

Efecto de distintos oxidantes sobre la calidad de panes elaborados por el método tradicional argentino

Ribotta, P., M. Morcillo y A. León

RESUMEN

La metodología de panificación tradicional argentina se destaca por utilizar escasa levadura y realizar fermentaciones muy largas, utilizando como oxidante bromato de potasio. Con la prohibición del uso de bromato desde el año 1998, cobró importancia el análisis de la acción de distintos oxidantes en estos procesos. En el presente trabajo se estudió la acción de 5 oxidantes sobre la retención de gases, el volumen de pan, las propiedades reológicas, la estructura de la miga y las interacciones entre proteínas. Los resultados de las electroforesis muestran que los oxidantes favorecen la formación de agregados proteicos, lo que estaría indicando el establecimiento de puentes disulfuro a partir de grupos sulfhidrilo. También se observa que ninguno de los aditivos en estudio puede suplantar por sí solo al bromato de potasio en este tipo de panificación, siendo la azodicarbonamida el oxidante que tiene el comportamiento más similar.

Palabras clave: panificación, oxidante, bromato, masa.

Ribotta, P., M. Morcillo y A. León, 1999. Effect of different oxidants on the quality of bread produced by the traditional Argentine technology. *Agriscentia XVI* : 3-10.

SUMMARY

Low amount of yeast, longer fermentation times and the use of potassium bromate are the most outstanding features of bread making technology in Argentina. The prohibition of potassium bromate in 1998 led to the study of the effects of different oxidants as a potential replacement. In this work, the effect of 5 different oxidants on gas retention, bread volume, rheological properties, crumb structure and protein interactions were compared. The SDS-PAGE results show that oxidants favored the formation of protein aggregates, which would indicate the formation of disulfide bonds from sulphhydryls groups. The results also show that none of the additives studied were able to replace on their own potassium bromate in this kind of bread making procedure, being the azodicarbonamide the oxidant with a more similar behavior to that of potassium bromate.

Key Words: breadmaking, oxidant, bromate, dough.

Ribotta, P., M. Morcillo y A. León. Química Biológica. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria. Casilla de Correo 509, 5000 Córdoba, Argentina. E-mail: pribotta@agro.uncor.edu

INTRODUCCIÓN

En la elaboración de pan se utilizan como aditivos distintos oxidantes; entre ellos el bromato de potasio, que produce un aumento en el volumen de las piezas y mejora las propiedades de amasado, la estructura de las celdas de gas y la retención de óxido carbónico.

En muchos países no está permitido el uso de bromato de potasio debido a su toxicidad, que se expresa con náuseas, trastornos gástricos, depresión del sistema nervioso central y posibles alteraciones renales (Ranun, 1992). Además, estudios realizados con ratas demuestran que es una sal potencialmente cancerígena (Kurokawa *et al.*, 1983), y se sabe que dicho efecto es producido por el bromato *per se*, lo que inhibe la posibilidad de utilizar el bromato de sodio o de calcio (De Stefanis, 1995).

En Argentina la mayor parte de la harina de trigo se utiliza para la elaboración de pan. En 1995 la molinera de trigo pan superó las 4.000.000 de toneladas, produciendo más de 3.000.000 de toneladas de harina para panificación (Alimentos Argentinos, 1998). Exceptuando a los grandes establecimientos, en nuestro país se panifica por el método de fermentación en tablas, que permite obtener un buen producto con un mínimo de infraestructura. Este método se sostiene en el uso del bromato de potasio como aditivo que mejora la calidad del pan, pero desde el año 1998 su uso se ha prohibido merced a la puesta en práctica de las Resoluciones Mercosur sobre Bromato de Potasio (Código Alimentario Argentino, 1998).

En otros países el bromato de potasio ha sido reemplazado exitosamente con distintos agentes, ya sean sales oxidantes o enzimas (Ranun, 1992); pero las diferencias con nuestra metodología de panificación, entre las que se destacan los tiempos de fermentación superiores a 8 horas y la escasa cantidad de levadura que se utiliza, impiden la adopción directa de las soluciones que se han propuesto.

