

# Efecto del empleo de ácido ascórbico, azodicarbonamida y las enzimas lacasa, xilanasa y lipasa sobre los parámetros fermentativos de una masa panaria

Oscar A. Vega<sup>a\*</sup>, Rubén V. De Marco<sup>b</sup>, Cecilia D. Di Risio<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Ingeniero Agrícola. MSc. Tecnología de Alimentos. Departamento de Alimentos, Universidad de Antioquia. Colombia

<sup>b</sup> Licenciado en Química. Especialista en Micología de Alimentos. Posgrado de Alimentos, Universidad Tecnológica Nacional, Regional Avellaneda. Argentina

<sup>c</sup> Licenciada en Ciencias Químicas. Doctora en Ciencias Químicas. CBC, Universidad de Buenos Aires. Argentina

Recibido: 11 de abril de 2011. Aprobado: 8 de septiembre de 2011

## RESUMEN

Diferentes legislaciones a nivel mundial prohíben el uso del bromato de potasio como aditivo de carácter oxidativo en procesos de panificación, debido a su potencial efecto cancerígeno. Se hace entonces primordial encontrar sustitutos de carácter oxidativo, los cuales pueden ser de origen químico o enzimático, que puedan reemplazarlo como aditivo en la fabricación de pan. La presente investigación evaluó los efectos de la enzima lacasa como agente oxidante de tipo enzimático, sobre la fermentación de una masa panaria, ya sea sola o en combinación con dos enzimas de uso habitual en panificación, xilanasa y lipasa. La metodología incluyó la determinación del contenido de gluten, humedad, actividad de  $\alpha$ -amilasa y parámetros fermentativos por medio de un Reofermentómetro de Chopin. Los resultados permiten concluir que la combinación lacasa-lipasa-xilanasa le confiere una buena aptitud fermentativa a la masa, ya que le da estabilidad, mejora el tiempo de fermentación ( $T_x$ ) y por ende incrementa la retención de gas. Se compararon los resultados obtenidos con una formulación que usa oxidantes químicos combinados con xilanasa+lipasa.

**Palabras clave:** Lacasa, fermentación, tiempo de fermentación, retención de gas, enzimas oxidativas.

## Effects of ascorbic acid, azodicarbonamide and laccase, xylanase and lipase enzymes on fermentation parameters of bread doughs

### ABSTRACT

Different laws worldwide prohibit the use of potassium bromate as oxidative additive in baking process because of its carcinogenic effect. One becomes then fundamental to find oxidative substitutes (chemical or enzymatic) that can replace it as additive. This research is oriented to study the effects of laccase enzyme on the fermentation of mass bread dough to making baguette-type bread, alone and combined with two commonly used enzymes in baking as xylanase and lipase. The methodology includes the determination of gluten, moisture, activity of  $\alpha$ -amylase, to determine the fermentations parameters using the Chopin Reofermentometer. Results shows that the combination laccase-lipase-xylanase, gives a good fit to the mass fermentation, because it gives stability, improve fermentation time ( $T_x$ ) and thus increases the gas retention. We compared the results with a formulation that uses chemical oxidants combined with xylanase+lipase.

**Key words:** Laccase, fermentation, fermentation time, gas retention, fermentations parameters, enzymatic oxidative substitutes.

## 1. Introducción

Los agentes oxidantes son muy utilizados en la industria alimentaria; en el caso de estructuras panarias se usan debido a que eliminan del sistema los grupos -S-H de las proteínas solubles. El resultado es que se producen cambios en el equilibrio de las reacciones de la glutenina que conducen a la formación de enlaces -S-S- entre moléculas de glutenina y no enlaces -S-S- entre proteínas solubles y gluteninas, dando lugar a una estructura más elástica. El efecto global es la producción de una red de gluten más fuerte, estable y elástica, capaz de expandirse sin rupturas durante

el período de crecimiento rápido de los alvéolos de gas en la fase más temprana del proceso de horneado (Williams y Pullen, 1998). Dentro de los agentes oxidantes más utilizados está el ácido ascórbico (ASC), el cual a medida que se va mezclando con la harina, reacciona en presencia de la ácido-ascorbic oxidasa de la harina, con pérdida de dos átomos de hidrógeno y formación de agua y ácido deshidroascórbico, que es un agente oxidante. En definitiva, la importancia funcional del ácido L-ascórbico en la panificación se debe a su capacidad de transformarse rápidamente en ácido dehidroascórbico, que es su forma oxidada (Quaglia, 1991). Otros oxidantes utilizados son la azodicarbonamida, el ortofosfatomonocálcico y el bromato de potasio; este último fue patentado como

\* Autor de correspondencia.

