



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química
Ingeniería en Alimentos

PROFESOR PATROCINANTE

Andrea Bunger T.
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile.

DIRECTORES DE MEMORIA

Andrea Bunger T.
Departamento de Ciencia de los
Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile.

Franco Pedreschi P.
Departamento de Ingeniería
Química y de Bioprocesos
Pontificia Universidad Católica.

Salomé Mariotti C.
Departamento de Ingeniería
Química y de Bioprocesos
Pontificia Universidad Católica.

**REDUCCIÓN DEL CONTENIDO DE ACRILAMIDA EN PAN TIPO
HALLULLA MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE
ASPARAGINASA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

CAROLINA ISABEL PLAZA DÍAZ

Santiago - Chile

2015

LA PRESENTE MEMORIA ES PARTE DEL
PROYECTO FONDEF D10I1109 TITULADO
“Minimización de la formación de acrilamida
en alimentos de consumo masivo en Chile”
Y DEL PROYECTO FONDECYT 1110510
“Technologies for furan mitigation in highly
consumed Chilean foods processed
at high temperatures”

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que contribuyeron en la realización de esta memoria de título. En primer lugar a mi Directora de Tesis y Profesora Patrocinante, Andrea Bunger, por su gran ayuda, guía y buena disposición en este proceso. Fue un agrado trabajar con usted y sentir su gran apoyo, destaco su profesionalismo y compromiso. Al Profesor Franco Pedreschi por confiar en mí y darme la oportunidad de participar en este proyecto, destaco su profesionalismo y buena disposición en la ejecución de esta memoria y a Salomé Mariotti, por aportar con sus conocimientos en el tema.

Además agradezco a Juan Pablo Gómez por su inmensa colaboración en los ensayos y estudios analíticos, fue un agrado trabajar contigo. También a Nicolás Carvajal y Camila Muñoz por su compañerismo y colaboración en mi integración al laboratorio y por siempre generar un grato ambiente de trabajo.

A todos los panelistas que contribuyeron con sus valiosas evaluaciones en los resultados de esta memoria, mostrando siempre compromiso y seriedad.

Agradezco a mi familia (Padres María Isabel y Juan Enrique; Hermana Daniela y a Guillermo) por su apoyo incondicional. Gracias por estar siempre conmigo escuchar y aconsejarme cada vez que lo necesite.

Finalmente expreso mis agradecimientos a los proyectos FONDEF D10I1109 titulado “Minimización de la formación de acrilamida en alimentos de consumo masivo en Chile” y FONDECYT 1110510 titulado “Technologies for furan mitigation in highly consumed Chilean foods processed at high temperatures” por el financiamiento para la realización de esta memoria. Y a todas las personas de la Universidad de Chile y Pontificia Universidad Católica que me prestaron ayuda.

INDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1 Definición de Pan.....	4
2.2 Materias primas para elaboración pan tipo hallulla	4
2.2.1 Harina	4
2.2.2 Levadura.....	5
2.2.3 Sal	6
2.2.4 Agua	7
2.2.5 Azúcar (sacarosa).....	7
2.2.6 Leche.....	7
2.2.7 Materia grasa.....	8
2.3 Proceso de Panificación	8
2.3.1 Recepción de materias primas.....	8
2.3.2 Pesaje y dosificación	8
2.3.3 Mezclado o amasado.....	8
2.3.4 Fermentación.....	9
2.3.5 Laminado.....	10
2.3.6 División o corte	10
2.3.7 Leudación o fermentación final	10
2.3.8 Horneo.....	10
2.3.9 Enfriamiento	11
2.4 Acrilamida.....	12
2.4.1 Acrilamida en alimentos.....	13
2.4.2 Formación de acrilamida en los alimentos	14
2.4.3 Técnicas de mitigación de acrilamida en alimentos	16
2.4.4 Asparaginasa.....	18