Para resolver esta situación es necesario conocer exhaustivamente el mecanismo de acción del bromato de potasio. Hace muchos años ya se sugirió que participaba en la oxidación de las fracciones proteicas de las harinas (Sullivan *et al.*, 1940). La explicación más aceptable es que los grupos sulfhidrilo de las moléculas de proteínas son transformados en disulfuros por acción de los agentes oxidantes (Figueroa & Khan, 1991). Sin embargo se han mostrado evidencias de la participación de componentes no proteicos en la acción del bromato (Cunningham & Hlynka, 1958; Patil *et al.*, 1979).

También se ha analizado el efecto del agregado de bromato de potasio sobre la formación de agregados de glutenina determinados por (SE)-HPLC y se ha observado que no se relaciona consistentemente con el aumento de volumen de pan que se produce (Panozzo *et al.*, 1994).

Nada se conoce acerca del efecto de los oxidantes en panificaciones largas, en las que es necesario que la actividad oxidante se mantenga hasta el final del proceso; aunque se sabe que el bromato de potasio ejerce su acción oxidante en dos pasos por los que se transforma primero en bromito y luego en bromuro, esto hace que su acción sea lenta a diferencia de la mayoría de los oxidantes utilizados en panificación.

En el presente trabajo se analizó el efecto de distintos oxidantes sobre la calidad del pan, con el objetivo de estudiar las transformaciones físico-químicas que se producen y evaluar las posibilidades de cada uno para reemplazar al bromato de potasio en metodologías de panificación con fermentaciones superiores a las 8 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó harina de trigo 000 sin aditivos, provista por el molino Carlos Boero Romano SAIC.

Elaboración del pan

Se elaboraron panes utilizando la siguiente formulación:

Harina (100%), agua (60%), levadura (0,1%), sal (2%). Las muestras fueron adicionadas en las proporciones más comúnmente utilizadas, con bromato de potasio (0,007%), ácido ascórbico (0,02%), azodicarbonamida (Granotec Argentina S.A.) (0,002%), yodato de potasio (0,007%) y sulfato cúprico (0,007%).

Se realizó la mezcla de los ingredientes en una amasadora Phillips HR 1495 durante 5 minutos, se dejó descansar durante 20 min, se desgasificó, se laminó, y posteriormente se bolearon las piezas a mano y se dejaron fermentar en tablas durante 10 horas aproximadamente.

El horneado se efectuó a 180 °C durante 17 min. Las piezas se enfriaron a temperatura ambiente durante 90 min antes de realizar los ensayos.

El volumen de pan se midió por desplazamiento del volumen de semillas de colza (AACC, 1987).

Paralelamente se utilizaron 50 g de masa para realizar mediciones del crecimiento de la masa en un volumenómetro.

Estudios reológicos

Se utilizó un alveógrafo Chopin. En este ensayo se prepara una masa de harina, agua y cloruro de sodio, con la que se obtienen cinco piezas en forma de disco. A continuación se le insufla aire formando una burbuja con cada una de las piezas y se registra la presión en su interior. La curva graficada está relacionada con la resistencia de la masa a la deformación (AACC, 1987).

Se empleó un farinógrafo Brabender para determinar: absorción de agua, tiempo de desarrollo de la masa, estabilidad y aflojamiento de la masa. Mediante este análisis se obtiene un diagrama de la resistencia que opone la masa a un trabajo mecánico continuo en función del tiempo, en condiciones constantes de ensayo. Dicho diagrama permite extraer diversas conclusiones acerca de la aptitud industrial de la harina (AACC, 1987).

Extracción de proteínas

Se estudió el comportamiento de las especies presentes en las distintas fracciones mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Las extracciones se realizaron sobre 45 mg de miga de pan deshidratada durante 72 horas en estufa a 35 °C y molida en un mortero, con 1,5 ml de la siguiente solución: Buffer Tris/HCl (pH = 6,8) 0,063 M; SDS 2% (p/v); Glicerol 10% (v/v); Azul de Bromofenol 0,01% (p/v).

La mezcla se dejó a temperatura ambiente por 2 horas con agitación cada 15 min, se calentó durante 3 min en un baño de agua hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó y se tomó una alícuota de la capa superior que se utilizó como extracto de proteínas.