E-mail: oscarvegacastro@gmail.com (O. Vega)

mejorador de pan en 1914, a partir de los estudios de una investigación realizada en ese año en la Universidad de Pittsburg (Solito y Pavesi, 2003). El bromato de potasio ha mostrado favorecer el volumen del pan, la retención de gas, la textura y estructura de la miga (Ribotta *et al.*, 1999), y tiene la ventaja de ser económico, lo que mejora la relación costo-beneficio cuando se lo utiliza como “mejorador”. Sin embargo, hay pruebas de su carácter tóxico, y debido a ello la Unión Europea lo ha clasificado como Tipo 2 (sospechoso cancerígeno para humanos); la toxicidad se expresa en vómitos, diarrea, depresión del sistema nervioso, efectos mutagénicos, posibles alteraciones renales, trastornos gástricos; además, estudios realizados con ratas demuestran que es una sal potencialmente cancerígena (Ribotta *et al.*, 1999). Estudios realizados por el comité mixto FAO-OMS indicaron que el bromato de potasio puede producir tumores en las células renales, las células peritoneales y las células foliculares de la tiroides (Solito y Pavesi, 2003). Por estas razones, en el mundo está prohibido el uso de este aditivo en la industria panificadora; en Colombia dicha regulación está dada por la Resolución 1528 de 2002 del Ministerio de Salud.

Dado lo anterior, es necesario buscar otros aditivos que cumplan con la función de oxidar las masas panarias, para que estas tengan las propiedades reológicas y fermentativas aptas para los procesos de panificación y finalmente se puedan obtener productos panarios que no afecten la salud del consumidor. Dentro de las alternativas para el reemplazo del bromato de potasio están las enzimas de carácter oxidativo.

Diversos autores citan el uso de enzimas en la industria de la panificación, evaluando el efecto que estas tienen sobre las propiedades reológicas de las masas y las características físicas y sensoriales del pan (Labat *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Bollain *et al.*, 2006; Bonet *et al.*, 2006; Hyun *et al.*, 2006; *et al.* *et al.* Selinheimo *et al.*, 2006; *et al.* *et al.* Caballero *et al.*, 2007; Stojceska y Ainsworth, 2008; Steffolani *et al.*, 2010). Aunque la mayoría de los trabajos con enzimas reportan el efecto que tienen sobre diferentes propiedades del pan y de las masas panarias, es importante también determinar su efecto sobre los diferentes procesos de panificación. Una de estas etapas es la fermentación, ya que es un paso intermedio entre la formación de la masa y la obtención del pan, una etapa donde la expansión de las burbujas de aire previamente incorporadas durante el mezclado provee características a la estructura del pan (Dobraszczy y Campbell, 2000).

La fermentación se puede dividir en tres etapas: la primera se da en el amasado debido a la incorporación de la levadura, donde se inicia la asimilación de

los primeros azúcares libres existentes en la harina; existe una segunda etapa donde la  $\alpha$  y la  $\beta$ -amilasa, glucosidasa y amiloglucosidasa actúan sobre el almidón, generando fermentaciones de tipo alcohólicas, butíricas, lácticas y acéticas, responsables del aroma del pan; la última etapa se da en el horno, donde las células de levadura mueren cuando la pieza de pan alcanza los 55°C. Por lo mencionado anteriormente, es de relevancia entender el efecto de las enzimas sobre los diferentes parámetros fermentativos; el estudio de los procesos fermentativos se hace por medio de un reofermentómetro, el cual provee información acerca del desarrollo de la masa y el desprendimiento de gas en estado de fermentación.

Diversos autores (Singh y Singh, 1999; Wang *et al.*, 2002; Palacios *et al.*, 2006; Dal Bello *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2008; Sanz *et al.*, 2008; Weining *et al.*, 2008; Ktenioudaki 2009; *et al.* *et al.* Lynch *et al.*, 2009 *et al.* *et al.*), reportan el uso del reofermentómetro para la determinación de los parámetros de fermentación de masas panarias. Algunos de estos han descrito los efectos de la sal, el ácido láctico, mantecas (*shortenings*) y la trehalosa exógena sobre algunos parámetros fermentativos tales como: *Hm* (Volumen de desarrollo máximo de la masa bajo presión, expresado en mm), *H'm* (Parámetro que relaciona la calidad de la harina con los cultivos de levadura) y la producción de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, Palacios *et al.* (2006) evaluaron el efecto que tienen las *Bifidobacterias* sobre las propiedades reológicas y los parámetros fermentativos de una masa para la elaboración de pan. Otros reportes de evaluaciones de las parámetros fermentativos y reológicos de las masas panarias combinadas con diferentes materias primas han sido reportados por Wang *et al.* (2002) y Sanz *et al.* (2008) *et al.*. Diferentes usos del reofermentómetro han incluido la determinación de la densidad de una masa de trigo para elaborar pan (Ktenioudaki, 2009). Con respecto al estudio del efecto de las enzimas en procesos fermentativos, Kim *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la transglutaminasa y la trehalosa sobre el *Hm* y la retención de CO<sub>2</sub>. Asimismo, Rosell *et al.* (2001) reportaron el efecto de diferentes hidrocoloides en diferentes parámetros fermentativos. Finalmente, Ktenioudaki *et al.* (2010) caracterizaron los parámetros fermentativos de diferentes harinas de trigo proveniente de diferentes regiones del mundo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto que tiene la enzima lacasa como agente oxidante enzimático (en combinación con las enzimas lipasa y xilanas) sobre los parámetros fermentativos de una masa panaria. La utilización de la enzima lacasa se propone como una alternativa al uso del bromato de potasio, el cual está prohibido para procesos de panificación por diferentes resoluciones a nivel

