

Envejecimiento del pan. Efecto combinado de α -amilasa bacteriana y emulsificante en la textura y en las características amilográficas de la miga

María Victoria Eiras Grossmann¹, y Carmen Benedito de Barber²

RESUMEN. Se estudió el efecto simultáneo de una α -amilasa bacteriana y de un emulsificante (monoglicérido) en la textura y en las características amilográficas de la miga del pan, durante el almacenamiento. Los panes que contenían esos aditivos endurecieron menos y más lentamente que el control. Tanto la enzima como el emulsificante afectaron significativamente la textura, pero el emulsificante disminuyó el efecto anti-envejecimiento de la enzima. Esta acción reguladora del emulgente también fue observada en las características amilográficas de la miga (viscosidad en el pico, viscosidad a 50 °C y «setback»).

SUMMARY. Bread staling. Simultaneous effect of bacterial α -amylase and emulsifier on firmness and pasting properties of bread crumb. The effect of bacterial α -amylase and an emulsifier on firmness and amylograph characteristics of bread crumb during storage was studied. The bread which contained these additives was less firm and staled more slowly than the control. The enzyme and the emulsifier retarded firmness but the emulsifier inhibited the action of the α -amylase. The regulatory action of the emulsifier also was observed on amylograph characteristics of bread crumb (peak viscosity, cool viscosity and setback).

INTRODUCCION

El envejecimiento del pan es un fenómeno complejo, todavía no bien explicado, y que envuelve todas las modificaciones, excepto microbiológicas, que ocurren a partir de la salida del pan del horno. La velocidad en que se da depende de varios factores, incluyendo la formulación, el proceso de panificación y las condiciones de almacenamiento (1). La mayor parte de los estudios hechos al respecto del envejecimiento del pan apuntan la retrogradación del almidón como principal responsable por este fenómeno (2,3).

Más recientemente, el papel de la retrogradación del almidón en el endurecimiento del pan ha sido cuestionado. Dragsdorf y Varriano-Marston (4), a través de estudios de difracción de rayos X demostraron que no había correlación entre la retrogradación del almidón y el envejecimiento del pan y propusieron que este ocurría debido a una interacción entre almidón y proteínas. Las investigaciones realizadas empleando calorimetría diferencial de barradura también refuerzan esa constatación (5). Martin et al (6) y Martin y Hosney (7) propusieron un mecanismo que explica el endurecimiento del pan a través de la interacción almidón-proteína. De cualquier manera, tanto la retrogradación como la interacción proteína-almidón son afectadas por modificaciones causadas a este último.

Uno de los métodos más empleados en la industria para retardar el envejecimiento del pan es la adición de emulsificantes (8). Los estudios sobre la funcionalidad de los emulsificantes como agentes anti-envejecimiento destacan modificaciones en la viscosidad de suspensiones de almidón y la habilidad de complejar con la amilosa. Morad & D'Appolonia (9) estudiaron el efecto de emulsificantes en las propiedades de pasta de la miga de pan, en diferentes tiempos de

almacenamiento, y constataron aumento de la temperatura de pasta y de la viscosidad a 50 °C. Xu et al (10) también estudiaron la correlación entre acción de emulsificantes, características de la miga y endurecimiento del pan.

Las α -amilasas (de cereales, fúngicas o bacterianas) también pueden ser empleadas para retardar el envejecimiento del pan pues, al degradar el almidón, afectan su capacidad de interacción.

La disminución de la velocidad de endurecimiento del pan con el uso de α -amilasas bacterianas fue descrita por Dragsdorf y Varriano-Marston (4).

Lin y Lineback (3) suplementaron panes con alfa-amilasa bacteriana, con la finalidad de caracterizar los carbohidratos formados por degradación del almidón. Verificaron que se forman principalmente polímeros de bajo peso molecular y con cadena ramificada que, de alguna manera, interfieren en el proceso de envejecimiento del pan, aumentando su vida útil.