Electroforesis

Las electroforesis se hicieron en placa (70 x 80 x 1 mm) sobre geles de poliacrilamida con SDS, de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (1970). Se utilizó un equipo Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad Laboratories). El desarrollo de las electroforesis se hizo a un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 90 minutos.

Se realizaron geles con dos apiladores y un separador, con el objetivo de determinar si se producen cambios en el tamaño en los agregados proteicos debido al efecto de los distintos oxidantes usados sobre las proteínas que forman el gluten. El primer gel apilador se hizo con acrilamida al 4% y bisacrilamida al 0,108% y el segundo al 8% de acrilamida y al 0,216% de bisacrilamida. El gel

separador se realizó con acrilamida al 12% y bisacrilamida al 0,48%.

Análisis de la estructura de la miga.

Para analizar la estructura de la miga de los panes, se tomaron fotografías de las rodajas (1 cm de espesor) de los distintos panes con una cámara Nikon 90 con lente macro de 50 mm, filtro azul 80 B, velocidad 1/8 s, abertura de diafragma 11. Las fotografías se tomaron usando una película Fuyi 100. La iluminación se realizó con cuatro lámparas flood de 500 W a una distancia de 70 cm del objetivo. Las fotografías fueron escaneadas y se analizaron con un analizador de imagen Image-1 de Universal Imaging Corporation. Las imágenes se analizaron en escala de grises (0 negro, 255 blanco) y se determinó experimentalmente un nivel de gris de 180 que se utilizó para binarizar todas las imágenes. La imagen binarizada tiene sólo dos valores: 0 para las áreas vacías (negro, alvéolos de gas) y 255 para las paredes de los alvéolos (blanco, masa cocida).

Se seleccionó un área del mismo tamaño para todos los panes, de la parte central de la rodaja. Para obtener los parámetros abajo mencionados, se asignó la categoría de objeto a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0-180.

Parámetros obtenidos

Área media de objeto, Am: número de píxeles que hacen al objeto multiplicado por el área de un píxel. En este estudio se estableció que los alvéolos son los objetos.

Número de objetos, H: cantidad de alvéolos en la masa cocida.

Área porcentual, A%: es una medida del tamaño del objeto con respecto al área de medida. Relación entre el área de los alvéolos y el área total tomada.

Análisis de las electroforesis.

Para determinar las variaciones que se produjeron en la agregación de proteínas con los distintos aditivos, se colocó la misma cantidad de proteína en cada canal de los geles, y se cuantificó la densidad óptica integrada de cada banda mediante un analizador de imágenes de Pharmacia Biotech. Para determinar la linealidad de la respuesta del procedimiento se sembraron diferentes cantidades de proteínas (4,5-51,0 µg). Se obtuvo un valor de $r = 0,955$ al estudiar el grado de asociación con el coeficiente de Pearson entre la con-