mundial, y como alternativa al uso de otros oxidantes químicos. Además se compararon los parámetros fermentativos obtenidos por la mezcla de enzimas con los arrojados por una mezcla de aditivos químicos usados actualmente por la industria panificadora, para poder establecer si la enzima lacasa puede considerarse como un reemplazante de los agentes oxidantes químicos usados en la panificación actual y en especial del bromato de potasio.

## 2. Metodología

Como parte fundamental del desarrollo de este trabajo, inicialmente se obtuvo una harina de trigo 000 (tres ceros, nombre comercial), la cual se denomina harina base; a la misma se le realizaron estudios de calidad como la determinación del contenido de gluten, el Falling Number y el contenido de humedad, como se muestra en la Tabla No. 1; luego se procedió con el protocolo de preparación de las masas y agregado de enzimas y finalmente se determinaron diferentes parámetros fermentativos de las masas. Estos ensayos han permitido evaluar las características de las masas obtenidas, y las ventajas y desventajas de la utilización de distintos aditivos y sus combinaciones. A continuación se detallan las metodologías utilizadas en el presente trabajo.

### 2.1. Obtención de la harina base 000

Se obtuvo de la molienda de una mezcla de trigos argentinos, según se detalla en la Tabla No. 2. Los lugares de procedencia de cosecha de cada trigo son las localidades de Azul y 25 de Mayo, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Azul está ubicada a 137 msnm, con una temperatura media anual de 15°C y por coordenadas 36°46'39"S - 59°51'48"O; en tanto la localidad de 25 de Mayo está ubicada a 58 msnm, con una temperatura media anual de 18°C y con coordenadas 35°25'41"S - 60°10'27"O. Antes de la molienda los trigos fueron almacenados en silos por 24 horas, luego se llevaron a 16% de humedad para facilitar la molienda.

### 2.2. Determinación del contenido de gluten

Se determinó de acuerdo a la Norma IRAM 15864 de 2002: Harina de trigo, Determinación del Gluten, Método del equipo "Glutomatic".

### 2.3. Determinación de la actividad de alfa-amilasa o Falling Number

Se determinó de acuerdo a la Norma IRAM 15682 de noviembre de 1986: Cereales y harina, Método de

determinación de la actividad de  $\alpha$ -amilasa según Hagberg-Perten.

### 2.4. Determinación del contenido de humedad de la harina

Para la evaluación de este parámetro se aplicó el método de determinación de humedad de Carter-Simon. Este método indica que la muestra de harina se debe someter a secado durante 15 minutos en una estufa a una temperatura de 155°C; el contenido de humedad de la harina se determina por diferencia de peso.

### 2.5. Ensayo de fermentación por el método del Reofermentómetro F3 de Chopin

Inicialmente hay que preparar las masas, para ello se pesaron 250 gramos de harina, 7 gramos de levadura, la proporción de enzima adecuada y se mezclaron en la amasadora del reofermentómetro agregando agua, hasta lograr la consistencia deseada en la masa. A continuación se pesaron 315 gramos de masa y se pasaron por un extrusor dejando la masa bien aplastada; finalmente se colocó la masa en la cuba de fermentación del reofermentómetro a una temperatura de 28,5°C, controlada por el termostato del equipo. Luego del proceso de fermentación, al inicio del ensayo la masa se somete a presión por medio de un soporte con pesas de 500 g que se dejan sobre la masa, y a medida que se van multiplicando las levaduras las variaciones de altura de la masa son detectadas por un sensor óptico el cual transmite la señal al trazador, para que este efectúe el trazado de la curva. El ensayo termina cuando hay ruptura de la red proteica.

Dentro de los parámetros de desarrollo de la masa están:  $H_m$ : volumen de desarrollo máximo de la masa bajo presión, expresado en mm;  $hm$ : volumen de desarrollo de la masa a fin del ensayo (3 horas para ensayo completo);  $T_1$ : tiempo que se tarda en alcanzar el máximo volumen, es decir, que se tarda en llegar a la altura máxima (expresado en horas y minutos);  $T_2$ : tiempo de relativa estabilidad en punto máximo situado a una altura de 10% de  $H_m$ ;  $H_m-hm/H_m$ : porcentaje de pérdida de desarrollo. Con respecto a los parámetros de desprendimiento gaseoso se determinan:  $T'_1$ : caracteriza el momento preciso en el cual el caudal gaseoso es el máximo. La intensidad de este caudal se expresa por  $H'm$ ;  $H'm$ : parámetro que relaciona la calidad de la harina con los cultivos de levadura.  $T_x$ : tiempo de la aparición de la permeabilidad. *Volumen total*: es el volumen total de gas producido durante la fermentación en el curso del ensayo. *Volumen de CO<sub>2</sub> perdido*: es la cantidad de gas carbónico que la masa ha

dejado escapar de la aparición del punto  $T_x$ . *Volumen de retención*: es la cantidad de gas retenida todavía en la masa fermentada. *Coefficiente de retención*: es la relación del volumen de retención con el volumen total.