3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo General	19
3.1.1 Objetivos Específicos.....	19
4. HIPÓTESIS	19
5. MATERIALES Y EQUIPOS	20
5.1 Materiales elaboración pan tipo hallulla	20
5.2 Equipos elaboración pan tipo hallulla.....	20
5.3 Reactivos e insumos principales para la cuantificación de acrilamida	20
5.4 Insumos secundarios para la cuantificación de acrilamida.....	21
5.5 Equipos para cuantificación de acrilamida	21
5.6 Materiales evaluación sensorial	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 Elaboración pan tipo hallulla	22
6.2 Diagrama de bloques del proceso de elaboración de pan tipo hallulla.	23
6.3 Descripción del proceso de elaboración de pan tipo hallulla	24
6.4 Método para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla.	25
6.4.1 Preparación de las soluciones	25
6.4.2 Condiciones del equipo Cromatógrafo de Gases -Espectrómetro de Masas (GC-MS).....	26
6.4.3 Expresión de resultados para la cuantificación de acrilamida	27
6.4.4 Desempeño analítico de la técnica para la cuantificación de acrilamida	28
6.5 Condiciones experimentales para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin y con la adición de enzima	28
6.6 Metodología de evaluación sensorial	29
6.6.1 Elección de jueces	29
6.6.2 Entrenamiento	29
6.6.3 Validación del panel sensorial.....	32
6.6.4 Evaluación sensorial de pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.....	34
6.6.5 Análisis estadísticos.....	34

6.6.6 Análisis de varianza	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
7.1 Desempeño analítico de la técnica para la cuantificación de acrilamida	35
7.2 Cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin la adición de enzima asparaginasa	36
7.3 Cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa	39
7.4 Entrenamiento panel sensorial.....	41
7.4.1 Test de calidad	42
7.4.2 Perfil descriptivo	42
7.5 Validación del panel sensorial.....	44
7.6 Evaluación sensorial de pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa	46
7.6.1 Test de calidad	46
7.6.2 Perfil descriptivo	48
8. CONCLUSIONES	51
9. BIBLIOGRAFÍA.....	52
10. ANEXOS.....	57
Anexo 1: Ficha de respuesta descripción de pan tipo hallulla. Primera sesión de entrenamiento.....	57
Anexo 2: Ficha test descriptivo para pan tipo hallulla. Segunda sesión de entrenamiento.....	58
Anexo 3: Resultados cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.....	60
Anexo 4: Resultados primera sesión de entrenamiento.	61
Anexo 5: Resultados entrenamiento panel sensorial para el test de calidad. ...	62
Anexo 6: Tabla para valoración de calidad con escala Karlsruhe	63
Anexo 7: Ficha de respuesta test de calidad para pan tipo hallulla.	64
Anexo 8: Resultados entrenamiento panel sensorial para el perfil descriptivo. Primera parte.	65
Anexo 9: Ficha final test descriptivo para pan tipo hallulla.	66

