



# Microestructura de harinas tratadas con glucosa oxidasa y amiloglucosidasa

Medina Vargas O J <sup>1</sup>, Moreno Bastidas L M<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. , UPTC, Tunja, Colombia, ojmv2003@yahoo.es.

## ABSTRACT

To improve the quality of dough diverse enzymatic treatments have been applied in the last few years. However, the effect has not been studied of these treatments on the microstructure. The objective of this work is the study of the effect of the combined addition of the enzymes glucoseoxidase (GOX) and amyloglucosidase (AMG), on the protein fraction and the microestructure of dough and gluten. Dough is studied by Scanning Electron Microscopy (SEM), and the gluten using Cryo-Scanning Electron Microscopy (CRYO-SEM). When 500 mg×Kg<sup>-1</sup> of the enzyme AMG is added to samples previously treated with 10 mg×Kg<sup>-1</sup> of GOX, a reinforcement of the net work of gluten is observed with an intensification of the interaction of protein-protein. It could be attributed to an increase of the activity of the enzyme GOX, which has more glucose provided by the activity amyloglucosidase.

## KEY WORDS

Amyloglucosidase, Glucoseoxidase, Dough, Gluten, Cryo-Scanning Electron Microscopy, Scanning Electron Microscopy.

## RESUMEN

Para mejorar la calidad de las masas panarias, en los últimos años se han aplicado diversos tratamientos enzimáticos, aunque no se ha profundizado en el efecto de estos tratamientos sobre la microestructura. El objetivo de este trabajo es el estudio del efecto de la adición conjunta de las enzimas glucosaoxidasa (GOX) y amiloglucosidasa (AMG), sobre la fracción proteica y la microestructura de la masa y el gluten. Las masas se estudian por microscopía electrónica de barrido (SEM) y el gluten por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (CRYO-SEM).

En el análisis microestructural, cuando se adiciona la enzima AMG (500 mg×Kg<sup>-1</sup>) a muestras tratadas con 10 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX se observa un reforzamiento de la red de gluten con intensificación de las interacciones proteína-proteína, que se podría atribuir a una mayor actividad de la enzima GOX, al disponer de mayor cantidad de sustrato (glucosa) proporcionado por la actividad amiloglucosidasa.

## PALABRAS CLAVES

Glucosaoxidasa, amiloglucosidasa, microestructura, gluten, microscopía electrónica de barrido (SEM), Crio-SEM, análisis microestructural



## INTRODUCCIÓN

Las propiedades funcionales de las masas panarias dependen fundamentalmente de las proteínas que constituyen el gluten (gliadinas y gluteninas). Para mejorar la calidad de estas masas, en los últimos años se han aplicado diversos tratamientos enzimáticos y se ha esclarecido el mecanismo de acción de algunas enzimas sobre la fracción de proteínas del gluten. La glucosaoxidasa (GOX), en presencia de agua y oxígeno, cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Velmulapalli y Hoseneey, 1998). El peróxido de hidrógeno es capaz de convertir los grupos tiol de las proteínas en nuevos enlaces disulfuro con la formación de masas más elásticas y más resistentes al esfuerzo mecánico (Haarasilta et al., 1991; Nakai et al., 1995). El contenido en sulfidrilos de la fracción de proteínas solubles en agua de la harina o de la masa disminuye en presencia de la enzima (Velmulapalli y Hoseneey, 1998). El mecanismo de acción de la glucosaoxidasa en el proceso de panificación no está claro. Algunos autores han investigado el efecto del peróxido de hidrógeno sobre las propiedades reológicas de las masas y han comprobado que este compuesto mejora el volumen de la miga (Van Oort, 1996); la incorporación de sequestradores de radicales libres a la masa disminuye el efecto de la enzima, lo cual apoya la hipótesis que el  $H_2O_2$  es uno de los componentes activos que afectan las propiedades de las masas (Velmulapalli et al., 1998). Otros autores (Xia et al., 1999) sugieren que la aplicación de esta enzima a dosis de hasta 20 mg/kg incrementa el volumen del pan en 14.5% y proporciona una textura porosa más fina. La actividad glucosaoxidasa parece que favorece la oxidación de las proteínas, aumenta la tenacidad del gluten, reduce su extensibilidad, incrementa la retención de gas y aumenta el volumen del pan (Velmulapalli et al., 1998; Rossel et al., 2003).

Tilley et al. (2001) proponen que la glucosaoxidasa podría desempeñar un importante papel en la estructura del gluten, porque induce la formación

de puentes de tirosina. Sin embargo, no existen estudios que relacionen la actividad de la enzima glucosaoxidasa con modificaciones en los componentes estructurales de las masas panarias.