## 2.6. Enzimas y agentes oxidantes químicos

Tanto las enzimas utilizadas en esta investigación como los agentes químicos oxidantes, fueron proveídos por diferentes empresas; la lacasa del hongo *Myceliophthora thermophila* fue donada por Atime S.A., marca Muhlenchemie (Alphamalt PPO MC9901001); la xilanasa se adquirió en Puratos Argentinos, bajo el nombre comercial 20ARG, Número de Lote 25014. Por último, la lipasa se adquirió en Granotec Argentina, bajo el nombre comercial de Emulzime, Número de Lote 2006127017. En cuanto a los agentes oxidantes, ambos fueron adquiridos en Epecuen S.A. El ácido ascórbico con el Número de Lote 7042605 y la azidocarbonamida bajo el nombre comercial Azidocarbonamida 23%, con Número de Lote 70524001.

## 2.7. Distribución de ensayos

Se realizaron diferentes mezclas, resultando en total 7 tratamientos, teniendo en cuenta las fichas técnicas de las enzimas y de los agentes oxidantes químicos. Las respectivas mezclas se describen a continuación, bajo las siguientes notaciones HB: harina base 000, ADA: azidocarbonamida, ASC: ácido ascórbico:

T0: HB.

T1: HB+lacasa.

T2: HB+ADA+ASC.

T3: HB+lacasa+xilanasa.

T4: HB+ADA+ASC+xilanasa.

T5: HB+lacasa+xilanasa+lipasa.

T6: HB+ADA+ASC+xilanasa+lipasa.

## 2.8. Tratamiento estadístico:

Se realizaron tres ensayos en el reofermentómetro para cada tratamiento, luego se tomaron los promedios para cada parámetro. Además se hizo un análisis de varianza del 95%, para determinar si existían o no diferencias significativas entre los tratamientos. En especial se compararon las diferencias significativas entre T1-T2, T3-T4, y T5-T6. El software utilizado fue StatGraphics Plus 5.1.

## 3. Resultados y discusión

En la Tabla No. 2 se muestran los trigos que se molieron y el análisis de calidad de los mismos. Las características básicas de la harina obtenida se muestran en la Tabla No. 1.

Tabla 1  
Características básicas de la harina base utilizada en la investigación

% Humedad	Falling Number	Contenido de gluten		
		Gluten húmedo %	Gluten seco %	Gluten índice %
13,70	418	27,50	9,40	96

Fuente: Laboratorio Molino Central Norte S.A.

Tabla 2  
Procedencia y características físicas del trigo utilizado

Procedencia	Humedad (%)	Gluten húmedo (%)	Falling Number
Azul	11,70	27,5	461
Azul	12	25	431
Azul	12,70	28	436
Azul	12,5	27,5	448
Azul	12,4	27	472
Azul	11,9	28	457
Azul	12	28,5	462
Azul	12,30	26,5	447
Azul	12	26,5	451
Azul	13,9	27,5	429
25 de Mayo	12,6	24	398

Fuente: Laboratorio Molino Central Norte S.A. Azul y 25 de mayo. Provincia de Buenos Aires, Argentina.

De la Tabla 1, se puede decir que el Falling Number es alto, lo que indica que la harina tiende a tener poca actividad de  $\alpha$ -amilasa, lo que implica que hay menos corte de almidón, menor capacidad de absorción de agua y mayor viscosidad de acuerdo a Wiggins (1998) y Selinheimo *et al.* (2006); sin embargo, desde el punto de vista de proteína es una harina panificable.

Teniendo en cuenta el valor de Falling Number, si se utilizara esta harina sin aditivos, existiría el riesgo de obtener un pan poco desarrollado, poco voluminoso y con miga muy seca (Quaglia, 1991). Con respecto al Falling Number, estudios realizados por Stathopoulos *et al.* (2006) reportan valores de 517 para una harina de trigo Hereward; en ese mismo sentido, Caballero *et al.* (2007) encontraron un tiempo de caída de 405, pero para una harina de trigo obtenida en Medina del Campo en España, el cual es más cercano al reportado en esta investigación. Con respecto a los valores de gluten húmedo y contenido de humedad, Angioloni y Dalla Rosa (2005) reportaron valores  $31,10 \pm 0,87$  y  $10,84 \pm 0,06$  respectivamente. Asimismo, Caballero *et al.* (2007) para la harina de Medina del Campo reportaron para el gluten húmedo 26,6 y contenido de humedad

de 12,6%. Todos estos valores son similares a los mostrados en la Tabla No. 2 y en realidad dependen del tipo de trigo, lugar y tiempo de cosecha. Estas propiedades pueden ser modificadas por medio de enzimas, para lograr mejores rendimientos en procesos de panificación. Otros estudios que reportan contenido de humedad, Falling Number y gluten húmedo, pueden consultarse en Pedersen *et al.* (2004), Sliwinski *et al.* (2004), Primo-Martin (2006) y Ktenioudaki (2009).

