

Evaluación de la digestibilidad in vitro de un sustituto lácteo fabricado con harinas no precocidas

Judith King y Saturnino de Pablo

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA. Universidad de Chile

RESUMEN. Los sustitutos lácteos son utilizados en el desayuno de los beneficiarios del Programa de Alimentación Escolar de la Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas en Chile. Los ingredientes principales de los sustitutos lácteos son leche, azúcar y harinas de cereales y las bases técnicas para fabricar estos productos estipulan además de sus proporciones que las harinas utilizadas deben estar precocidas lo que se evalúa determinando el grado de gelatinización de los almidones el cual debe ser mínimo de 92%. En la actualidad se ha presentado al Programa un nuevo tipo de sustituto lácteo de menor costo, formulado con harinas no precocidas y que contiene un preparado enzimático asegurándose por parte del fabricante que bajo las condiciones de reconstitución por él indicadas (85 °C y 5 min de reposo) se lograría la precocción de las harinas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la digestibilidad in vitro, el efecto del preparado enzimático incorporado (tamaño molecular de almidón y equivalente de dextrosa) y el grado de gelatinización en este producto (SLE) reconstituido bajo diferentes temperaturas y tiempos de reposo. Como testigo se utilizó el mismo sustituto lácteo pero sin la incorporación del preparado enzimático.

A 85 °C y 5 min. de reposo DV para SLE fue 93,8%. A temperaturas <85 °C y 5 min, DV disminuyó significativamente ($p > 0,05$) a 85% (75 °C), 82,2% (50 °C), 33,0% (40 °C) y 41,4% (20 °C). DV aumentó significativamente al aumentar el tiempo de reposo a 30 min. sólo para temperaturas >60 °C. Se observó que a 85 °C/min el preparado enzimático ha alcanzado un 92,1% de su capacidad hidrolítica potencial. El grado de gelatinización (GG) de SLE varió entre 42,6% (40 °C) y 93,8% (85 °C) para 5 min. de reposo, valores que aumentaron al dejar reposar por 30 minutos. El producto testigo mostró valores similares de DV y GG a SLE para todas las condiciones evaluadas. Se concluye que tanto SLE como el testigo presentan una buena digestibilidad in vitro y grado de gelatinización al reconstituir a 85 °C/5 min. Estos resultados indicarían que no es necesario precocer las harinas si se utilizan condiciones de preparación como las señaladas y que la incorporación de enzima cumpliría el objetivo de mejorar características físico químicas como la viscosidad del producto preparado.

INTRODUCCION

A través del Programa de Alimentación de la Junta Nacional de Auxilio Escolar y Becas, JUNAEB, los beneficiarios reciben diariamente en las escuelas un desayuno que consiste de un vaso de leche o de sustituto lácteo acompañado de pan o galletas. Los ingredientes principales del sustituto lácteo en polvo son harinas, leche y azúcar en proporciones que están estipuladas en las bases técnicas que son guías para la fabricación de los sustitutos lácteos. Estas mismas bases técnicas exigen que las harinas, que pueden provenir de cereales o leguminosas, deben estar precocidas para asegurar su digestibilidad y una reconstitución instantánea, tanto en agua fría como en agua tibia, y que el grado de gelatinización de los almidones debe ser mínimo 92%.

SUMMARY. *In vitro* digestibility of a milk substitute fabricated with uncooked flours. Milk substitutes are used for the breakfast of the recipients of the National School Feeding Programme in Chile. The major ingredients of milk substitutes are milk, sugar and cereal flours. The technical specifications to produce this type of food state, beside their proportions, that the flours must be precooked. This requisite is controlled by determining the gelatinization degree which must be 92% as a minimum. At present, a cheaper new alternative of milk substitute fabricated with uncooked flours and containing an enzymatic preparation has been presented to the Programme. It is postulated that when reconstituted in water under the manufacturer's directions (85 °C, 5 min settling time) precooking of the flours is reached. The objective of this work was to evaluate the in vitro digestibility, the effect of the enzymatic preparation (molecular size of starch and dextrose equivalent) and the degree of gelatinization of this product (MSE) when reconstituted under different temperatures and settling times.