Algunos autores (Medina et al., 2004) han estudiado el efecto de la adición de diversas dosis de glucosaoxidasa, adicionada con y sin glucosa, sobre las proteínas de la masa panaria, y su repercusión microestructural en la red de gluten. Se observa que la adición de glucosa intensifica el efecto observado cuando la GOX se añade sola. La enzima amiloglucosidasa (AMG) actúa sobre los enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) del almidón y libera unidades de glucosa y otros oligosacáridos. Esta acción de la enzima la haría interesante para aprovechar la glucosa que libera a partir del almidón en la masa panaria y que es el sustrato de la glucosaoxidasa.

Algunos autores han comprobado, que tanto la  $\alpha$ -amilasa como la amiloglucosidasa hidrolizan eficazmente el almidón en procesos de panificación convencional, y que ciertas modificaciones tecnológicas, como procesos en los que se lleva a cabo fermentación ácida, disminuyen la actividad de estas enzimas (Siljeström et al., 1988; Eynard et al., 1995).

Greenwell et al. (1985) estudian la interacción de las proteínas con la superficie de los gránulos de almidón en el proceso de panificación, y ven que estos son hidrolizados por las enzimas amilolíticas. Guerrieri et al. (1997) observan que ciertas proteínas (BSA, gliadinas, gluten purificado y subunidades de gluteninas de alto peso molecular) modifican la actividad amiloglucosidasa en sistemas modelo. Parece ser que la influencia de los distintos sustratos utilizados está relacionada con la interacción proteína-almidón, especialmente en las últimas etapas de la panificación, cuando tiene lugar la gelatinización del almidón.

El objetivo de este trabajo ha sido el estudio del efecto de la adición conjunta de diversas



dosis de las enzimas glucosa oxidasa y amiloglucosidasa, sobre la fracción proteica y la microestructura de las masas y del gluten.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Elaboración de las masas

Se utiliza harina de trigo tipo florentina con un grado de extracción del 73%, humedad del 13% y energía de deformación  $W = 105 \times 10^{-4}$  J (que indica que es una harina floja).

Las masas se elaboran en un equipo automático Bakery, modelo Fab 2200 de Funai, en el cual se mezcla durante 4 minutos 200 g de harina y 112 ml de agua destilada (56:44), y se deja reposar 15 minutos en la amasadora. Las masas tratadas se elaboran según el mismo procedimiento, pero se mezcla el agua y la harina con diferentes dosis de glucosa oxidasa:  $10 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  y  $100 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ , respectivamente. También se elaboran masas con esas mismas dosis de glucosa oxidasa, a las que se añade  $500 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  y  $2000 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  de amiloglucosidasa, respectivamente.

Tanto la GOX (EC 1.1.3.4.), como la AMG (EC 3.2.1.3.) son preparaciones enzimáticas granuladas, proporcionadas por Novozymes A/S (GOX<sup>R</sup> 10000 BG y AMG<sup>R</sup> 800 BG, respectivamente), procedentes de *Aspergillus Niger*.

Las masas obtenidas, se estudian por microscopía electrónica de barrido (SEM), y de todas ellas se extraen las fracciones proteicas y el gluten, según los procedimientos que se describen a continuación.

### Extracción de las fracciones proteicas

Las masas obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente, se congelan y liofilizan en un liofilizador Telstar Lioalfa-6, que trabaja a  $10^{-3}$  mbar con condensador a  $-45^\circ\text{C}$ , durante 24 horas.

Posteriormente se extraen las distintas fracciones proteicas (albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas), según el procedimiento propuesto por Bean y Lookhart (1998), y se

cuantifican las proteínas según el método oficial de la AOAC, (1995), basado en la determinación del N- Kjeldahl. Se calcula la cantidad de proteína ( $N \times 5.7$ ).

Se lleva a cabo un análisis estadístico de los resultados con el paquete Stat Graphics 5.1 Plus.

### Extracción del gluten

El gluten se obtiene de cada masa según la norma ICC-Standard N°106/2 propuesta por la ICC (International Association for Cereal Science and Technology).

La masa se aplasta y se estira con las manos debajo de una disolución salina que contiene 20 g de cloruro sódico (NaCl), 0.754 dihidrogenofosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 0.140 g de hidrogenofosfato de sodio dihidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), aforado a un litro de agua destilada.

Para verificar la correcta extracción del gluten se aplican unas gotas de disolución de yodo 0.001N al residuo de la disolución de lavado, y se observa si se produce un cambio de color, de rojo a azul, lo que indicaría presencia de almidón. El gluten obtenido se guarda en refrigeración hasta su estudio por Cryo-SEM.

