allison, M. J., & Bain, H. (1993). The effect of storage temperature on reducing sugar concentration and the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. *Potato Research*, 36(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/BF02358725>
- Dun&Bradstreet. (2018). Análisis de la Industria de Alimentos y Bebidas. *Economic Analysis*.
- Fennema, O. R. (2017). Fennema's food chemistry. In S. Damodaran & K. L. Parkin (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (Fifth Edit). <https://doi.org/10.1201/9781315372914>
- Freundt, E. A. (1983). Proteolytic Activity. *Methods in Mycoplasmaology*, 10(1), 367–371. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-583801-6.50061-5>
- Garg, S., Cran, M. J., & Mishra, V. K. (2019). Effect of heating and acidic pH on characteristics of wheat gluten suspension. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1892–1900. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14097>
- Gutiérrez-Méndez, N., Balderrama-Carmona, A., García-Sandoval, S. E., Ramírez-Vigil, P., Leal-Ramos, M. Y., & García-Triana, A. (2019). Proteolysis and rheological properties of cream cheese made with a plant-derived coagulant from *solanum elaeagnifolium*. *Foods*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/foods8020044>
- Gutiérrez-Méndez, N., Chávez Garay, D. R., & Jiménez Campos, H. (2012). Exploring the

- milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles. *Journal of Food Science*, 77(1), 89–94. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02468.x>
- Hafeez, M., Jeyakumar, E., Singh, A. K., & Lawrence, R. (2016). *Purification and characterization of thermostable α -amylase obtained from sugar cane bagasse with solid state fermentation by Bacillus licheniformis*. (1978), 12–14.
- Hardt, N. A., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2015). Starch facilitates enzymatic wheat gluten hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.010>
- Hemdane, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Verspreet, J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2016). Wheat (*Triticum aestivum* L.) Bran in Bread Making: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 28–42. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12176>
- Hernández-Ocuna, L., Guzmán-Ceferino, J., Viveros-Pérez, L. D., López-Ramos, R. G., Sierra-Rivera, C. A., López-López, L. I., ... Silva-Belmares, S. Y. (2018). Evaluación antioxidante y efecto tóxico de extracto fenólico crudo y parcialmente purificado del fruto de *Solanum elaeagnifolium* Cavanilles . RESUMEN : ABSTRACT : *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 301–306.
- Inglett, G. E., & Munck, L. (2013). CEREALS FOR FOOD AND BEVERAGES. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kulp, K. (1993). Enzymes as dough improvers. In K. B.S. & S. C.E. (Eds.), *Advances in Baking Technology* (First edit, pp. 152–178). <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7256-9>
- Le Manguer, M. (2017). Mechanics and Influence of water binding on water activity. In *Water Activity: Theory and Applications to Food* (p. Chapt. 1). USA: Marcel Dekker.
- Liu, T., Hou, G. G., Cardin, M., Marquart, L., & Dubat, A. (2017). Quality attributes of whole-wheat flour tortillas with sprouted whole-wheat flour substitution. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.017>
- López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, 116(August 2018), 419–429.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.056>