The same milk substitute but without the enzyme preparation was used as Control. In vitro digestibility (VD) of MSE was 93,8 when reconstituted at 85 °C/5 min. settling time. VD decreased at lower temperatures ($p > 0,05$) to 85.5% (75 °C), 82,2% (50 °C), 33,0% (40 °C) and 41,4% (20 °C). VD showed a significant increase when settling time was raised to 30 minutes but only at reconstitution temperatures >60 °C. It was observed the enzyme present in MSE shows a 92,1% of the total potential activity when MSE is reconstituted at 85 °C/5 min. The degree of gelatinization, DG, ranged between 42,6% (40 °C) and 93,8% (85 °C) for 5 min settling time. These values increased after 30 min settling time. VD and DG values for Control were similar to MSE for all the conditions evaluated. It is concluded that both MSE and Control have a good in vitro digestibility and degree of gelatinization when the manufacturer's directions are followed. These results suggest that under these reconstitution conditions precooking of the flours could not be necessary and that the incorporation of enzyme in the formulation has the role of improving some physico chemical characteristics such as the viscosity of the substitute once reconstituted.

Es sabido que la digestibilidad de los almidones depende de una variedad de factores como son, la naturaleza del almidón, la posible presencia de inhibidores, o el grado de procesamiento a que se les ha sometido. En general se puede establecer que los almidones no cocidos son menos susceptibles a ser digeridos que los almidones cocidos, gelatinizados (1). La ingesta de almidones con la máxima digestibilidad es por lo tanto un factor indispensable para asegurar un completo aprovechamiento fisiológico. Esto puede ser crítico en el caso de lactantes alimentados con fórmulas o en niños cuya dieta se basa en forma importante en alimentos amiláceos (2,3,4).

Sin embargo, en la actualidad se ha presentado al Programa un nuevo tipo de sustituto lácteo en polvo formulado con harinas no precocidas y a las cuales se ha incorporado un preparado enzimático con actividad amilolítica declarando el fabricante que la precocción

de estas harinas crudas ocurre in situ al momento de prepararlo.

Considerando que esta variante de utilizar harinas crudas en conjunto con una enzima puede significar otra alternativa tecnológica para la fabricación de sustitutos lácteos y a un costo más bajo, nos planteamos como objetivo general evaluar el sustituto lácteo a través de estudios tanto in vitro como in vivo.

El presente trabajo corresponde al estudio in vitro. Se evaluó, 1) la digestibilidad in vitro del almidón presente en el sustituto lácteo simulando condiciones fisiológicas; 2) el efecto del agregado enzimático midiendo el tamaño molecular y equivalente de dextrosa; y, 3) el grado de gelatinización del sustituto lácteo; todos ellos bajo distintas condiciones de temperaturas y tiempo de reposo.

MATERIALES Y METODOS

Materiales:

- Sustituto lácteo (SLE)
- Testigo (Sustituto lácteo idéntico a SLE pero sin preparado enzimático. Fue proporcionado por el fabricante).

Metodología: Para reconstituir tanto el sustituto lácteo en polvo como el testigo, se siguieron las indicaciones del fabricante: «disolver 30 g del producto en 45 ml de agua fría batiendo enérgicamente y luego añadir esta preparación sobre 135 ml de agua hirviendo. Revolver bien y apagar el fuego. Dejar reposar 5 min. antes de servir». Bajo estas condiciones la temperatura final de la suspensión es de 85 °C.

- Digestibilidad in vitro:** SLE y Testigo fueron reconstituidos a temperatura finales de 20°, 40°, 50°, 60°, 70° 75° y 85 °C y se mantuvieron en reposo por 5, 30 y 60 minutos. Completado el tiempo de reposo se tomaron alícuotas para determinar el nivel de azúcares reductores el que se expresó como porcentaje de equivalentes de maltosa (5).