### Técnicas microscópicas

#### MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El estudio microestructural de las masas se realiza por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410.

La muestra se corta en cubos de 2 mm de arista y se introduce en una disolución fijadora de (2 % glutaraldehído en tampón fosfato 0.025M y pH=6.8) a  $4^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Después se deshidrata la muestra en una serie de disoluciones acuosas de etanol (10, 20, 40, 60, 80, 100 %), tres cambios cada 20 minutos, y finalmente se pasa a acetona. Tras esto, las muestras se ultradeshidratan por la técnica de punto crítico con  $\text{CO}_2$  ( $P=1100 \text{ p.s.i.}$ , y  $T=32^\circ\text{C}$ )



en un equipo Polarón E3000, se montan en los soportes adecuados, y se metalizan con oro a vacío (400 mbar) en un equipo Polarón E6100. Finalmente, se observa al microscopio con un voltaje de aceleración de 10KV y una distancia de trabajo de 15 mm.

### MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO A BAJAS TEMPERATURAS (CRYO-SEM)

El estudio microestructural del gluten se realiza por Microscopía Electrónica de Barrido (Cryo-SEM). Se lleva a cabo en un equipo Cryostage CT-1500 C de Oxford Instruments, acoplado a un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410.

La muestra a estudiar se sitúa en la ranura del portamuestras directamente, se sumerge en N<sub>2</sub> nieve a temperatura < -210° C, y se transfiere rápidamente a un Cryostage a 10<sup>-2</sup> bar, donde se fractura y se metaliza a vacío (2 mbar) con oro durante 4 minutos con una corriente de ionización de 40 mA. Una vez metalizada, la muestra se observa en el microscopio electrónico de barrido a un voltaje de 10 kV, una temperatura < -130° C y una distancia de trabajo de 15 mm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de las fracciones proteicas por el método del N-Kjeldahl

Los resultados obtenidos en el análisis de proteínas, tras la adición de diversas dosis de glucosaoxidasa (GOX) sola y junto con amiloglucosidasa (AMG) a las masas, se presentan en la tabla 1. Se analiza el N-Kjeldahl de las distintas fracciones proteicas, procedentes de las masas tratadas con diversas dosis (mg×Kg<sup>-1</sup>) de GOX y AMG: albúminas y globulinas (proteínas solubles) y gliadinas y gluteninas (proteínas del gluten), y se determina el contenido en proteínas.

El aumento de la dosis de GOX desde 10 a 100 mg×Kg<sup>-1</sup> no produce cambios significativos en las fracciones de albúminas y gluteninas, aunque si una disminución en las fracciones de globulinas y gliadinas. Cuando a muestras tratadas con 10 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX se añade 500 mg×Kg<sup>-1</sup> de AMG, se observa un aumento significativo en la extracción de proteínas solubles y del gluten (Tabla 1, Fig. 1 y 2), que se atribuiría principalmente a modificaciones en la fracción de albúminas y gluteninas.

**TABLA 1.** Cantidad extraída de las distintas fracciones de proteína (g/100g harina, b.s.), procedentes de masas tratadas con diversas dosis (mg × Kg<sup>-1</sup>) de GOX y AMG, analizada por el método del N-Kjeldahl (N x 5.7). (GOX = glucosidasa; AMG = amiloglucosidasa).

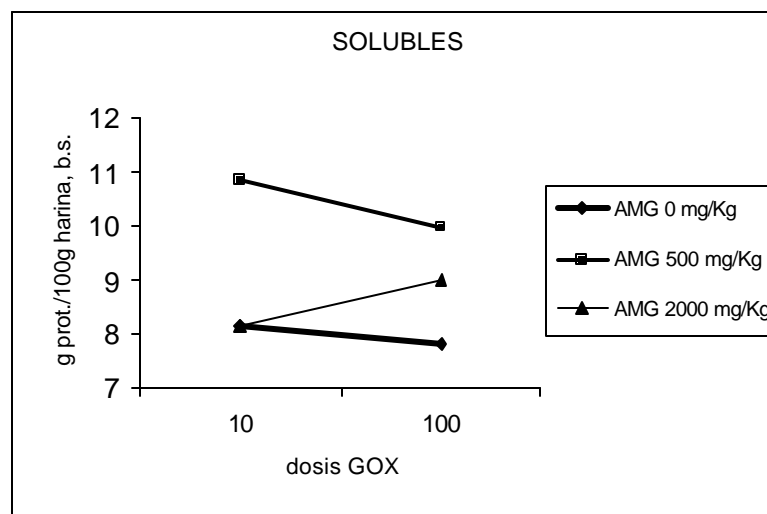
EXTRACTOS PROTEICOS	GOX 10	GOX 100	GOX+AMG 10+500	GOX+AMG 10+2000	GOX+AMG 100+500	GOX+AMG 100+2000
ALBÚMINAS	3.47±0.15	3.55 ±0.22	5.11 ±0.39	2.51±0.30	3.12±5.9e-8	2.51 ±0.30
GLOBULINAS	4.69±0.24	4.25 ±0.24	5.72±0.26	5.63±0.30	6.85±0.15	6.50±0.26
TOTAL SOLUBLES	8.16±0.86	7.8±0.49	10.83±0.43	8.14±2.20	9.97±2.63	9.01 ±2.82
GLIADINAS	2.02±0.20	1.59 ±0.25	1.63±0.16	2.21±0.16	2.40±0.16	2.31 ±0.28
GLUTENINAS	2.07±0.18	2.02 ±0.15	4.14±0.16	1.78±0.08	4.09±0.08	1.10 ±0.08
TOTAL GLUTEN	4.09±0.03	3.61 ±0.30	5.77±1.77	3.99±0.30	6.49±1.19	3.41 ±0.85