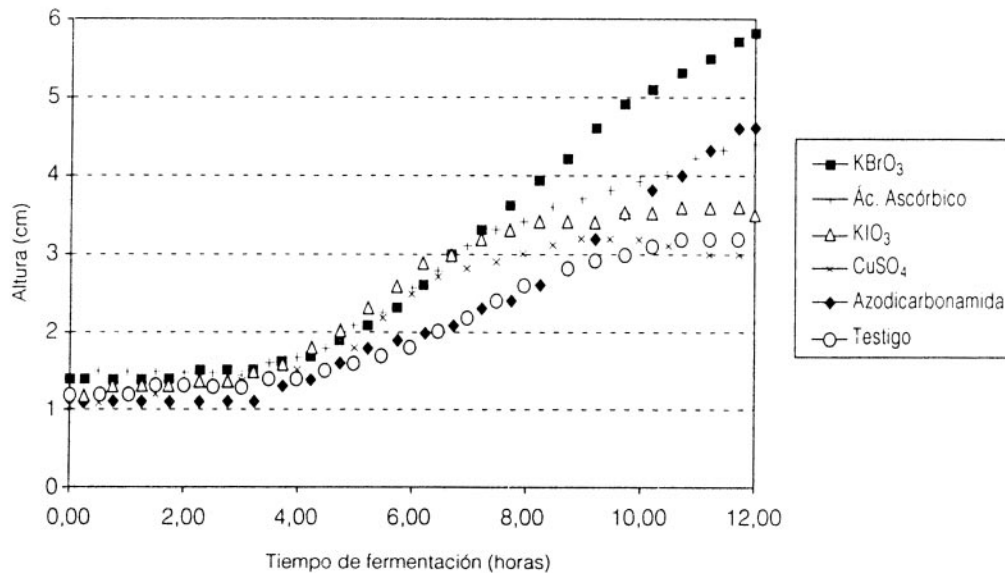


Figura 1. Evolución de la altura de la masa con distintos aditivos en el volumenómetro.

centración de proteínas y la Densidad Óptica Integrada (valor de intensidad media por el área de la banda, IOD).

Los resultados se expresaron como la relación entre la densidad óptica de la banda por la suma de las densidades ópticas de todas las bandas de cada muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Retención de CO₂

Con las masas adicionadas utilizadas para elaborar pan, se hicieron estudios del incremento de volumen en función del tiempo.

De los resultados obtenidos en el volumenómetro se observa que hasta las 8 horas de fermentación las muestras aditivadas con ácido ascórbico producen un aumento de volumen similar al obtenido con bromato de potasio, pero a tiempos más prolongados ninguna alcanza los valores de la muestra con el bromato (figura 1).

Se ha postulado que el bromato de potasio produce un incremento en el volumen de pan durante los primeros minutos del horneado (De Stefanis, 1995), los presentes resultados muestran que el bromato también produce un incremento en la capacidad de retener gases durante la fermentación y que cuando éstas son superiores a 8 horas se establecen diferencias claras antes que las piezas ingresen al horno.

Elaboración de pan

Los panes obtenidos con las masas aditivadas con los distintos oxidantes muestran la misma tendencia observada en el volumenómetro (figura 2).

Midiendo el volumen de los panes y determinando el volumen específico, se observa que con el método de panificación tradicional de Argentina ninguno de los aditivos utilizados es capaz de producir panes de calidad similar a los elaborados con bromato.

Con la intención de saber si el efecto del aditivo se extendía a otros aspectos además del volumen de pan, se estudió la estructura de la miga con el analizador de imágenes; los resultados se pueden observar en la tabla 1.

De los resultados se desprende que mientras el ácido ascórbico aumenta el número de celdas, el

Tabla 1. Resultados del análisis de imágenes sobre rodajas de pan.

Muestra	A _m	H	A%
Acido Ascórbico	0,542	1001	38,73
Azodicarbonamida	0,674	833	42,08
Bromato de potasio	0,814	777	45,13
Yodato de potasio	0,679	864	40,40
Sulfato de cobre	0,586	966	37,96
Testigo	0,575	960	39,37

A_m: área media de las celdas de gas (mm²). H: número de celdas. A%: área porcentual.