Frente a estas nuevas proposiciones, el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto combinado de α -amilasa bacteriana y emulsificante en la textura del pan y en las propiedades amilográficas de la miga, después de un tiempo de almacenamiento

MATERIALES Y METODOS

Materiales: En la elaboración de los panes se utilizó harina de trigo comercial (humedad= 14,14%; características alveográficas; W=334.10³ ergios; P/L=1,15) y levadura fresca. Los aditivos empleados fueron la enzima comercial Ceremyl 15.000 MG (amilasa bacteriana, mezcla de α -amilasa y pululanasa de Novo Nordisk, Dinamarca) y el monoestearato de glicerina (Mosa Alimentaria S.A., España), como emulsificante.

Método:

Elaboración de los panes: Se utilizó el proceso de masa directa para la elaboración de pan tipo francés, según la formulación presentada en la Tabla 1. La concentración de enzima (E) y emulsificante

1. Universidad Estadual de Londrina, Cx, Postal 6001 Londrina Brasil.
2. Laboratorio de Cereales del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Valencia, España

(Em) adicionada en cada ensayo varió de acuerdo con el diseño experimental. Esas concentraciones fueron determinadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, para la enzima, y a las cantidades más usuales, para el emulsificante. En el control no se empleó estos aditivos.

Después de horneadas, los panes se enfriaron a temperatura ambiente, por 1 h, se envasaron en bolsas de polipropileno coextrusionado biorientado, y se almacenaron a 25 ± 1 °C. Antes de envasar, los panes fueron rociados externamente con etanol al 70%, para prevenir la proliferación microbiana.

TABLA 1
Formulación de los panes

Ingredientes	% ^a
Harina	100,0
Levadura fresca	2,5
Sal	2,0
Agua ^b	57,5
α -amilasa	variable ^c
Emulsificante	variable ^c

a- en relación a la harina

b- de acuerdo con la determinación en el Farinógrafo

c- de acuerdo con el diseño experimental

Tiempo de amasado: 17 min

Fermentación en masa: hasta un incremento de vol. de 2, a 28 °C, 80 % H.R.

División: en porciones de 100g

Descanso intermedio: 10 min

Moldaje: mecánico

Fermentación en tablas: hasta un incremento de 2,28 °C, 80 % H.R.

Cocción: 23 min a 200 °C

Textura de los panes: En los días 0, 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento, tres panes de cada ensayo fueron cortado en rebanadas de 2 cm. de espesor y las medidas de textura se hicieron en las 2 rodajas centrales. Se utilizó una prensa Instron (Instron Food Testing Machine, mod. 1140, Inglaterra) con un cabezal de 500-5000 g, velocidad de descenso del émbolo: 100 mm/min., diámetro del émbolo: 17 mm, velocidad del papel: 200 mm/min y distintas sensibilidades, en función de la muestra y del tiempo de almacenamiento. Se consideró como consistencia la fuerza (g) requerida para comprimir la rebanada hasta 0,5 cm de espesor (75%), medida en la altura de la curva de compresión.

Características amilográficas de la miga: Para determinar las características amilográficas de la miga de los panes almacenados durante 7 días, se removió la corteza de los panes y la miga fue liofilizada y molida para pasar en cedazo de 60 mesh. Los ensayos fueron realizados en amilógrafo Brabender (modelo Sew, Duisburg, Alemania), empleando 70 g de miga y 435 ml de agua. Se adicionó 15 ml de solución 25 μ M de AgNO₃ para eliminar cualquier posible actividad amilolítica residual (11).

Los parámetros evaluados fueron: viscosidad máxima en el ciclo de calentamiento (VM), viscosidad a 50 °C en el enfriamiento (V-50) y «setback» (diferencia entre la viscosidad a 50 °C y la viscosidad al final del ciclo de temperatura constante).

Diseño estadístico: La formulación de los panes siguió un

diseño factorial completo (2^3), siendo el experimento totalmente al azar. Las variables y sus niveles son presentados en la Tabla 2. Los datos obtenidos para cada variable dependiente fueron tratados por análisis de regresión múltiple, según el programa SAS (12).