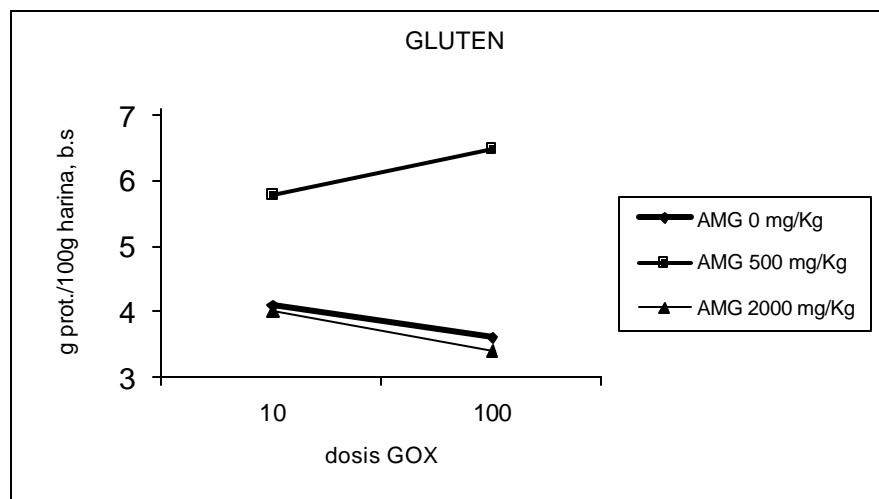
Sin embargo, el aumento en la dosis de AMG hasta  $2000 \text{ mg}\times\text{Kg}^{-1}$ , disminuye la extractabilidad tanto de la fracción de proteínas solubles (desde  $10.83$  a  $8.14 \text{ g}/100\text{g}$  de harina) como del gluten (desde  $5.77$  a  $3.99 \text{ g}/100\text{g}$  de harina) (Tabla 1; Fig. 1 y 2), lo que se podría atribuir a la formación de productos de oxidación que no se extraen en las condiciones del ensayo.

A dosis de  $100 \text{ mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de GOX, si se comparan las muestras con  $500$  y  $2000$

$\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de AMG (Tabla 1, Fig. 1 y 2), los resultados observados al aumentar las dosis de AMG son equivalentes a los anteriores (dosis de  $10 \text{ mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de GOX). Se produce principalmente una disminución de albúminas y gluteninas, con la consiguiente disminución de la fracción soluble (desde  $9.97$  a  $9.01 \text{ g}/100\text{g}$  de harina) y del gluten (desde  $6.49$  a  $3.41 \text{ g}/100\text{g}$  de harina), que podría estar relacionado igualmente con la formación de polímeros no extraíbles en las condiciones del ensayo.



**FIGURA 1.** Evolución de la cantidad de proteínas solubles (albúminas + globulinas) extraídas de las masas (g de proteína / 100 g de harina), tratadas con distintas dosis de GOX y AMG ( $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$ ).



**FIGURA 2.** Evolución de la cantidad de proteínas del gluten (gluteninas + gliadinas) extraídas de las masas (g de proteína / 100 g de harina), tratadas con distintas dosis de GOX y AMG ( $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$ ).



### Microestructura del gluten

La figura 3 muestra las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM) del gluten extraído de masas tratadas con distintas dosis de GOX (10 y 100 mg×Kg<sup>-1</sup>, respectivamente), así como los tratamientos simultáneos de GOX, con 500 y 2000 mg×Kg<sup>-1</sup> de AMG, respectivamente.