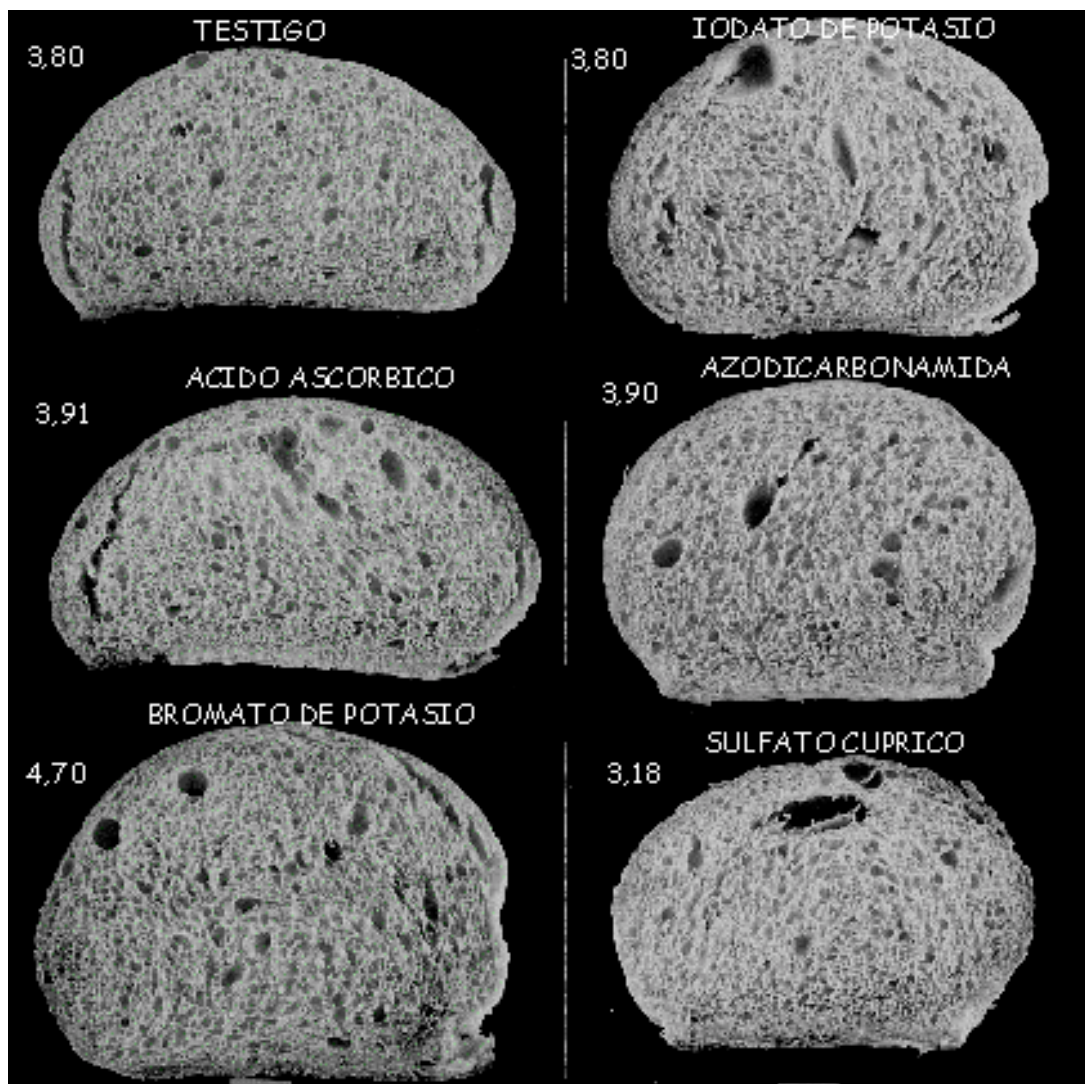


Figura 2. Fotografías de cortes de panes obtenidos con los distintos oxidantes en estudio. Se indica el valor de volumen específico de pan en cm³/g.

bromato produce un menor número de celdas de mayor tamaño que hacen que sea mayor el área proporcional de los alvéolos. Se destaca también que la azodicarbonamida es el otro oxidante que produce un incremento en el tamaño de las celdas y un aumento en el área total.

Estudios reológicos

La influencia de los distintos oxidantes sobre las características de la masa se estudió mediante la utilización del alveógrafo de Chopin y el farinógrafo

Brabender, obteniendo los resultados que se muestran en las tablas 2 y 3.

Ninguno de los aditivos modifica sustancialmente la absorción de agua de la masa. El bromato es el aditivo que menos altera el tiempo de desarrollo, mientras que el ácido ascórbico lo aumenta y los demás lo disminuyen.

Analizando los alveogramas se observa que todos los oxidantes evaluados actúan acortando las masas por aumento de la tenacidad (P); mientras que la extensibilidad (L) y el índice de hinchamien-

Tabla 2. Valores farinográficos obtenidos con masa aditivada.

Muestra	AA(%)	Td(min)	Te(min)	A(UB)
Acido ascórbico	67,3	11,00	9,50	180
Azodicarbonamida	68,2	9,00	6,50	195
Bromato de potasio	67,8	10,50	8,50	170
Yodato de potasio	68,2	8,83	5,00	200
Sulfato de cobre	68,0	9,50	6,67	190
Testigo	67,4	10,42	7,00	190

A: porcentaje de agua absorbida. Td: tiempo de desarrollo. Te: tiempo de estabilidad. A: aflojamiento UB: Unidades Brabender.

to (G) disminuyeron con respecto al testigo para todas las muestras, excepto el ácido ascórbico. La relación de equilibrio tenacidad/extensibilidad (P/L) se incrementó con el uso de todos los oxidantes.