Al resto de volumen se le adicionó un volumen igual de una solución de ácido clorhídrico 0,117M incubando a 37 °C por 30 min antes de neutralizar a pH 6,9 con hidróxido de sodio 0,2M. A continuación se tomaron: a) alícuotas de 1 ml para determinar la digestibilidad in vitro según el método de Bernfeld (6). Se utilizaron estándares de glucosa y maltosa. Esta determinación se realizó para detectar la posible actividad residual del preparado enzimático incorporado al sustituto lácteo (al momento que el sustituto abandona el estómago e ingresa el duodeno). Se expresó como porcentaje de equivalentes de maltosa. b) alícuotas de 1 ml a las que se les adicionaron 33,6 Unidades de α -amilasa pancreática (SIGMA) y 0,5 Unidades de amiloglucosidasa (AMG 200L, NOVO) en buffer fosfato 0,05 M pH 6,9 con incubación a 37 °C por 60 min. Después de inactivar con ácido tricloroacético 0,2M y centrifugar (3000 rpm, 15 min), se determinó glucosa en una alícuota del sobrenadante utilizando un kit enzimático (Merckotest 14365, MERCK). La digestibilidad in vitro se expresó para todos los casos como el porcentaje de glucosa generada en relación al almidón total de la muestra.

- Digestibilidad in vitro (DV)= (Glucosa generada/ Almidón total) x 100

- Grado de gelatinización:** El grado de gelatinización se determinó de acuerdo a Chiang (7) con modificaciones. Las muestras de SLE y Testigo, previamente molidas y homogenizadas fueron reconstituidas a temperaturas de 20°, 40°, 50°, 60°, 75°, 85° y 92 °C dejando reposar 5 min. En SLE se evaluó además el grado de gelatinización a los 30 min de reposo. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado.

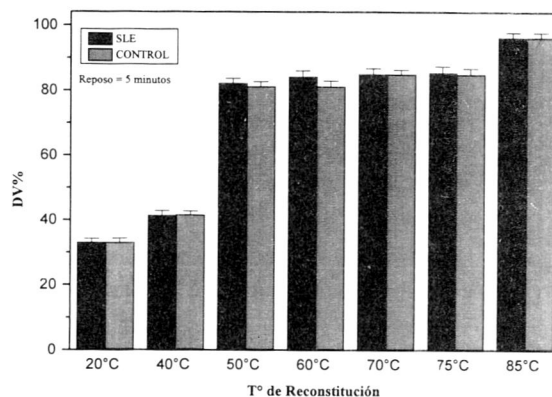
- Grado de gelatinización (G.G)=(Almidón gelatinizado/ Almidón total) x100

- Equivalente de dextrosa (DE):** Se evaluó el Equivalente de Dextrosa en SLE y Testigo para un rango de temperatura de reconstitución de 20 °C a 92° a distintos tiempos de reposo. Se determinó de acuerdo a AOAC (2). Las determinaciones se realizaron por sextuplicado en los productos reconstituidos.
- Filtración molecular de fracciones de distinto peso molecular:** Las muestras de SLE y Testigo reconstituidas según las indicaciones del fabricante (85 °C) se mantuvieron en reposo por 5 min y 60 min. Después de adicionar volúmenes iguales de HCl 0,117M, incubar 30 min a 37 °C y neutralizar con NaOH 0,2M a pH 6,9, se dializó un volumen conocido de cada muestra contra agua destilada en permanente agitación durante 24h a 3 °C en cámara fría. Para las diálisis se utilizaron 3 membranas (Spectra/ Por, SPECTRUM) con distinto corte de peso molecular: 12.000, 6.000-8.000 y 3.500. Concluida la diálisis se midió el volumen final de cada dializado y se determinó glucosa total previa hidrólisis con amiloglucosidasa.