Las figuras 3A y 3B de gluten extraído de masas tratadas con 10 y 100 mg×Kg<sup>-1</sup>, respectivamente, se utilizan como referencia, ya que en otros trabajos, otros investigadores (Medina et al., 2004) ya han estudiado el efecto de GOX comparado con muestras de gluten no tratado, y se ha demostrado que el tratamiento con 10 mg×kg<sup>-1</sup> de GOX produce un reforzamiento de la red de proteínas del gluten con respecto al gluten no tratado. La utilización de dosis más elevadas 100 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX (Fig. 3B), parece producir un desequilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-agua, de forma que la red de gluten se observa más discontinua, con zonas en las que se acumula agua o predomina la interacción proteína-agua.

Cuando se adiciona 500 mg×Kg<sup>-1</sup> a las muestras tratadas con 10 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX (Fig. 3C), se observa una red de gluten reforzada, con intensificación de las interacciones proteína-proteína que se podría atribuir a una mayor actividad de la enzima GOX, al disponer de más cantidad de sustrato (glucosa) proporcionado por la actividad amiloglicosidasa.

Los productos de oxidación generados por la actividad glucosaoxidasa afectan la estructura del gluten y especialmente a la fracción de gluteninas tal y como se ha podido comprobar en el análisis de proteínas en este mismo trabajo (Tabla 1 y Fig.2).

Si se adicionan cantidades más elevadas de AMG (2000 mg×Kg<sup>-1</sup>) a muestras tratadas con 10 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX, el efecto sobre la estructura del gluten (Fig. 3E) es el de la

formación de una red más discontinua, donde aparentemente se potencian las interacciones proteína-agua. Cuando se añaden 500 mg×Kg<sup>-1</sup> de AMG a muestras tratadas previamente con 100 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX (Fig. 3D), el efecto sobre la estructura del gluten es equivalente.

El aumento de la dosis de AMG (2000 mg×Kg<sup>-1</sup>) a muestras tratadas con 100 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX (Fig. 3F), no muestra diferencias respecto a las que se tratan con dosis más bajas de AMG (Fig. 3D).

En resumen, el tratamiento (10 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX + 500 mg×Kg<sup>-1</sup> AMG) (Fig. 3C), parece ser el más adecuado para conseguir una estructura del gluten más homogénea en la que se ven reforzadas las interacciones proteína-proteína.

### Microestructura de las masas

En la figura 4 se presentan las micrografías obtenidas por SEM de la masa control no tratadas, así como de las masas tratadas con distintas dosis de GOX. Si se compara la masa control (Fig. 4A) sin tratamiento, con masas tratadas con dosis de 10 y 100 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX, respectivamente, se observa que el aumento de la dosis de GOX (Fig. 4B y 4C) produce una red de gluten más continua donde las interacciones proteína-proteína y proteína-almidón se ven reforzadas.