- Machado de Castro, A., & Dias Ribeiro, B. (2013). Methods for Detection of Amylolytic Activities. In S. Vermelho, A.B. and Couri (Ed.), *Methods to Determine Enzymatic Activity* (pp. 100–124). <https://doi.org/10.2174/9781608053001113010009>
- MacRitchie, F. (2010). Concepts in Cereal chemistry. In *Journal of the American Dietetic Association* (Vol. 94). [https://doi.org/10.1016/0002-8223\(94\)92381-7](https://doi.org/10.1016/0002-8223(94)92381-7)
- Mancera-valencia, F. J. (2016). *Patrimonio Gastronómico de Chihuahua* . pdf.
- Muñoz de Chávez, M., Ledesma Solano, J. A., Chávez Villasana, A., Pérez-Gil Romo, F., Mendoza Martinez, E., & Calvo Carrillo, C. (2010). *Composición de alimentos* (2°; J. de L. Fraga, Ed.). México D.F.: McGraw Hill.
- Naili, B., Sahnoun, M., Bejar, S., & Kammoun, R. (2016). Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase production. *Food Science and Biotechnology*, 25(1), 185–192. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0028-4>
- Nawrocka, A., Krekora, M., Niewiadomski, Z., Szymańska-Chargot, M., Krawęcka, A., Sobota, A., & Miś, A. (2020). Effect of moisturizing pre-treatment of dietary fibre preparations on formation of gluten network during model dough mixing – A study with application of FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *Lwt*, 121(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108959>
- Nielsen, S. S. (2017). Food Analysis Fifth Edition. In *Food Analysis*. <https://doi.org/10.1038/1841347a0>
- NORMA OFICIAL MEXICANA. (2008). NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de. *Nom-247-Ssa1-*, 117. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/NOMcereales_12434.pdf
- OMS. (n.d.). OMS | Enriquecimiento de la harina de trigo. Retrieved February 5, 2020, from <https://www.who.int/elena/titles/wheat-flour-fortification/es/>
- Parimala, K. R., & Sudha, M. L. (2015). Wheat-Based Traditional Flat Breads of India. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(1), 67–81. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.647121>
- Pérez Lizaur, A. B. (2014). *Smae: Sistema Mexicano De Alimentos Equivalentes* (p. 160).

p. 160.

- Primo Martin, C. (2017). *Enzymes in Wheat Flour Tortilla All about Tortillas* (T. T. Conference, Ed.). Barcelona: MAURI Technology.
- Rathod, J. H. (2008). *Understanding the Origins of Stickiness in Wheat Flour Tortillas and Devising Strategies to Reduce It*. (May).
- Ribeiro De Barros, F. A. (2009). *Wheat flour tortilla: quality prediction and study of physical and textural changes during storage* (Texas A&M University).
- Rivera, H. (2017). *Gluten, Food Sources, Properties and Health implications*. New York, USA: NOVA.
- Rooney, L. W., & Serna-Saldivar, S. O. (2015). Tortillas Wheat flour and Corn products. In *AACC International*. <https://doi.org/10.1016/b978-1-891127-88-5.50014-1>
- Ruiz-Gutiérrez, M. G., Quintero-Ramos, A., Meléndez-Pizarro, C. O., Talamás-Abbud, R., Barnard, J., Márquez-Meléndez, R., & Lardizábal-Gutiérrez, D. (2012). Nixtamalization in two steps with different calcium salts and the relationship with chemical, texture and thermal properties in masa and tortilla. *Journal of Food Process Engineering*, 35(5), 772–783. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00627.x>
- Sadik, S. K., Issa, F. H., & El-kabby, E. A. (2016). *Effect of Gibberellic acid and Trichoderma SPP efficiency on seeds germination , speed Percentage , the activity of Peroxidase and Amylase enzyme of two eggplant (Solanum melongena) Hybrids*. 4, 1112–1114.
- Saptadip, S. (2020). Enhancement of Characteristics and Potential Applications of Amylases: A Brief Review. *American Journal of Pure and Applied Biosciences*, 2(2), 24–35. <https://doi.org/10.34104/ajpab.020.24035>
- SIAP-SAGARPA. (2018). Atlas agroalimentario 2018. Retrieved December 5, 2019, from Atlas agroalimentario website: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- SIAP-SAGARPA. (2020). Avance de Siembras y Cosechas: Resumen por estado. Retrieved September 8, 2021, from http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do



- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). *Microbial Proteases in Commercial Applications*. 4(November), 365–374.
- Sliwinski, E. L., Kolster, P., Prins, A., & Van Vliet, T. (2004). On the relationship between gluten protein composition of wheat flours and large-deformation properties of their doughs. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 247–264.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.10.006>
- Tufail, T., Saeed, F., Arshad, M. U., Afzaal, M., Rasheed, R., Bader UI Ain, H., ... Shahid, M. Z. (2019). Exploring the effect of cereal bran cell wall on rheological properties of wheat flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, (November 2019), 1–5.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14345>
- Vikso-Nielsen, A., Christensen, T. M. I. E., Bojko, M., & Marcussen, J. (1997). Purification and characterization of β -amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 99(1), 190–196. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.990126.x>