En la Tabla No. 3 se muestran los resultados promedios obtenidos en el reofermentómetro para los diferentes tratamientos, en lo referente al desarrollo de masa. Analizando los datos presentados en la Tabla No. 3, como conclusión general se aprecia que el oxidante químico genera una mayor estabilidad en la masa, debido a que los parámetros *Hm* y *hm*, no cambiaron durante el ensayo. La importancia del parámetro *Hm*, radica en que indica qué volumen puede desarrollar una masa en un proceso de fermentación en función de los aditivos que esta tenga, mientras que *hm* es el volumen final de la masa al final del ensayo. A menor variación de *Hm* y *hm*, es mejor la estructura de la masa.

Tabla 3

Valores promedios para el desarrollo de la masa obtenidos en el reofermentómetro para los diferentes tratamientos

Parámetro	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
<i>Hm</i> (mm)	36,9	36,4	40,3	57,5	56,6	58,3	60,6
$T_1^*$	2 h 58'	3 h	3 h 06'	2 h 48'	2 h 48'	3 h 04'	3 h 06'
<i>hm</i> (mm)	36,6	36,0	40,3	56	54,7	57,9	60,6
(%)**	0,8	1	0	2,5	3,3	0,6	0

\* El  $T_1$  tiene por unidades horas y minutos. \*\* Porcentaje de descenso de desarrollo.

Con respecto a los valores de la Tabla 3, el valor *Hm* para la harina base es igual al obtenido por Palacio *et al.* (2006). Al comparar el uso de lacasa (T1) con la mezcla de ADA-ASC (T2), el volumen de desarrollo máximo de la masa *Hm*, con respecto a la harina base disminuyó ligeramente con el uso de la enzima, en tanto que con el uso del oxidante químico se incrementó. Este resultado se evidencia como significativo, según el análisis estadístico (Figura No. 1). Asimismo, no existen diferencias significativas entre el T0 y T1. Sin embargo, el valor de T1 es levemente menor a T0, esto se puede deber a que la lacasa forma una red de mucha tenacidad, lo que evita el incremento de volumen de la masa.

La adición de lacasa aumentó el tiempo de desarrollo de la masa en 2 minutos, en tanto que los oxidantes químicos incrementaron el tiempo de desarrollo de la harina base en 8 minutos. Por último, el descenso de la masa fue de 0% con el uso de ADA y ASC y del 1% para la lacasa.

Con base en los resultados obtenidos para T1 y T2, se decidió agregar xilanasa con el objetivo de obtener mayores valores de *Hm*. Finalmente, se generó un incremento aproximado del 54% en *Hm* tanto para T3 como para T4 con respecto a la harina base. Para este parámetro se obtuvo un mayor valor del T3, lo que evidenciaría una mayor sinergia entre las enzimas, sin embargo no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos comportamientos se pueden apreciar en la Figura No. 1.

El tiempo de desarrollo para el T3 y T4 fue el mismo: 2 h 48 min, es decir que disminuyó en 10 minutos con respecto al logrado por la harina base; esto podría deberse a la acción de la xilanasa, ya que si se los observa individualmente (ver datos T1 y T2), ambos agentes oxidantes incrementan el tiempo de desarrollo.

Lo anterior implica una acción dominante por parte de la enzima xilanasa sobre los agentes oxidantes, tanto el enzimático (lacasa) como los químicos (ADA-ASC), como ya ha sido reportado por Selinheimo *et al.* (2006),



aunque debe aclararse que en la investigación citada se encontró prevalencia de la enzima xilanasa sobre la lacasa en análisis reológicos, no en fermentativos. Pero se podría decir que el efecto dominante de la xilanasa también se muestra en lo relacionado a los parámetros fermentativos.

El porcentaje de descenso de la masa fue menor en el T3 con respecto al T4, ya que dicho porcentaje fue del 2,5% y 3,3% respectivamente, lo cual es un indicio de que la lacasa tiene un mayor efecto de sostenimiento de la estructura de la masa, comparando con la adición de ADA y ASC cuando se combinan con la xilanasa. Por tanto la combinación lacasa-xilanasa da una mejor estabilidad a la masa fermentada.

Sin embargo, el T0 tiene un menor porcentaje de desarrollo con respecto a T3 y T4, esto probablemente debido al uso de la xilanasa, la cual tiene el efecto de generar mayor extensibilidad en una masa, y por lo tanto puede generar mayor volumen, aunque en definitiva no da sostenimiento a la estructura.