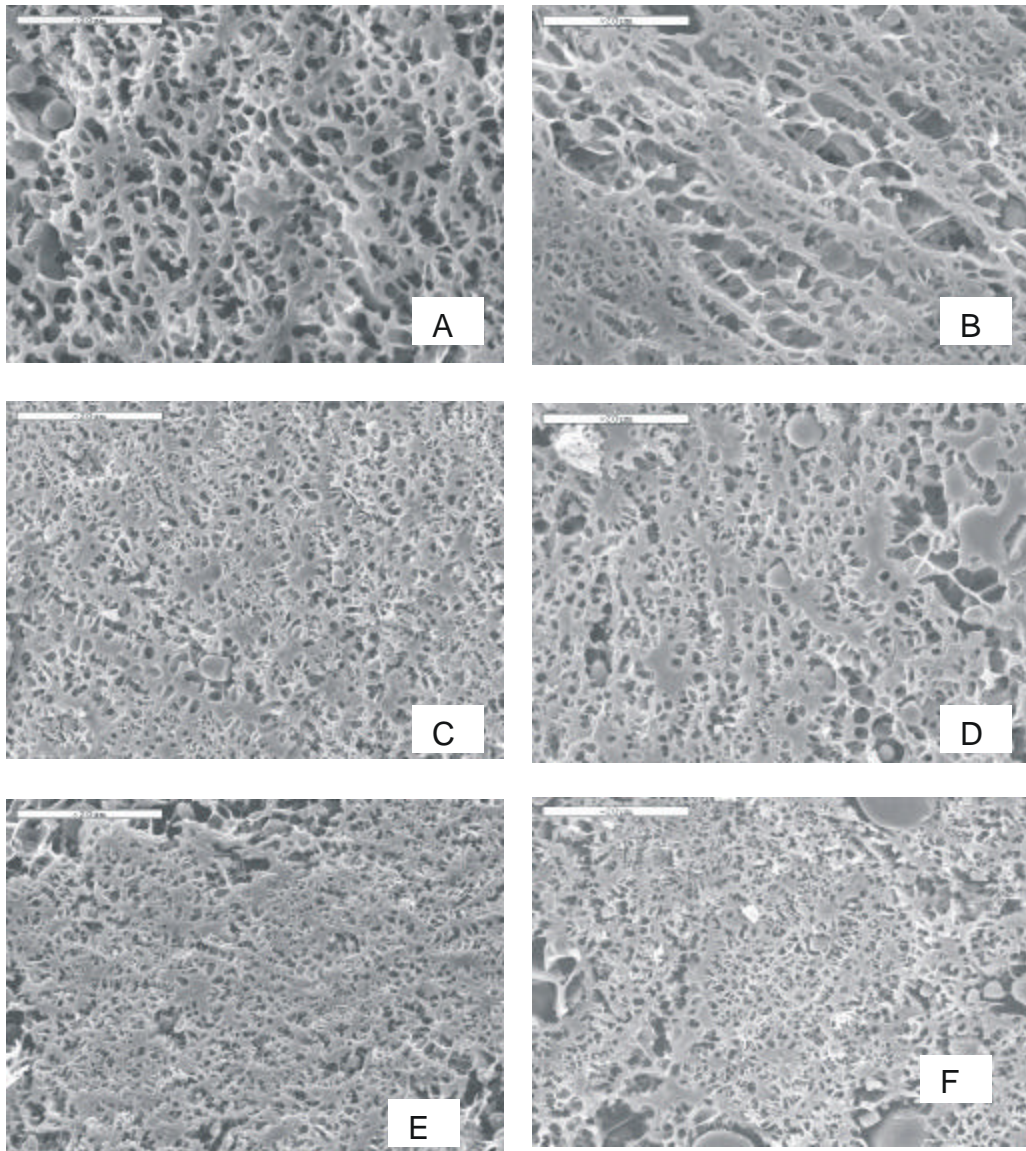
En la figura 5 se presentan las micrografías de las masas tratadas con distintas dosis de GOX, así como de las distintas combinaciones de GOX y AMG. La masa tratada con 10 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX + 500 mg×Kg<sup>-1</sup> de AMG (Fig. 5C), muestra una red de proteínas continua con zonas en las que la red proteica adquiere una estructura a modo de cuerdas que refleja la intensificación de las interacciones proteína-proteína en esta muestra.

El aumento de la dosis de AMG (2000 mg×Kg<sup>-1</sup>) a muestras tratadas con 10 mg×Kg<sup>-1</sup> de GOX, respectivamente (Fig. 5E), genera una estructura en la que las interacciones proteína-proteína se debilitan y además los gránulos de almidón aparecen especialmente afectados

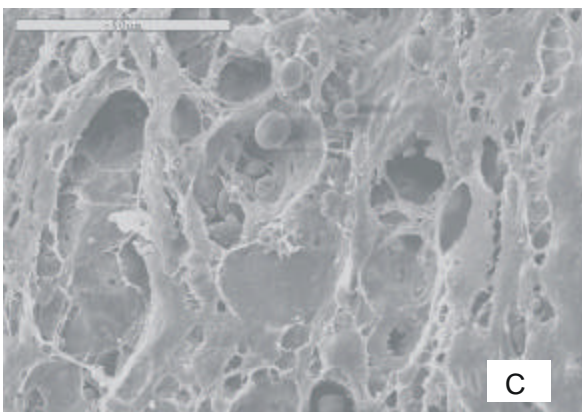
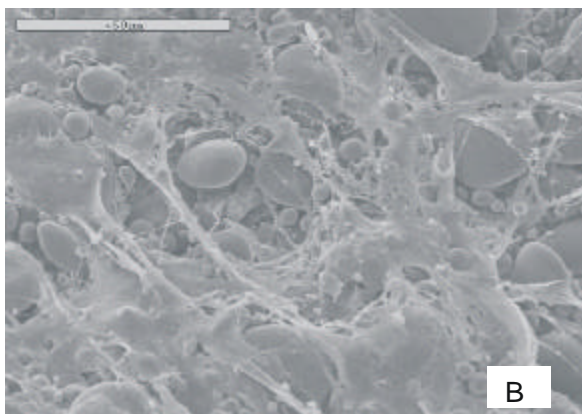
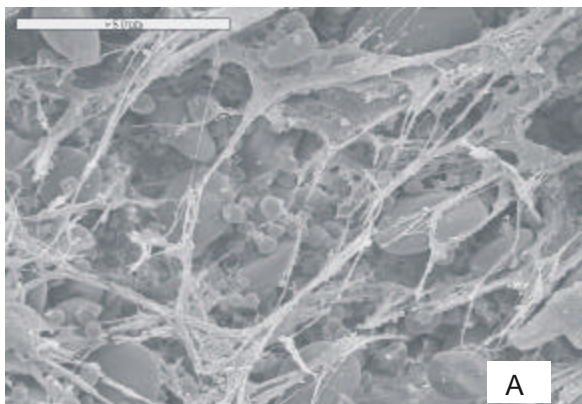