TABLA 2
Concentraciones de enzima y emulsificante empleados en la formulación de los panes

Aditivo	Concentración		
	-1	0	1
Enzima (ppm) ^a	50 (75NU) ^b	75 (112,5NU) ^b	100 (150NU) ^b
Emulsificante (%) ^a	0,0	0,5	1,0

a En relación al peso de harina

b NU= Unidades Novo de alfa-amilasa= cantidad de enzima que degrada 5,26 mg de almidón soluble por hora, a 37 °C, pH 5,6 de acuerdo con Novo-Nordisk, Dinamarca

RESULTADOS Y DISCUSION

Volumen específico: Mientras el pan control (sin los aditivos) presentó un volumen específico de 4,19 ml/g, todas las muestras con aditivos tuvieron valores superiores a 4,50 ml/g ($p < 0.05$).

El volumen específico fue influenciado solamente por el efecto lineal de la concentración del emulsificante (Em) como se observa en la Tabla 3. En la gráfica (Figura 1) generada a partir del modelo de regresión ajustado a los datos experimentales (Tabla 3) se observa que el volumen específico aumentó con el aumento de la concentración de Em.

FIGURA 1

Volumen específico de los panes, en función de la concentración de enzima y emulsificante

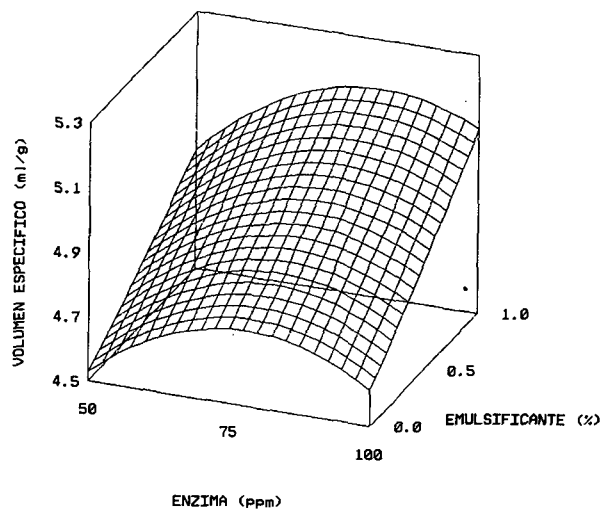


TABLA 3
Coeficientes^a de la ecuación de regresión para las variables respuesta

	Volumen específico	Textura 7 ^o día	Viscosidad máxima	Viscosidad «Setback» a 50 °C
Intercepto	4,92	2363,42	161,36	308,95
Enzima	n.s.	265,33 ^{a,b}	86,67 ^{***b}	-180,00 ^{***}
Emulsificante	0,20*	327,67*	n.s.	80,00*
Enzima x enzima	n.s.	n.s.	46,58 ^{**b}	n.s.
Emulsifi. x Emulsif.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Enzima x emulsif..	n.s.	n.s.	23,75 ^{**}	n.s.
R ²	0,7625	0,8136	0,9855	0,9155

a De las variables codificadas
b ***, **, *, significativos a P < 0,001, P < 0,01, y P < 0,05, respectivamente
c No significativo a P < 0,05

Respecto a la acción de α-amilasa, esta no influyó el volumen. Kuracina et al (11) encontraron que este aumentaba con la adición de la enzima. Probablemente la discrepancia se explica en función de los diferentes niveles de enzima empleados.

Los resultados de volumen específico no presentaron correlación con la textura de los panes (Tabla 4). Valjakka et al (18) tampoco observaron efecto de α-amilasa, bacteriana sobre el volumen específico ni correlación de este con la consistencia.

TABLA 4
Correlación entre textura de los panes con 7 días de almacenamiento y otras variables

Coeficientes de Correlación (r)	
Consistencia x	
Volumen específico	0,471
Parámetros amilográficos	
Viscosidad máxima	0,864 ^{***}
Viscosidad a 50 °C	0,904 ^{***}
«Setback»	0,906 ^{***}

*** Significativo a P < 0,001

Textura de los panes: Tanto E como Em afectaron la textura de los panes durante el almacenamiento (Tabla 3).