10. APÉNDICES

10.1 Apéndice I: Curva de calibración para cuantificación de proteína con método Bradford.

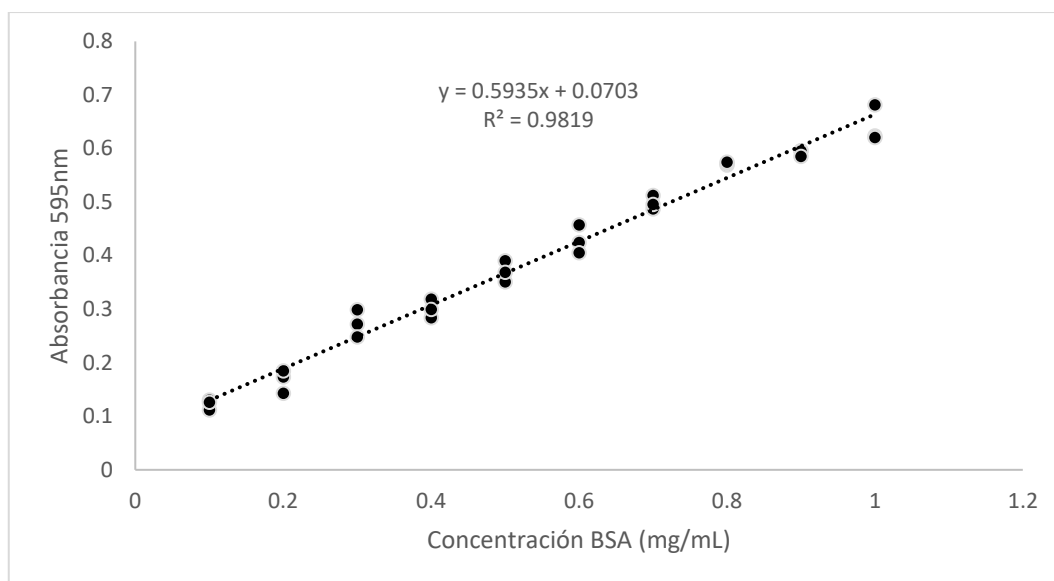


Figura 58. Curva de calibración con suero de albúmina bovina (BSA).

10.2 Apéndice II: Curva de calibración para determinación de actividad proteolítica por metodología modificada de McDonald et.al.

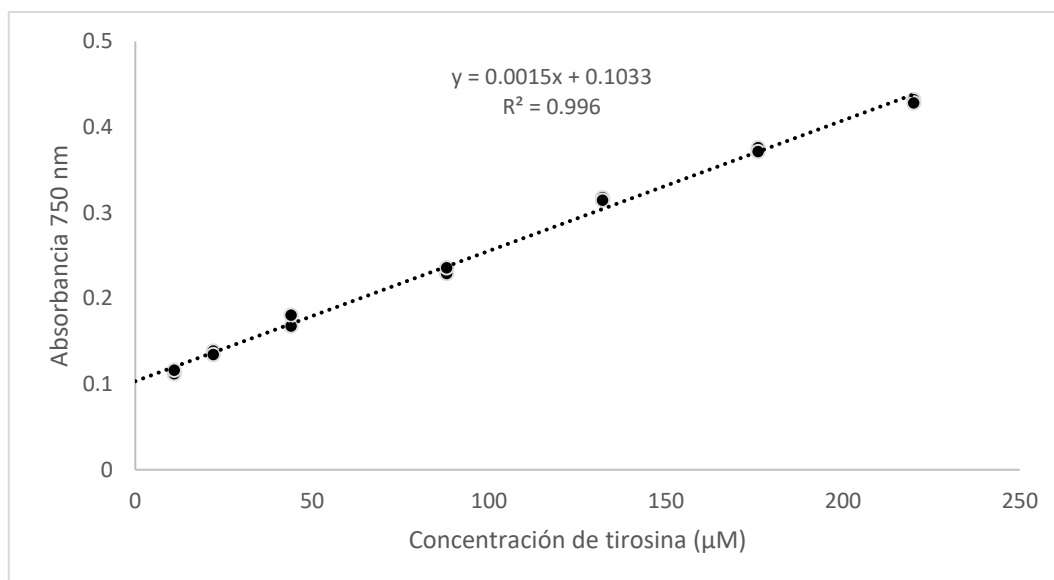


Figura 59. Curva de calibración de Tirosina

10.3 Apéndice III: Curva de calibración para la determinación de actividad amilolítica, metodología modificada de Machado de Castro y Días Ribeiro.