Por último, y para mejorar la estabilidad fermentativa de la masa, se optó por el agregado de lipasa. Se puede evidenciar que para T5 y T6 se aprecia un aumento del tiempo de desarrollo con respecto a los valores obtenidos para la harina base, lo que permitiría un mayor tiempo de fermentación en las prácticas de panificación, generando un mayor desarrollo de la masa.

Asimismo para T5 *Hm* incrementó su valor en un 58%, y además el porcentaje de descenso de la masa fue de tan solo el 0,6%, esto último probablemente como consecuencia de las propiedades oxidantes de la lacasa, que da fuerza a la masa. Los resultados para T6 fueron similares a los de T5, tanto para *Hm* como para *hm*. Dados los resultados de T5, se puede evidenciar que la lacasa ayudaría a estabilizar la masa, permitiendo un mayor desarrollo. Aunque existieron diferencias significativas para *Hm*, numéricamente los valores son muy cercanos, lo cual es un buen indicativo de la mezcla T5, la cual es la alternativa propuesta en esta investigación.

Con respecto a otros trabajos similares, se puede decir que las enzimas usadas en esta investigación producen un mayor volumen de desarrollo que el logrado por diferentes hidrocoloides en un estudio

realizado por Rosell *et al.* (2001), lo que evidenciaría que las enzimas dan una mejor red de gluten, ya que permiten que la estructura de la masa tenga una mayor altura. En otro estudio realizado por Ktenioudaki *et al.* (2010), los valores del volumen de desarrollo oscilaron entre 30 a 60 mm, para diferentes harinas, provenientes de diversas variedades de trigo. Otros estudios reportan valores similares a los obtenidos en esta investigación para *Hm*, aunque con diferentes aditivos (Singh y Singh, 1999; Sanz *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2009). Por otra parte, Wang *et al.* (2002) reportaron que el uso de fibra de algarrobo y de arveja reduce el *Hm* con respecto al de una harina control, con valores de 31,9 y 29,4 para cada fibra y de 33,5 para el control; estos valores están por debajo de los obtenidos en esta investigación. Finalmente para el % de descenso de desarrollo de la masa, Rosell *et al.* (2001) reportaron este parámetro como 0%, igual al valor logrado en este trabajo en el T2 y T6, lo que daría una buena estructura a la masa en un tiempo de 3 horas, tanto para la enzima como para el hidrocoloide.

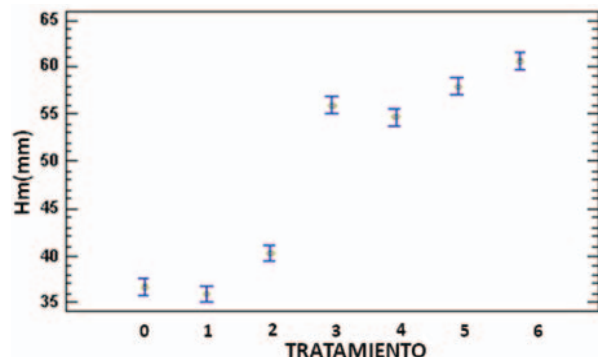


Figura 1. Gráfica de medias al 95% para el parámetro Hm, entre los diferentes tratamientos.

En la Tabla 4 se muestran los resultados promedios obtenidos en el reofermentómetro para el desprendimiento gaseoso. Antes de analizar los resultados mostrados en la Tabla No. 4, es importante resaltar que la producción de gas está muy relacionada con la calidad de la levadura utilizada, pero los aditivos tienen influencia en el porcentaje de retención de gas, lo que afectará el volumen final del pan.

Tabla 4

Valores obtenidos promedios para el desprendimiento gaseoso

Parámetro	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
$H'm$ (mm)	69	73,4	75,1	80,9	82,2	77,8	77,9
$T'_1$	2 h 24'	2 h 12'	2 h 18'	2 h 06'	2 h 00'	2 h 28'	2 h 30'
$T_x$	1 h 19'	1 h 19'	1 h 07'	1 h 31'	1 h 25'	1 h 29'	1 h 43'
Vol.Total (ml)	1530	1612	1570	1786	1865	1745	1687
Vol.CO <sub>2</sub> (ml)*	193	245	257	262	290	228	205
Vol.CO <sub>2</sub> (ml)**	1336	1367	1411	1523	1574	1515	1482
% retención	87,4	84,9	84,6	85,4	84,5	87	87,9

\* Volumen de CO<sub>2</sub> que se perdió. \*\* Volumen de CO<sub>2</sub> retenido.

Al analizar los datos hay que tener en cuenta la relación entre el tiempo de detección de la porosidad,  $T_x$ , y el valor  $T'_1$ ; entre más rápido aparezca  $T_x$  mayor pérdida de gas existirá en la estructura, y por ende el volumen del pan será menor. Es decir, cuanto más cercano sea  $T_x$  a  $T'_1$  se obtendrá un mejor resultado.