RESULTADOS

Digestibilidad in vitro: La Figura 1 muestra la digestibilidad in vitro de SLE y Testigo reconstituidos a diferentes temperaturas y 5 min. de reposo. Ambos productos mostraron digestibilidades similares entre sí para todas las temperaturas evaluadas. La mayor digestibilidad ocurre a 85 °C (>90%), esto es a las condiciones indicadas para su reconstitución. La digestibilidad *in vitro* disminuye significativamente ($p < 0,05$) a valores entre 81,2% y 85,5% para el rango de temperatura 50 °C - 75 °C. A temperaturas inferiores a 50 °C la digestibilidad vuelve a caer en forma significativa alcanzando un valor mínimo de 33,0% (SLE y Testigo) a 20 °C.

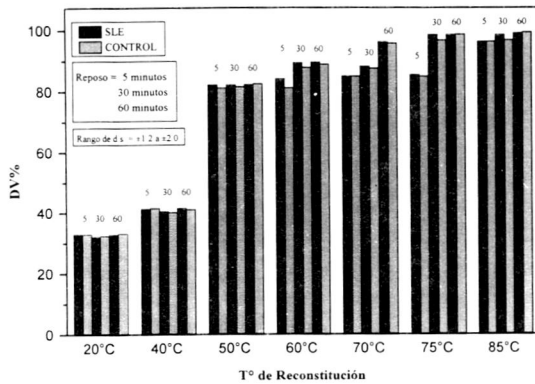
FIGURA 1
Efecto de la temperatura de reconstitución sobre la digestibilidad in vitro



El efecto de distintos tiempos de reposo (5, 30 y 60 min.) y temperaturas de reconstitución sobre la digestibilidad in vitro de SLE y Testigo se muestra en la Figura 2. Para ambos productos se observa que hasta 50 °C no hay un efecto debido al aumento del tiempo de

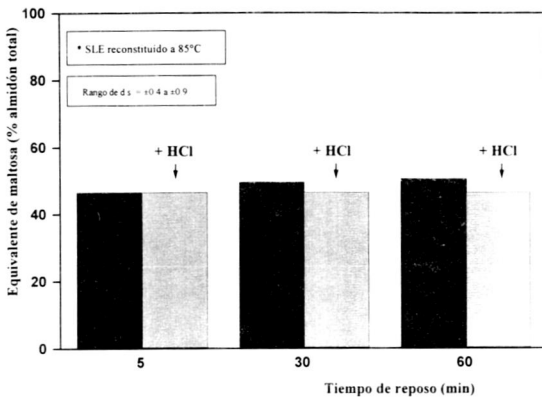
reposo. Sin embargo, en el rango de 60 °C a 85 °C, la digestibilidad in vitro aumenta para 30 y 60 min. de reposo alcanzando a 85 °C un valor máximo de 98,6% y 99,4% para SLE a 30 min. y 60 min. respectivamente.

FIGURA 2
Efecto de la temperatura de reconstitución y el tiempo de reposo sobre la digestibilidad in vitro



En la Figura 3 se observa la generación de maltosa por la acción del complejo enzimático de SLE al reconstituirlo a 85 °C y dejar en reposo durante 5, 30 y 60 minutos. El equivalente de maltosa encontrado a los 5 minutos de reposo (46,1%) aumenta a 49,6% y 50,6% para 30 minutos y 60 minutos de reposo, respectivamente. Estos valores indican que al reconstituir el sustituto lácteo a 85 °C, el preparado enzimático alcanza un 92,1% de eficiencia al cabo de 5 min. de reposo. En el caso que el almidón estuviera completamente hidrolizado a maltosa (100% de eficiencia del preparado enzimático), el valor de equivalente de maltosa sería 50.

FIGURA 3
Efecto del preparado enzimático en el incremento de maltosa antes/durante digestibilidad*



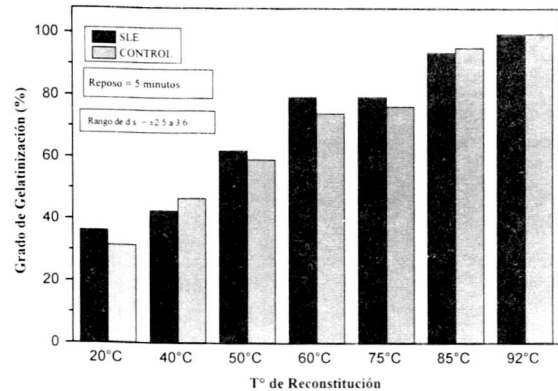
Los resultados de la evaluación de actividad residual del preparado también se muestran en la Fig. 3. El propósito de esto era evaluar la actividad de la enzima al momento que el sustituto ingerido abandona el estómago e ingresa al duodeno. No se encontró una

generación adicional de equivalentes de maltosa bajo estas condiciones.