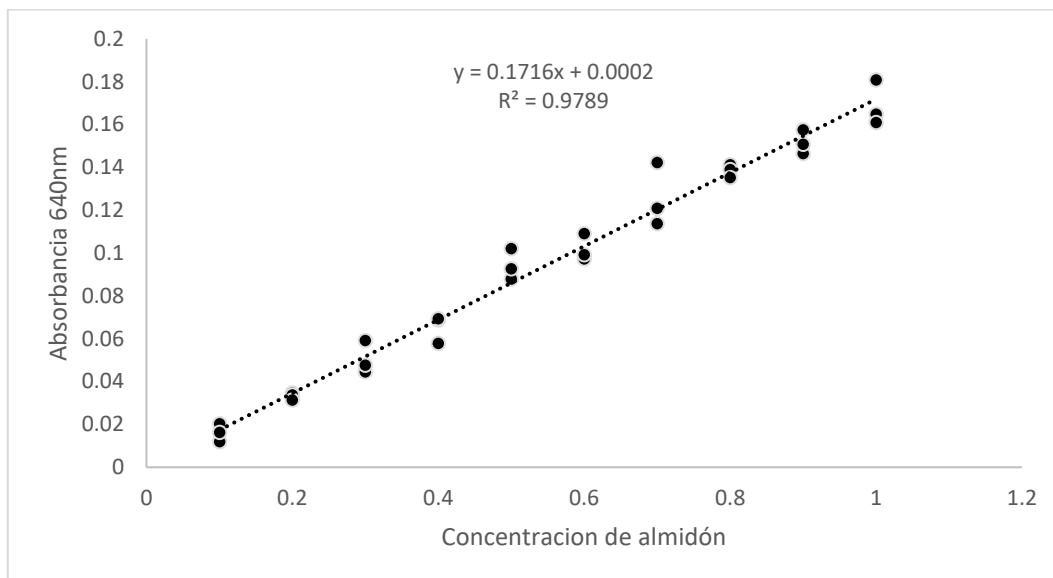


Figura 60. Curva de calibración con almidón soluble para yodometría

10.4 Apéndice IV: Curva de perfil de textura típica para masa de harina de trigo (TPA).

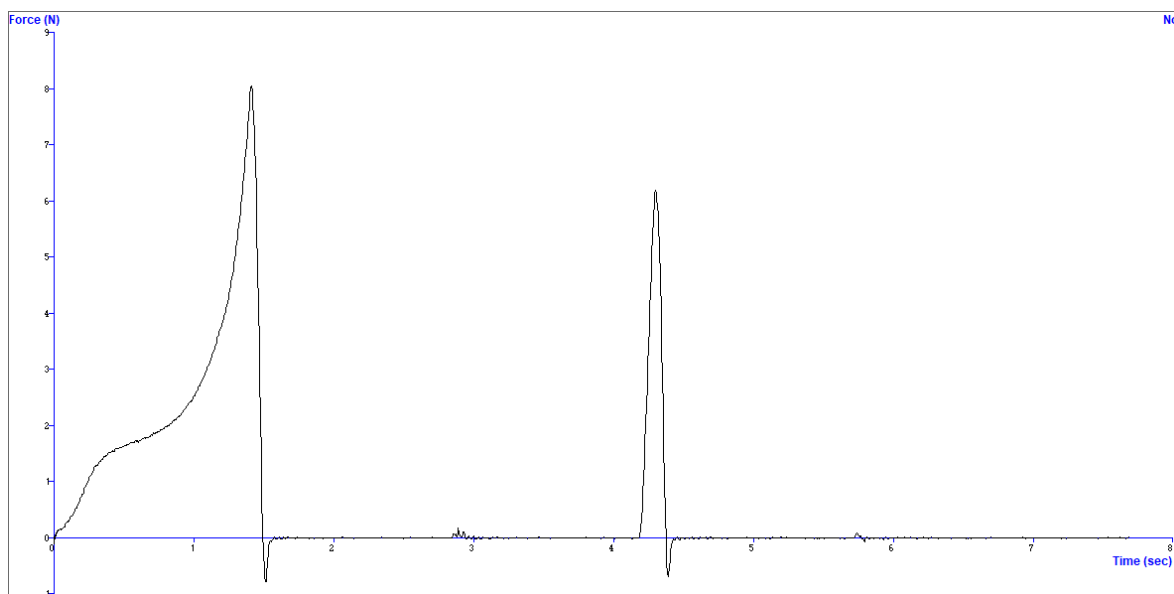


Figura 61. Curva de perfil de textura típica para masa de harina de trigo (TPA).