Al analizar el efecto de ambos tratamientos con respecto a la harina base, se puede observar que existió una retención de gas prácticamente similar en ambos casos [con la lacasa alrededor 84,9% (T1) y con el uso de los oxidantes químicos 84,6% (T2)]. Si se analiza el momento de la aparición del  $T_x$  para el T2, este ocurrió 71 minutos antes de alcanzar la máxima producción de gas, mientras que para el T1 el  $T_x$  inició 53 minutos antes de  $T'_1$ . Esto podría indicar una ventaja en el uso de lacasa, que ayudaría a que la red proteica sea más resistente, con lo cual se evitaría la pérdida de gas.

Por otra parte, se puede apreciar que el agregado de la enzima xilanas provocó que el tiempo de producción máxima de gas disminuyera en ambos casos con respecto a la harina base, aunque T3 permite obtener una pequeña mejora frente a T4. Tanto T4 como T3 produjeron corrimientos positivos en el valor de  $T_x$ , lo que implica una mejora en las masas ensayadas, ya que se retarda la aparición de porosidad.

Se pudo observar que la retención de gas con el uso de lacasa (T3) resultó de 85,4%, en tanto que para la combinación de xilanas-ADA-ASC (T4), la retención fue del 84,5%. Por tanto, se podría decir que ambas combinaciones producen una retención de gas similar.

De la Tabla 4, se puede apreciar que el T5 y el T6 no afectan directamente a la actividad fermentativa, ambos mejoran la estructura del gluten retrasando por lo tanto la difusión del CO<sub>2</sub>, lo cual se puede apreciar por el aumento del tiempo donde aparece la porosidad ( $T_x$ ). Esto permitiría fermentaciones más prolongadas con el consiguiente aumento de volumen y la mejora de las características de la miga. No se aprecian diferencias significativas en los coeficientes de retención de gas, entre los tratamientos (Figura No. 2).

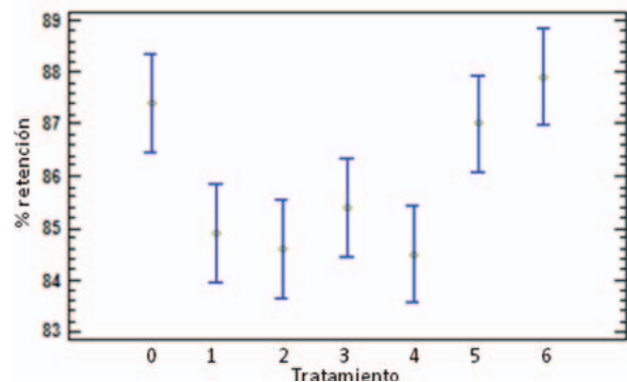


Figura 2. Gráfica de medias al 95% para el parámetro % retención de gas entre los diferentes tratamientos.

Finalmente, los valores de retención de gas reportados en este trabajo, se relacionan con los obtenidos por Rosell *et al.* (2001), Palacios *et al.* (2008) *et al.* y Lynch *et al.* (2009), cuyos reportes dan porcentajes de retención de gas entre 85% a 90%. Valores con menos porcentaje de retención de gas reportaron Wang *et al.* (2002) y Lynch *et al.* (2009), con valores entre 80 y 82%.

#### 4. Conclusiones

La tendencia actual en panificación se basa en el desarrollo de preparaciones enzimáticas en reemplazo no solo del clásico aditivo bromato de potasio (cuyo uso está prohibido en la amplia mayoría de las legislaciones a nivel mundial), sino también de otros oxidantes químicos. La mayoría de las enzimas presentan la ventaja de desnaturalizarse a la temperatura de cocción del pan, y por ende no se encuentran en el producto final. Al combinarse los agentes oxidantes, ya sea el enzimático o el químico, con la lipasa-xilanas, los resultados para ambos casos fueron muy similares, incrementándose la estabilidad y disminuyendo el aflojamiento de la masa. Con respecto a la fermentación, ambos tipos de oxidantes generan mayor desarrollo de volumen. Durante la fermentación

se observa un aumento del tiempo de fermentación ( $T_x$ ), debido a la mejora de retención del gas incrementando el desarrollo de volumen. Se puede llegar entonces a la conclusión de que el uso de lacasa combinada con otras enzimas le confiere a la masa una buena aptitud fermentativa.