Grado de gelatinización: Un factor importante en la digestibilidad del almidón lo es el procesamiento a que son sometidos los alimentos que contienen almidón. Aquellos procesos que aumentan la gelatinización de los almidones influirán positivamente en favorecer el ataque de las enzimas digestivas y por ende esos almidones gelatinizados tendrían una «digestibilidad» mayor. Sin embargo, esto no implica que si el grado de gelatinización de algún almidón es bajo, dicho almidón no es digerible ya que, la gelatinización es sólo un factor de contribución y no el único. Se decidió evaluar esta variable debido a que se utiliza normalmente para evaluar el grado de precocción en alimentos y de esta forma poder relacionarlo con digestibilidad in vitro.

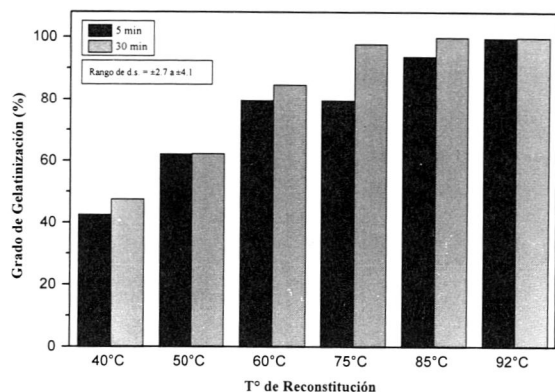
En la Figura 4 se presentan los resultados del grado de gelatinización de SLE y Testigo reconstituidos a diferentes temperaturas y que se mantuvieron en reposo por 5 minutos tal como lo indica el fabricante. En ambos productos el porcentaje de gelatinización se incrementa a medida que aumenta la temperatura de reconstitución no se observaron diferencias mayores de 5% para esta variable ente SLE y Testigo a través de todo el rango de temperatura evaluado. A temperatura ambiente (20 °C) y a 40 °C el grado de gelatinización para SLE fue 36,4% ± 5,6 y 42,6% ± 3,4, mientras que sólo a partir de 50 °C el porcentaje de gelatinización es mayor de 60,0%.

FIGURA 4
Efecto de la temperatura de reconstitución sobre el grado de gelatinización



Al evaluar el efecto del tiempo de reposo sobre el grado de gelatinización de SLE reconstituido a distintas temperaturas, se encontró que a 30 min. en comparación a 5 min. el grado de gelatinización empieza a aumentar a 60 °C, siendo este aumento significativo (p<0,05) a 75 °C y a 85 °C (Figura 5). A 85 °C, SLE alcanza un 100% de gelatinización a 30 min (93,8% a 5 min). El efecto más notorio del tiempo de reposo sobre el grado de gelatinización de SLE, se encontró a 75 °C. A esta temperatura, el grado de gelatinización aumentó en 22,0% (79,5%/5 min vs. 97,0%/30 min). Si consideramos que el almidón presentes es de trigo éste inicia su gelatinización a 53 °C (8). Por lo tanto el mayor grado de gelatinización observado a los 30 min. de reposo en relación a 5 min. cuando la temperatura de reconstitución es superior a 50 °C, obedece a una mayor exposición del almidón a temperaturas que favorecen su gelatinización.