10.5 Apéndice V: Una curva típica para análisis de extensibilidad de la masa

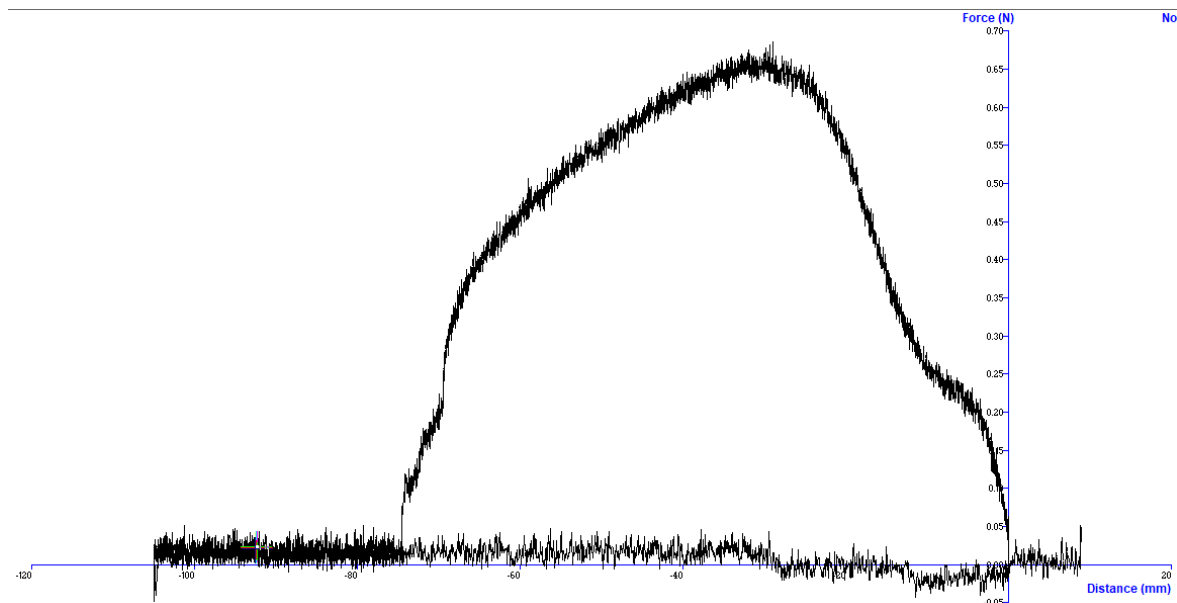


Figura 62. Curva de extensibilidad de la masa

10.6 Apéndice VI: Curva típica para análisis de rolabilidad de las tortillas

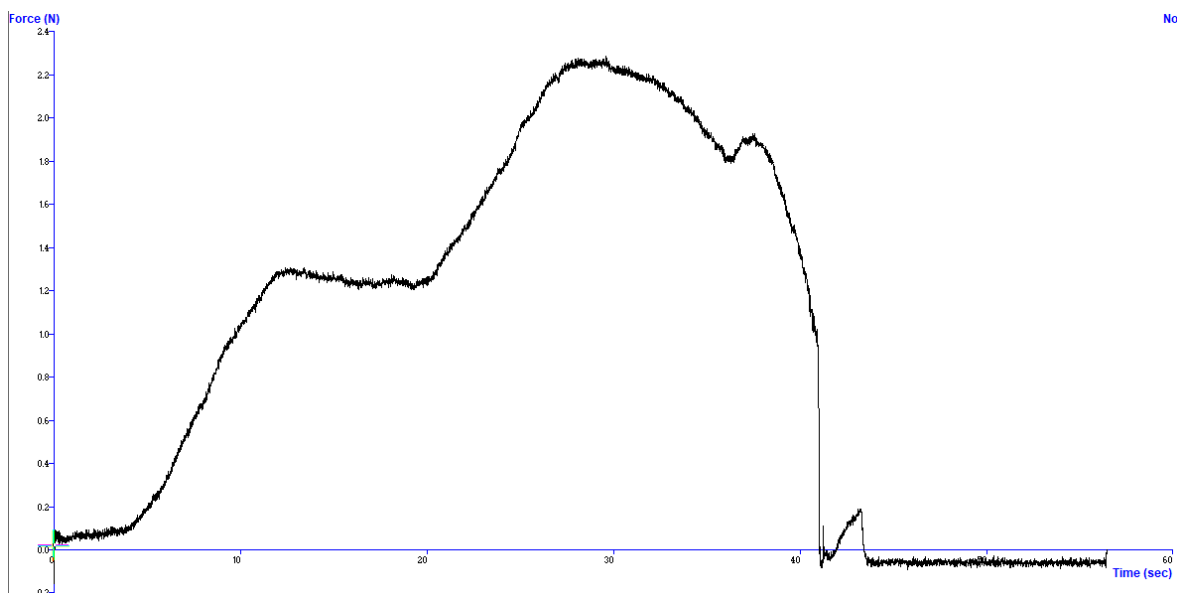