## Referencias

- Angioloni A., Dalla Rosa M. (2005). Dough thermo-mechanical properties: influence of sodium chloride, mixing time and equipment. *Journal of Cereal Science*, 41:327-331.
- Bollain C., Angioloni A., Collar C. (2006). Relationships between dough and bread viscoelastic properties in enzyme supplemented wheat samples. *Journal of Food Engineering*, 77:665-671.
- Bonet A., Rosell C., Caballero P., Gómez M., Munera I., Lluch M. (2006). Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 9:408-415.
- Caballero P.A., Gómez M., Rosell C.M. (2007). Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of Food Engineering*, 81:42-53.
- Dal Bello F., Clarke C.I., Ryana L.A.M., Ulmera H., Schobera T.J. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 45:309-318.
- Dobraszczyk B.J., Campbell G.M., Gan Z. (2000). Bread: a unique food. En: *Cereals and Cereal Products: Technology and Chemistry*. Dobraszczyk B.J., Dendy, D.A.V. (Eds.). Aspen Publishers: USA. pp. 182-227.
- Hyun J., Maeda T., Morita N. (2006). Effect of fungal  $\alpha$ -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. *Food Research International*, 39:117-126.
- Kim Y.S., Weining H., Guocheng D., Zhengxing P., Okkyung CH. (2008). Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. *Food Research International*, 41:903-908.
- Ktenioudaki A., Butler F., Gonzales-Barron U., McCarthy U., Gallagher E. (2009). Monitoring the dynamic density of wheat dough during fermentation. *Journal of Food Engineering*, 95:332-338.
- Ktenioudaki A., Butler F., Gallagher E. (2010). Rheological properties and baking quality of wheat varieties from various geographical regions. *Journal of Cereal Science*, 51:402-408.
- Labat E., Morel M., Rouau X. (2001). Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. *Food Hydrocolloids*, 15:47-52.
- Lynch E.J., Dal Bello F., Sheehan E.M., Cashman K.D., Arendt E.K. (2009). Fundamental studies on the reduction of salt on dough and bread characteristics. *Food Research International*, 42:885-891.
- Norma IRAM 15862. (1986). Cereales y harina. Método de determinación de actividad de la alfa-amilasa según Hagberg-Perten.
- Norma IRAM 15864. (2002). Harina de trigo, Determinación de gluten, Método del equipo "Glutomatic".
- Palacios M.C., Haros M., Sanz Y., Rosell C.M. (2008). Selection of lactic acid bacteria with high phytate degrading activity for application in whole wheat breadmaking. *LWT*, 41:82-92.
- Palacios M.C., Sanz Y., Haros M., Rosell C.M. (2006). Application of *Bifidobacterium* strains to the breadmaking process. *Process Biochemistry*, 41:2434-2440.
- Pedersen L., Kaacka K., Bergsøeb M.N., Adler-Nissen J. (2004). Rheological properties of biscuit dough from different cultivars, and relationship to baking characteristics. *Journal of Cereal Science*, 39:37-46.
- Primo-Martin C., van de Pijpekamp A., van Vliet T., de Jongh J., Plijter J.J., Hamer R.J. (2006). The role of the gluten network in the crispness of bread crust. *Journal of Cereal Science*, 43:342-352.
- Quaglia G. (1991). *Ciencia y tecnología de la panificación*. Editorial Acriba: Zaragoza, España. 485 p.
- Ribotta P., Morcillo M., León, A. (1999). Efecto de distintos oxidantes sobre la calidad de panes elaborados por el método tradicional Argentino. *Agriscientia*, 16:3-10.
- Rosell C.M., Rojas J.A., Benedito de Barber C. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15:75-81.
- Sanz J.M., Collar P.C., Haros M. (2008). Effect of wheat bran and enzyme addition on dough functional performance and phytic acid levels in bread. *Journal of Cereal Science*, 48:715-721.
- Selinheimo E., Kruuz K., Buchert J., Hopia A., Autio K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combinations on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43:152-159.
- Singh G.H., Singh N. (1999). Effect of additives on dough development, gaseous release and bread making properties. *Food Research International*, 32:691-697.
- Solito A., Pavesi R. (2003). *Tecnología, Camino a la salud: Reemplacemos el Bromato de Potasio*. Cámara Argentina de Concesionarios de Servicios de Comedores y Refrigerios. Universidad Nacional de Lanus. 50 p.
- Stathopoulos C.E., Tsiami A., Dobraszczyk B.J., Schofield J.D. (2006). Effect of heat on rheology of gluten fractions from flours with different bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 43:322-330.
- Steffolani M., Ribotta P., Pérez G., León A. (2010). Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 51:366-373.
- Stojceska V., Ainsworth P. (2008). The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads. *Food Chemistry*, 110:865-872.
- Sliwinski E., Kolster P., Vliet van T. (2004). On the relationship between large-deformation properties of wheat flour dough and baking quality. *Journal of Cereal Science* 39 231-245.
- Wang J., Rosell C.M., De Barbera C.B. (2002). Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*, 79:221-226.
- Wang M., van Vlieta T., Hamera R. (2004). How gluten properties are affected by pentosans. *Journal of Cereal Science*, 39:395-402.
- Weining H., Yangsoo K., Xianyu L., Rayas-Duarte P. (2008). Rheofermentometer parameters and bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing temperature. *Journal of Cereal Science*, 48:639-646.
- Wiggins C. (1998). Fermentación, horneado y enfriamiento. En: *Fabricación de Pan*. Cauvain S., Young L. (Eds.). Editorial Acriba: Zaragoza, España. pp. 139-171.
- Williams T., Pullen G. (1998). Ingredientes Funcionales. En: *Fabricación de Pan*. Cauvain S., Young L. (Eds.). Editorial Acriba: Zaragoza, España. pp. 51-92.