La velocidad de endurecimiento de los panes que contenían E fue menor que la del control. Lo mismo sucedió con la consistencia al final de 7 días de almacenamiento (Fig. 2). Hasta el 3^o día de almacenamiento, la muestra que tenía menos E (50 ppm) endureció menos que las que presentaban más enzima. De ahí en adelante, ocurrió lo que era esperado, o sea, cuanto más alta la concentración de E más blandos se conservaron los panes. No sabemos como explicar la inversión ocurrida en los tres primeros días. Dragsdorf y Varriano-Marston (4) también observaron disminución de la consistencia de los panes con el empleo de α-amilasa bacteriana, desde el primero hasta el séptimo día de almacenamiento.

En la Figura 3 está representado el efecto del Em en formulaciones que contenían la concentración máxima de E (100 ppm), comparadas al control. Este fue el que endureció más y con mayor velocidad. En los primeros tres días de almacenamiento no se observó diferencia significativa entre el efecto de la amilasa sola (0 % Em) o asociada a cualquiera de las concentraciones de emulsificante empleadas. Sin embargo, a partir del tercer día, la muestra que contenía E y 1% de Em endureció más y, al final de 7 días, las dos muestras que contenían Em estaban más duras que la que contenía solo E.

FIGURA 2
Efecto de la enzima en el endurecimiento del pan durante el almacenamiento

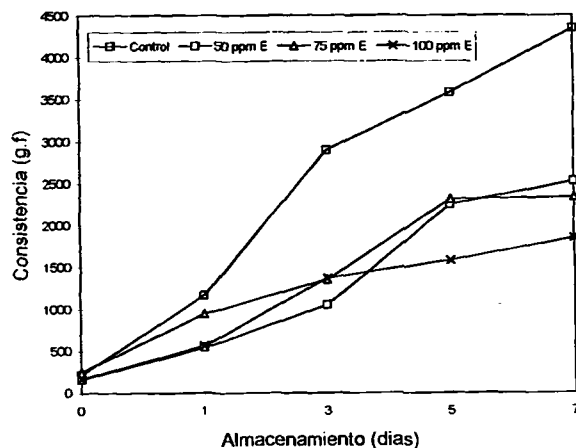
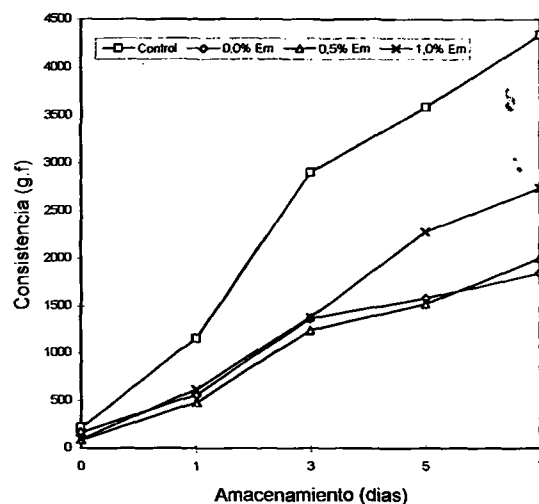


FIGURA 3
Efecto del emulsificante en el endurecimiento de panes conteniendo 100 ppm de enzima



El análisis estadístico de los datos experimentales relativos a la consistencia de los panes en el séptimo día de almacenamiento mostró que no ocurre una interacción significativa entre E y Em (Tabla 3). El modelo matemático ajustado explica 81,36% de la variación (R²=0,8136) y presenta como significativos sólo los efectos lineales de las dos variables estudiadas.

En el diagrama de superficie correspondiente al modelo matemático (Fig. 4) se observa que con mayor concentración de E los panes se conservaron más blandos. Por otro lado, la asociación de E con Em fue perjudicial, aumentando la consistencia de los panes, a medida que la concentración de Em aumentó.