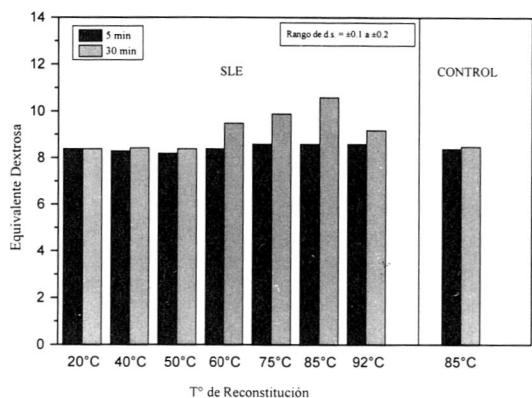
FIGURA 5
Grado de gelatinización de SLE preparado a distintas temperaturas y tiempos de reposo



Las bases técnicas del producto exigen un mínimo de 92% de grado de gelatinización y de acuerdo a los resultados obtenidos se encuentra que esta condición se cumple al preparar SLE a 85 °C o mayor con 5 minutos de reposo e incluso se podría reconstituir a 75 °C pero con 30 min de tiempo de reposo.

Equivalente de Dextrosa: El DE obtenido en ambos productos reconstituidos a 85 °C y a otras temperaturas con 5 y 30 min. de reposo, se muestra en la Figura 6. El objetivo de determinar el DE en el producto SLE reconstituido fue disponer de un índice que permitiera visualizar el grado de actividad del complejo enzimático presente en SLE. Sin embargo se encontró que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en el valor de DE para SLE y Testigo reconstituidos a 85 °C y 5 min. de reposo ($8,6 \pm 0,18$ y $8,4 \pm 0,20$ respectivamente). Bajo estas condiciones sólo se apreció una diferencia evidente en la viscosidad siendo la viscosidad de SLE notoriamente menor a la de Testigo cuya viscosidad no era adecuada.

FIGURA 6
Equivalente de dextrosa de SLE reconstituido a distintas temperaturas y tiempos de reposo



Los resultados de la Figura 6 muestran además que tampoco hubo variación significativa en el DE de SLE y Testigo a las otras

temperaturas. Esto permite concluir que la temperatura de reconstitución o la presencia del complejo enzimático no influyen en el DE al cabo de 5 minutos de reposo y que bajo estas condiciones la medición de DE no sería un índice adecuado para evaluar la actividad enzimática. El valor de DE encontrado tanto para SLE y Testigo es independiente de la temperatura de reconstitución y se debe al poder reductor de la lactosa presente en la leche, ingrediente del sustituto.

Filtración molecular: La Tabla 1 muestra el porcentaje de almidón retenido por las distintas membranas al dializar SLE y Testigo reconstituidos. Al cabo de 5 min. de reposo, el 49% del almidón de SLE preparado a 85 °C corresponde a fracciones cuyo peso molecular es mayor de 12000 D (66 unidades de glucosa) mientras que el 37% del almidón corresponde a fracciones de almidón con peso molecular inferior a 3500 Daltons (19 unidades de glucosa).

TABLA 1
Distribución de Pesos Moleculares de SLE y Testigo*

Reposo	Porcentaje de almidón retenido	Corte molecular de membrana		
		Peso Molecular (Daltons)	12000	8000
5 min*	SLE	49,0a	61,0 ^c	63,0 ^c
	Testigo	>90,0b	>90,0b	>90,0b
60 min	SLE	41,0 ^a	63,0 ^c	66,0 ^c
	Testigo	>90,0 ^b	>90,0 ^b	>90,0 ^b

* reconstituidos a 85 °C

a,b,c: diferentes superíndices indican diferencia significativa ($p > 0,05$)

Al aumentar el tiempo de reposo a 60 minutos el porcentaje de fracciones con peso molecular mayor a 12000 D disminuye a 41% mientras que el porcentaje de almidón con peso molecular <3500 daltons aumenta a 40%.

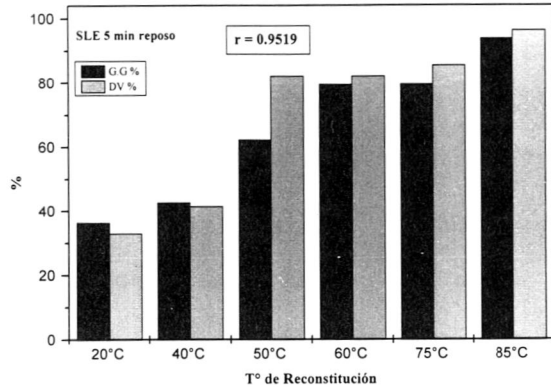
Estos resultados muestran que al momento de consumir SLE reconstituido bajo las condiciones indicadas (85 °C) ya ha ocurrido una predigestión del almidón que no aumenta significativamente si se deja reposar hasta 60 minutos.