por la acción de la actividad amiloglicosidasa. Cuando se utilizan dosis de GOX de  $100 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$ , el efecto observado al añadir dosis crecientes de AMG es equivalente, aunque en el tratamiento de  $100 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  de GOX +  $2000 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  de AMG (Fig. 5F) hay que destacar una afectación más importante de la red de

proteínas y los gránulos de almidón. La alteración más importante que se produce en los gránulos de almidón a elevadas dosis de AMG, podría dificultar la interacción proteína-almidón en el proceso de formación de la masa.



**FIGURA 3.** Micrografías obtenidas por Cryo-SEM del gluten extraído de masas tratadas con:  $10 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  GOX (A);  $100 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  GOX (B);  $10 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  GOX +  $500 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  AMG (C);  $100 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  GOX +  $500 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  AMG (D);  $10 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  GOX +  $2000 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  AMG (E);  $100 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  GOX +  $2000 \text{ mg} \times \text{Kg}^{-1}$  AMG (F). (GOX: glucosaoxidasa, AMG: amiloglicosidasa).



## CONCLUSIONES

La adición de dosis crecientes de amiloglicosidasa a masas panarias tratadas con 10 y 100  $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de GOX respectivamente, produce una disminución de la extractabilidad de las fracciones solubles y del gluten. Se destaca la disminución en la fracción de gluteninas extraídas.

El tratamiento de (10  $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de GOX + 500  $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  de AMG) genera una estructura tanto del gluten como de las masas en la que se ven reforzadas las interacciones proteína-proteína, respecto a las muestras tratadas solamente con glucosaoxidasa.

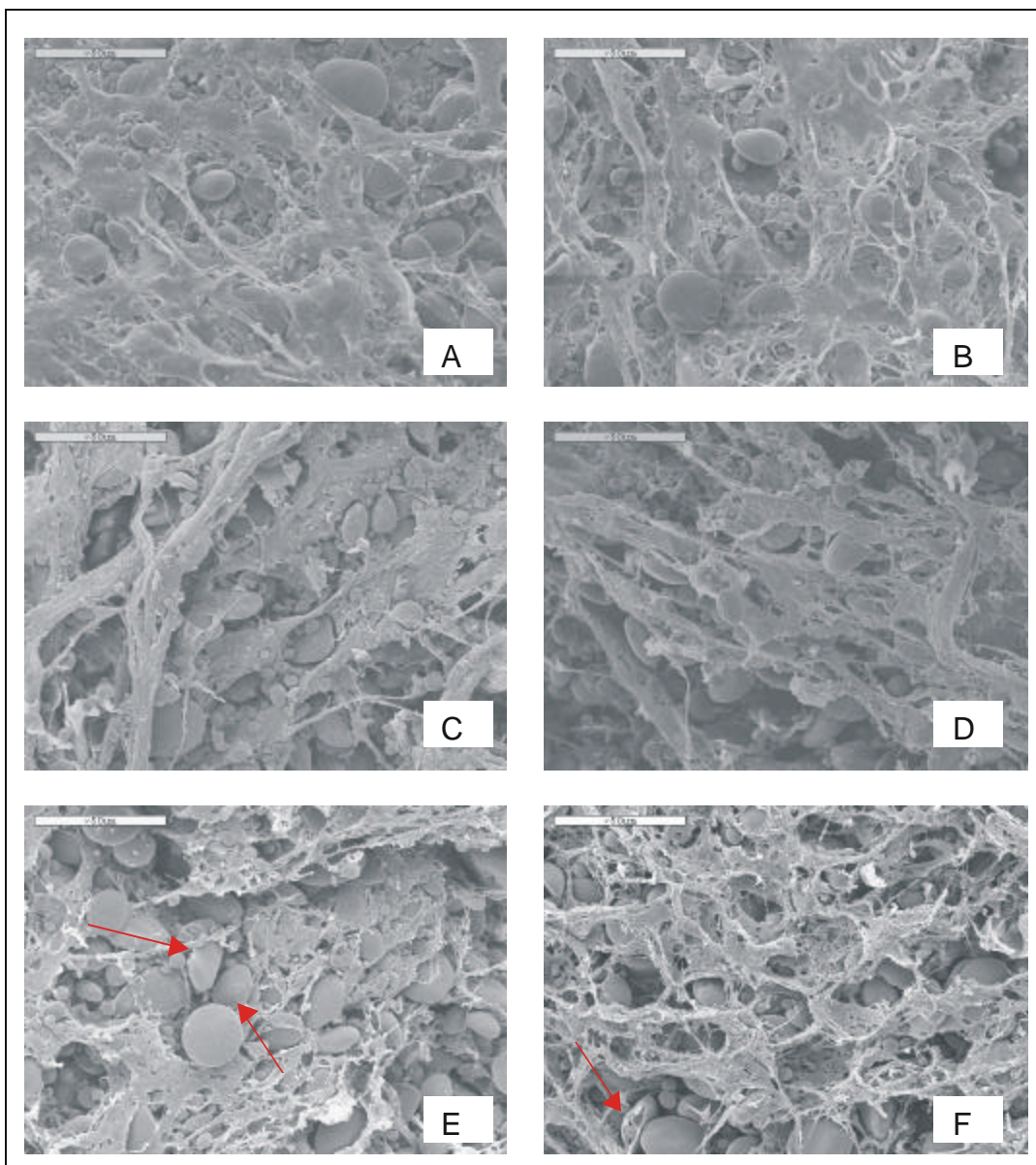
La estructura de las masas tratadas con altas dosis de AMG refleja una degradación, tanto de los gránulos de almidón como de la red de proteínas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo y colaboración de la doctora Isabel Pérez Munuera, profesora titular del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, por sus sugerencias y aportes.