El valor de fuerza panadera (W) se mantuvo al nivel del testigo con el bromato, pero fue menor con azodicarbonamida, yodato de potasio y sulfato de cobre. Estos dos últimos producen un aumento exagerado de la tenacidad y una disminución muy acentuada de la extensibilidad, todo esto provoca una caída del W y una pérdida de fuerza en la masa. El ácido ascórbico fue el único oxidante que mejoró el valor de fuerza panadera por aumento del P sin decrecer el L.

Análisis de proteínas

La influencia de los distintos oxidantes sobre la agregación de las proteínas de la harina se estudió mediante SDS-PAGE con multistacking. Las proteínas extraídas de la miga de los panes en condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol) se sepa-

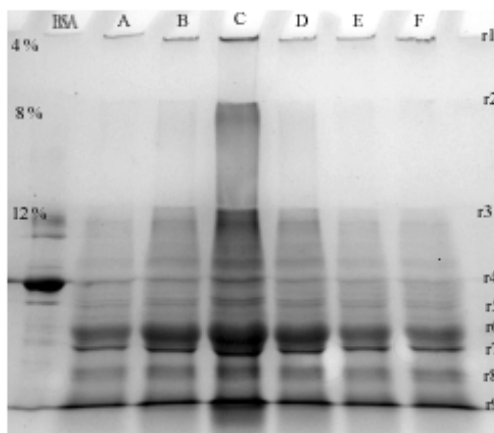


Figura 3. SDS-PAGE en multistacking de los extractos de proteínas sin agente reductor, obtenidos a partir de miga de pan. **BSA:** albúmina sérica bovina (PM 66,2 kDa), A: ácido ascórbico, B: bromato de potasio, C: yodato de potasio, D: sulfato de cobre, E: azodicarbonamida, y F: testigo.

raron según sus tamaños moleculares. A medida que la concentración de acrilamida y bisacrilamida aumenta, el tamaño del poro se hace más pequeño; es decir, el tamaño del poro del gel de 4% es mayor que en el gel de 12%. Las proteínas ubicadas en cada origen corresponden a aquellos tamaños moleculares que fueron demasiado grandes para migrar a la próxima fracción del gel. En consecuencia, los tamaños moleculares de los agregados de proteínas en el origen del gel a 4% son muchos más grandes que aquellos en el origen del gel de 12%.

En la figura 3 se puede ver un gel obtenido por el procedimiento mencionado. Se destaca la intensa coloración obtenida en el carril correspondiente al

Tabla 3. Valores alveográficos obtenidos con masa aditivada

Muestra	P(mm)	L (mm)	G(ml)	W(10 ⁻⁴ J)	P/L
Acido ascórbico	133	51	15,8	303	2,61
Azodicarbonamida	136	39	13,8	245	3,49
Bromato de potasio	140	44	14,8	279	3,18
Yodato de potasio	158	21	10,1	148	7,52
Sulfato de cobre	175	24	10,9	188	7,29
Testigo	120	50	15,7	271	2,40

P: altura de la curva x 1,1. $G: \sqrt{V_{rupt.}}$. W: $1,32x \frac{V}{L} \times S$ V: Volumen de aire. S: Área bajo la curva. L: Largo de la curva

Tabla 4. Densidad óptica integrada relativa de las diferentes bandas obtenidas en los geles en multistacking.

Bandas	Acido ascórbico	Azodicar-bonamida	Bromato de potasio	Yodato de potasio	Sulfato de cobre	Testigo
r1	0,0222	0,0223	0,0255	0,0206	0,0232	0,0221
r2	0,0403	0,0450	0,0440	0,0687	0,1289	0,0415
r3	0,1151	0,0920	0,0980	0,1773	0,1743	0,1664
r4	0,1356	0,0887	0,0853	0,1071	0,0856	0,1042
r5	0,1900	0,2324	0,2364	0,1274	0,1097	0,1412
r6	0,2290	0,2188	0,1971	0,2109	0,1951	0,2231
r8	0,1021	0,1207	0,1184	0,0978	0,0826	0,1014
r9	0,1656	0,1801	0,1953	0,1901	0,2006	0,1999

yodato de potasio, que obliga a analizar las distintas bandas calculando la intensidad relativa.