FIGURA 4
Efecto de la enzima y del emulsificante en la consistencia
de los panes con 7 días de almacenamiento

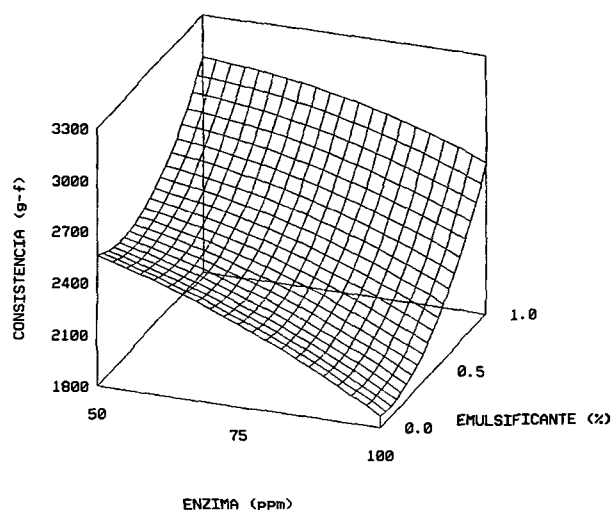
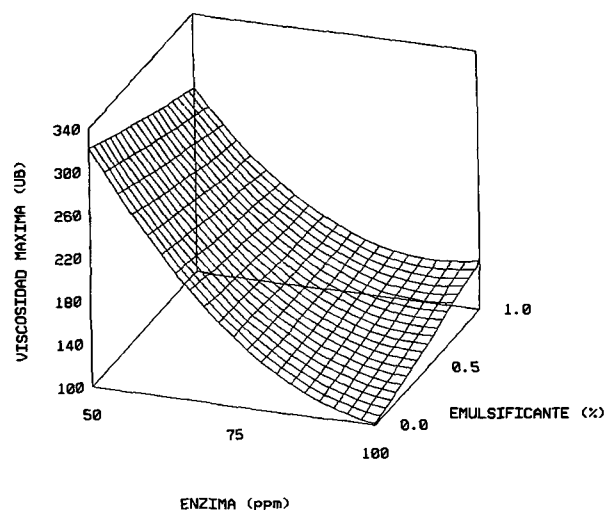


FIGURA 5
Efecto de la enzima y del emulsificante en la viscosidad máxima
(en amilógrafo Brabender) de la miga de los panes



Es sabido que los emulsificantes (monoglicéridos) disminuyen la gelatinización del almidón, porque se adhieren a la superficie de los gránulos, impidiendo la penetración del agua (9). En consecuencia, en presencia de Em, sería inhibida parcialmente la acción de E, ocasionando la formación de menos dextrinas de bajo peso molecular las que, según Martin y Hosney (7), ejercen un papel importante en la conservación del frescor del pan.

El antagonismo entre E y Em verificado en este estudio es aceptable si se considera que el mecanismo de acción del Em promueve condiciones adversas para la acción de E. Con todo, estos resultados contrarían los reportados por Valjakka et al (13) que observaron una acción aditiva entre emulsificante y α -amilasa, bacteriana y también las reportadas por Martin (1989), citado por Valjakka et al (13), que detectó un efecto sinérgico entre los dos aditivos.

Características amilográficas de la miga: Las curvas amilográficas de las migas de pan presentaron forma similar a las obtenidas por otros investigadores (14).

- **Viscosidad máxima en el ciclo de calentamiento (VM):** Comparadas con el control, que presentó una VM superior a 1000 UB (Unidades Brabender), todas las muestras que contenían los aditivos tuvieron una disminución acentuada en la viscosidad.

La VM fue afectada significativamente por los efectos lineal y cuadrático de la concentración de E y por la interacción E x Em (Tabla 3). En la Figura 5 se verifica que la VM disminuyó con el aumento de la concentración de E, para cualquier concentración de Em. Al mismo tiempo, el aumento de Em aumentó la VM cuando la concentración de E fue alta (próximo a 100 ppm), pero, en concentraciones menores, el efecto de Em no fue significativo.

De acuerdo con Dragsdorf y Varriano-Marston (4) el almidón de la miga es parcialmente gelatinizado durante el proceso de panificación. Por esa razón, conserva aún capacidad de hinchamiento en el amilógrafo, siendo entonces responsable por el pico de viscosidad en la fase de calentamiento. Xu et al (14) atribuyeron ese pico al hinchamiento del complejo formado por el almidón y otros ingredientes del pan.

La menor VM cuando se utiliza E se explica porque esta, al degradar el almidón, disminuye su capacidad de asociación y de hinchamiento. Cuando la fórmula contiene Em, este hace que la gelatinización ocurra en menor grado durante el horneado del pan. De esta manera, el almidón preserva una mayor capacidad de hinchar en el amilógrafo (9), justificando valores más altos para la viscosidad.