**FIGURA 4.** Micrografías obtenidas por SEM de masas tratadas con: 0  $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  GOX (A); 10  $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  GOX (B) y 100  $\text{mg}\times\text{Kg}^{-1}$  GOX (C).





**FIGURA 5.** Micrografías obtenidas por SEM de masas tratadas con: 10 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX (A); 100 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX (B); 10 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX + 500 mg×Kg<sup>-1</sup> AMG (C); 100 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX + 500 mg×Kg<sup>-1</sup> AMG (D); 10 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX + 2000 mg×Kg<sup>-1</sup> AMG (E) y 100 mg×Kg<sup>-1</sup> GOX + 2000 mg×Kg<sup>-1</sup> AMG (F). (Flechas: gránulos de almidón degradados).



- Eynard, L., Guerrieri, N., and Cerletti, P. (1995). Modificatons of starch during baking: studied through reactivity with amyloglucosidase. *Cereal Chem.* 72:594-597.
- Greenwell, P., Evers, A. D., Gough, B. M., and Russel, P. L. (1985). Amyloglucosidase-catalysed erosion of native, surface-modified and chlorine-treated wheat starch granules. The influence of surface protein. *J. Cereal Sci.* 3: 279-293.
- Guerreri, N., Eynard, L., Lavelli, V., and Cerletti, P. (1997). Interactions of protein and starch studied through amyloglucosidase action.
- Haarasilta, S., Pullinen, T., Vaisanen, S., and Tammersalo-Karsten, I. (1991). Enzyme product and method of improving the properties of dough and the quality of bread. Patente EEUU, 4,990,343.
- Medina O. J., Pérez Munuera, I., Hernando, I., Quiles, A., y Lluch, M. A. (2004). Estudio de la estructura del gluten de trigo modificado por glucosaoxidasa. *Actas del X Congreso Anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Madrid)*, página 118.
- Siljeström, M., Björck, I., Eliasson, A. C., Lönner, C., Nyman, M., and Asp, N. G. (1988). Effects on polysaccharides during baking and storage of bread-in vitro and in vivo studies. *Cereal Chem.* 65: 1-8.
- Tilley, K. A., Benjamín, R., Bagorogoza, K., Okot-Kotber, M, Prakash, O. And kwen, H. (2001). Tyrosine Cross-links: Molecular basis of gluten Structure and Function. *A Agric. Food Chem.* 49: 2627-2632.
- Van Oort, M. (1996). Oxidases in baking. A review of the uses of oxidases in bread making. *Int. Food-Ingredients.* (4): 42-45.
- Vemulapalli, V. And Hosene, R. C. (1998). Glucose oxidase effects on gluten and water solubles. *Cereal Chem.* 75(6): 859-862.
- Vemulapalli, V; Miller, K. A., Hosene, R. C. (1998). Glucose oxidase in breadmaking systems. *Cereal Chem.* 75(4): 439-442.
- Xia, P., M. G., Liang, X. Y. (1999). Application of glocose oxidase to breadmaking. *Food-Industry.* (6): 23-24.
- Recibido 30 Julio 2007  
Aceptado 06 Noviembre 2007