Analizando el efecto de los distintos oxidantes sobre la agregación de las proteínas (tabla 4), se puede observar que los perfiles electroforéticos son claramente afectados por el agregado de oxidantes; destacándose que el bromato de potasio, el ácido ascórbico y la azodicarbonamida favorecen la formación de agregados moleculares de alto peso molecular que pueden extraerse desde el pan horneado.

En la tabla 5 se presenta el grado de asociación (coeficiente de correlación r de Pearson) entre el volumen específico de los panes y los datos del analizador de imagen.

El análisis de los resultados muestra que aquellos oxidantes que provocan un aumento en el número de celdas, no producen un incremento en el volumen de pan; el incremento en el área de los alvéolos muestra una fuerte asociación con el volumen de pan.

En la tabla 6 se estableció el grado de asociación obtenido entre las distintas bandas electroforéticas y el volumen específico de pan.

Tabla 5. Grado de asociación, analizado por Pearson, entre las características de la miga determinadas con el analizador de imágenes y el volumen específico de pan.

Estructura de las celdas	Coefficiente Pearson
A_m	0,7465
H	-0,6735
$A\%$	0,8994

El grado de asociación observado entre las distintas bandas y el volumen de pan, indica que la aparición de r1, r5 y r8 en desmedro de las bandas r2 y r3 son beneficiosas para la calidad de panificación.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten concluir que con el método de panificación tradicional argentino, el bromato de potasio produce un volumen específico de pan y una estructura de miga abierta que no puede lograrse con ninguno de los otros oxidantes en estudio, entre los cuales sólo el ácido ascórbico y la azodicarbonamida son capaces de favorecer la obtención de panes de mayor volumen que el testigo.

El bromato de potasio se distingue por incrementar el volumen de la masa durante la fermentación,

Tabla 6. Grado de asociación obtenido entre las distintas bandas electroforéticas y el volumen específico de pan.

Bandas electroforéticas	Coefficiente Pearson
r1	0,5487
r2	-0,7298
r3	-0,6763
r4	-0,0438
r5	0,7859
r6	-0,0151
r8	0,8122
r9	-0,1440

producir panes con alvéolos de mayor tamaño y facilitar la formación de agregados proteicos, fundamentalmente las de la banda r5. La azodicarbonamida es el oxidante que según estos parámetros se comporta de manera más similar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de la EEA Marcos Juárez del INTA por la realización de los alveogramas y los farinogramas. El presente trabajo fue financiado por CONICOR y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC, 1987. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. AACC. St. Paul. MN.
- Alimentos Argentinos, 1998. Suplemento: Cadenas alimentarias. 3:2-6.
- Código Alimentario Argentino, 1998. Anexo Mercosur - GMC - RES 073/93.
- Figuerola, J. and K. Khan, 1991. "The relationship of bromate requirement and sugar in breadmaking and implications for loaf volume potential of hard red spring wheat flours". *Cereal Chemistry* 68:284-290.
- Kurokawa, Y.; Y. Hayashi; A. Maekawa; T. Takahashi; T. Kokubo and S. Odashima, 1983. "Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats". *Journal of National Cancer Institute* 71:965-970.
- Laemmli, U., 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227:680-685.
- Panozzo, J.; F. Bekes; C. Wrigley and R. Gupta, 1994. "The effects of bromate (0-30 ppm) on the proteins and lipids of dough". *Cereal Chemistry* 71:195-199.
- Ranun, P., 1992. "Potassium bromate in bread baking". *Cereal Foods World* 37:253-258.
- Sullivan, B.; M. Howe; F. Schmalz and G. Astleford, 1940. "The action of oxidizing and reducing agents on flour". *Cereal Chemistry* 5:507-528.