Xu et al (10) observaron correlación negativa entre VM y consistencia de la miga, en panes que contenían Em, lo que se explicaba porque la acción complejante del aditivo al mismo tiempo evitaba el endurecimiento dando bajos valores de consistencia y preservaba la capacidad de hinchamiento del almidón, dando altos valores de viscosidad.

En este estudio, la situación fue diferente. Se observó una alta correlación positiva entre VM y consistencia (Tabla 4). La discrepancia se explica porque el Em fue utilizado juntamente con E, haciendo que su acción inhibiera la acción de esta última y provocando, al mismo tiempo, aumento de VM en el amilógrafo y aumento de la consistencia del pan.

- **Viscosidad a 50 °C:** De acuerdo al análisis de variancia, la V-50 fue influenciada significativamente por los efectos lineales de E y Em (Tabla 3).

Al igual que lo que sucedió en la VM, los aditivos produjeron una reducción en la V-50, en comparación al control, que tuvo un valor superior a 1000 UB. Cuanto más alto el tenor de E, mejor fue la V-50 (Figura 6), pero la asociación E-Em ocasionó un aumento de esa viscosidad. Como se explicó anteriormente, Em inhibe la acción de E, preservando estructuras del almidón con mayor peso molecular y mayor capacidad de complejarse a los otros ingredientes/aditivos presentes en la miga del pan, resultando una viscosidad más alta al final del ciclo de resfriamiento.

En la Tabla 4 se observa que la V-50 presentó correlación directa con la consistencia, también en desacuerdo con lo observado por Xu et al (10). La razón de esto es la misma ya explicada para la VM.

Según Xu et al (14), la V-50 es provocada por la asociación entre la amilosa solubilizada y lípidos polares (presentes en la harina o adicionados) y también por los complejos amilosa-emulsificante.

Como en este estudio el Em parece haber inhibido la acción de E durante la panificación, las cadenas de amilosa se preservarían con mayor tamaño y mayor capacidad de complejar y ocasionar alta viscosidad al final del ciclo de resfriamiento.

«Setback»: Dependiente de los efectos lineales de las dos variables estudiadas (Tabla 3), el diagrama de superficie correspondiente al «setback» (Figura 7) presentó el mismo perfil que el de la viscosidad a 50 °C.

En este caso también se observó una correlación positiva con la consistencia (Tabla 4).

FIGURA 6
Viscosidad a 50 °C (en el ciclo de resfriamiento en amilógrafo Brabender) de la miga de los panes

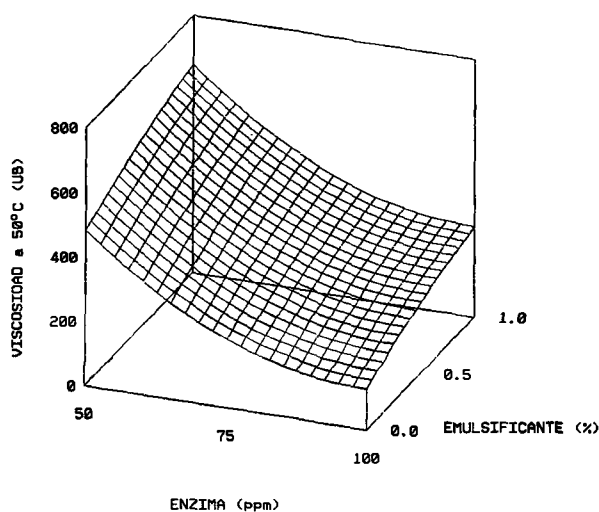
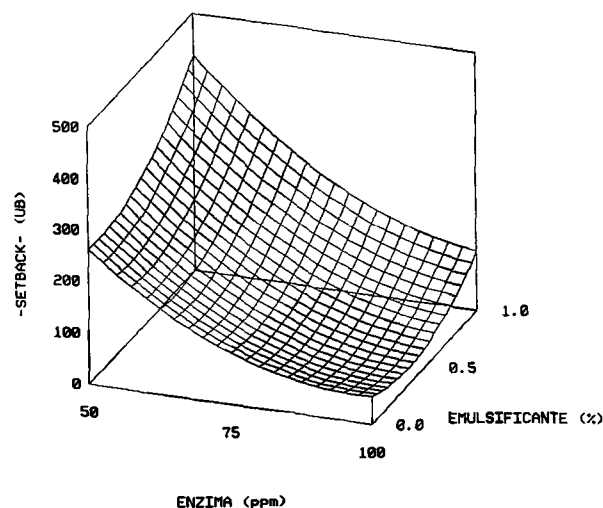