Si comparamos los datos de la Tabla 1 con los resultados de índice de dextrosa podemos concluir que el DE no sería un índice adecuado para medir actividad enzimática.

La Figura 7 muestra en forma conjunta la digestibilidad in vitro y el grado de gelatinización de SLE reconstituido a distintas temperaturas. Se observa que existe una buena correlación entre ambas variables para todo el rango de temperatura excepto a 50 °C en que la digestibilidad in vitro es marcadamente mayor al grado de gelatinización. Este hecho podría indicar que existe un grado de gelatinización mínimo a partir del cual el almidón queda en una condición tal que la respuesta enzimática digestiva es comparativamente mayor a lo esperado. Esta situación ocurriría en la proximidad de la temperatura descrita como de iniciación de la gelatinización de almidón de trigo, 53 °C.

FIGURA 7

Relación entre digestibilidad in vitro y grado de gelatinización



CONCLUSIONES

Este es un estudio in vitro para obtener conclusiones acerca del comportamiento que existiría in vivo. De los resultados obtenidos de digestibilidad in vitro se puede concluir que el producto formulado con harinas crudas adicionado de una enzima amilolítica tendría un buen aprovechamiento fisiológico. Además presenta un alto grado de gelatinización y predigestión.

Sin embargo el testigo, el cual no contiene enzima, también sería apto para el consumo puesto que presenta prácticamente la misma digestibilidad in vitro y grado de gelatinización que SLE. Esto implica que no sería necesario precocer las harinas para formular el producto siempre y cuando se reconstituyera a 85 °C con 5 minutos o a 95 °C con 30 minutos de reposo.

El efecto más importante que cumple la incorporación de enzima en el sustituto es con relación a su carácter hidrolítico lo que se manifiesta en que el producto reconstituido presenta una adecuada viscosidad en comparación al testigo.

La exigencia de utilizar harinas precocidas en que los almidones están pregelatinizados ofrece la ventaja de disponer de un producto de reconstitución instantánea en que no se depende de la temperatura de reconstitución para obtener un producto adecuado tanto desde el punto de vista organoléptico como nutricional. Este no es el caso del producto en estudio, SLE, el cual al no tener el almidón pregelatinizado, la gelatinización debe lograrse durante su reconstitución lo que requiere de un cuidadoso control de temperaturas y reposo.

REFERENCIAS

1. Dreher L., Dreher C. & Berry J. Starch digestibility in foods: a nutritional perspective. CRC in Food Science and Nutrition 20, Issue 1, 1984.
2. Auricchio S., Pietra D & Vegnente A. Studies on intestine digestion of starch in man. II Intestinal Hydrolysis of amylopectin in infants and children. Pediatrics 39(6), 853. 1967.
3. Rao C. & Rao B. Influence of starches from different sources on protein utilization in rats. British Journal of Nutrition 40,1. 1978.
4. Graham G., Morales E., Placko R. & MacLean W. Nutritive value of brown and black beans for infants and small children. American Journal of Clinical Nutrition 32, 2362, 1979.
5. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC, Washington DC. 1990.
6. Bernfeld P. Amylases. En: Methods in Enzymology 1, Academic Press, New York. p.149. 1954.
7. Chiang B.Y & Johnson J. Measurement of total and gelatinized starch by glucoamylase and o-toluidine reagent. Cereal Chemistry 51(3):429. 1977.
8. Whistler R. & Daniel J. Carbohydrates. En: Food Chemistry. OR Gennema (Ed.). Marcel Dekker Inc. p.70-137. 1985.

Recibido: 30-10-1995

Aceptado: 11-11-1996