Figura 63. Curva de análisis de rolabilidad de tortillas de harina

10.7 Apéndice VII: Curva típica para análisis de extensibilidad de las tortillas

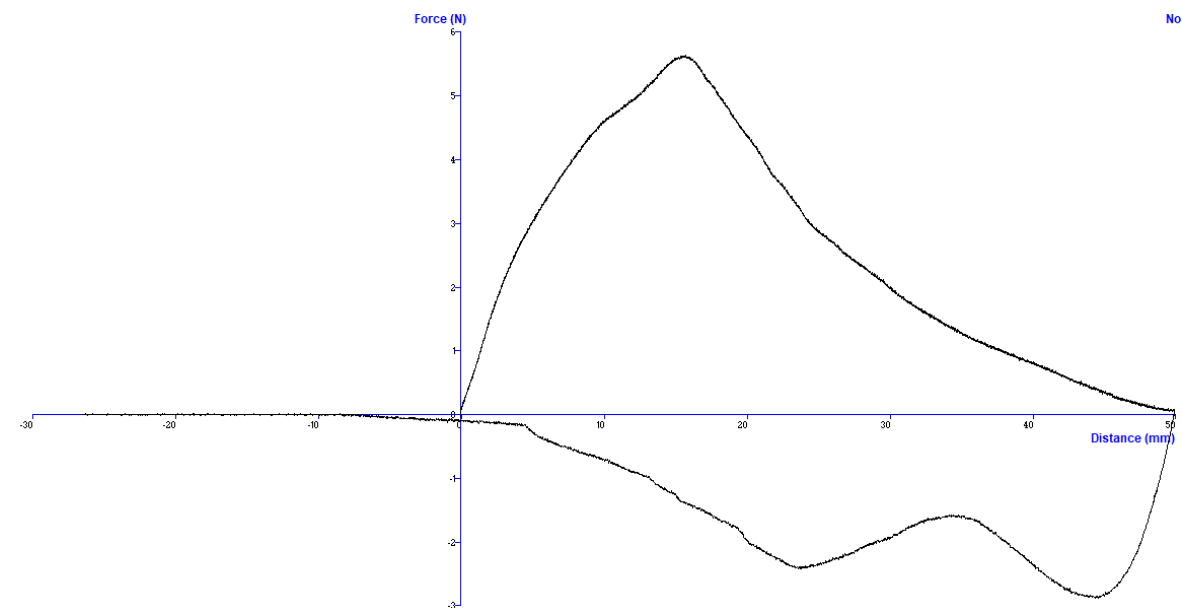


Figura 64. Curva de análisis de extensibilidad de las tortillas.