FIGURA 7
Efecto de la enzima y del emulsificante en el «setback» de la miga de los panes (en amilógrafo Brabender)



CONCLUSIONES

Este estudio demostró la ocurrencia de un efecto antagónico entre α -amilasa bacteriana y emulsificante en la acción retardadora de envejecimiento del pan y en las características amilográficas de la miga. Estos resultados son discrepantes con los obtenidos por otros investigadores y las diferencias se deben, probablemente, al empleo de enzimas de fuentes diferentes, con concentraciones diversas y asociadas también a variadas concentraciones de emulsificante. Así parece ser necesaria la realización de nuevos estudios, para determinar los límites para ocurrencia de sinergismo, efecto aditivo o antagonismo, cuando se emplea los dos aditivos simultáneamente. A parte de eso, las características tecnológicas de las harinas también pueden ser responsables por la diversidad de las observaciones.

REFERENCIAS

1. Stollmann U. & Lundgren B. Texture changes in white bread: effect of processing and storage. *Cereal Chem.* 64(4): 230-236, 1987.
2. Hebeda R.E., Bowles L.K. y Teagle W.M. Development in enzymes for retarding staling of baked goods. *Cereal Foods World* 35(5):453-457, 1990.
3. Lin W. y Lineback D.R. Changes in carbohydrate fractions in enzyme supplemented bread and the potential relationship to staling. *Starch*, 42(10):385-389, 1990.
4. Dragsdorf R.D. y Varriano-Marston E. Bread staling: X-ray diffraction studies on bread supplemented with alpha-amylases from different sources. *Cereal Chem.* 57(5):310-314, 1980.
5. Ghiasi K., Hosney R.C., Zelesnak K., Rogers D.E. Effect of waxy barley starch and reheating on firmness of bread crumb. *Cereal Chem.* 61(4):281-285, 1984.
6. Martin M.L., Zelesnak K.J. y Hosney R.C. A mechanism of bread firming. II. Role of starch swelling. *Cereal Chem.* 68(5):498-503, 1991.
7. Martin M.L., y Hosney R.C. A mechanism of bread firming. II. Role of starch hydrolyzing enzymes. *Cereal Chem.* 68(5):503-507, 1991.
8. Knightly W.H. Surfactants in baked foods: current practice and future trends. *Cereal Foods World*, 33(5):405-412, 1988.
9. Morad M.M. y D'Appolonia B.L. Effect of baking procedure and surfactants on the pasting properties of bread crumb. *Cereal Chem.* 57(4):239-241, 1980.
10. Xu A., Chung O.K. y Ponte J.G. Jr. Bread crumb amylograph studies. I Effects of storage time, shortening, flour lipids and surfactants. *Cereal Chem.* 69:495-501, 1992.
11. Kuracina T.A., Lorenz K. y Kulp K. Starch functionality as affected by amylases from different sources. *Cereal Chem.* 64(3):182-186, 1987.
12. SAS Institute. Guide for Personal Computers. Cary N.C.: SAS Institute Inc. 1988.
13. Valjakka T.T., Ponte J.G. Jr. y Kulp K. Studies on a raw-starch digesting enzyme. I. Comparison to fungal and bacterial enzymes and an emulsifier in white pan bread. *Cereal Chem.* 71(2):139-144, 1994.
14. Xu A., Ponte J.G. Jr. y Chung O.K. Bread crumb amylograph studies. II. Cause of unique properties, *Cereal Chem.* 69(5):502-507, 1992.

Recibido: 29-03-1996

Aceptado: 12-06-1997