Anexo 10: Resultados ANOVA tres vías para test calidad con 9 jueces.	67
Anexo 11: Prueba de múltiples rangos de Tukey (ANOVA tres vías) del test de calidad con 9 jueces.	68
Anexo 12: Comparación fotográfica de panes tipo hallulla control y con la adición de enzima asparaginasa.....	69
Anexo 13: Resultados ANOVA tres vías para perfil descriptivo con 9 jueces...	69
Anexo 14: Prueba de múltiples rangos de Tukey (ANOVA tres vías) del perfil descriptivo con 9 jueces.....	70
Anexo 15: Promedios descriptores del perfil descriptivo para pan tipo hallulla control y pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Formulación pan tipo hallulla.....	22
Tabla 2: Condiciones experimentales para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin y con la adición de enzima asparaginasa.	28
Tabla 3: Muestras y tests aplicados en las sesiones de entrenamiento del panel para pan tipo hallulla.....	30
Tabla 4: Características principales de los atributos para la evaluación sensorial de pan tipo hallulla, utilizados en la primera sesión de entrenamiento.	31
Tabla 5: Grados de calidad, calificación verbal y calificación numérica de escala Karlsruhe.	32
Tabla 6: Condiciones experimentales de las muestras de pan tipo hallulla para la validación del panel.	33
Tabla 7: Parámetros para la evaluación del desempeño del panel.	33
Tabla 8: Resultados medición de los parámetros para determinar el desempeño analítico para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla.....	35
Tabla 9: Resultados cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin la adición de enzima asparaginasa.....	36
Tabla 10: Resultado entrenamiento panel sensorial para el perfil descriptivo. .	43
Tabla 11: Resultados validación del panel sensorial para el perfil descriptivo. .	44
Tabla 12: Resultados validación jueces para perfil descriptivo.	45
Tabla 13: Resultados test de calidad con escala Karlsruhe para pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.	46
Tabla 14: Resultado test de calidad para pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa con los 7 jueces finales.	47
Tabla 15: Resultados perfil descriptivo para pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa con los 7 jueces finales.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mercado de alimentos procesados en Chile.	2
Figura 2: Distribución de las ventas de pan por producto en Chile.....	3
Figura 3: Estructura química de la molécula de acrilamida	12
Figura 4: Promedio de acrilamida en distintos alimentos.	13
Figura 5: Estructura química de la molécula de asparagina.....	14
Figura 6: Algunas vías sugeridas para la formación de acrilamida a partir del aminoácido asparagina.....	15
Figura 7: Curva de calibración para la cuantificación de la concentración de acrilamida para pan tipo hallulla.....	35
Figura 8: Comparación fotográfica pan tipo hallulla sin fermentar horneado respecto a pan tipo hallulla control (fermentado).	37
Figura 9: Concentración de acrilamida respecto a la concentración de enzima asparaginasa adicionada al pan tipo hallulla.....	39
Figura 10: Folio de fotografías “Coloración de panes en distintos tiempos de horneado”.	41
Figura 11: Análisis descriptivo para pan tipo hallulla sin y con la adición de enzima asparaginasa.....	50

RESUMEN

Los alimentos ricos en carbohidratos y que son sometidos a altas temperaturas para su elaboración, generan compuestos potencialmente tóxicos, como lo es la acrilamida, la cual es estudiada como cancerígeno y genotóxico para humanos (2A), siendo el aminoácido asparagina su mayor precursor.

El objetivo de este estudio fue elaborar pan tipo hallulla con adición de asparaginasa para obtener niveles reducidos de acrilamida, conservando sus características sensoriales originales.

El contenido de acrilamida se determinó en un Cromatógrafo de Gases - Espectrómetro de Masas (GC-MS), en las muestras de pan por triplicado.

Se determinó que el contenido de acrilamida presente en el pan control es 108 µg/kg. Se evaluó un rango de concentración de 20-300 ppm de enzima asparaginasa/ kg de harina, siendo el rango óptimo de 100 y 150 ppm de enzima/ kg de harina, pues se reduce la cantidad de acrilamida entre 80% y más del 99%, respectivamente.

Mediante un panel sensorial entrenado se evaluó la calidad sensorial y perfil descriptivo del pan elaborado con enzima asparaginasa (300 y 150 ppm de enzima/ kg de harina) respecto al pan de la formulación control.

Los resultados muestran que la calidad sensorial fue calificada como grado 1, sin diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el pan control y el pan elaborado con asparaginasa, para los atributos color, apariencia/forma, aroma, sabor y textura. Resultado similar presentó el perfil descriptivo, pues no hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre muestras, para los descriptores color corteza, aroma fermentado, aroma tostado/quemado, dureza al tacto, elasticidad miga, dureza en boca, sabor fermentación/levadura y sabor tostado.

La elaboración de pan tipo hallulla con la incorporación de la enzima asparaginasa resultó ser una medida adecuada para mitigar la acrilamida en el pan final, obteniendo una reducción casi completa de acrilamida y conservando las características sensoriales originales del pan.

ABSTRACT

“Reduction of acrylamide in “hallulla” bread treated with asparaginase”.

Foods rich in carbohydrates cooked at high temperatures generate potentially toxic compounds such as acrylamide, which is studied as carcinogenic and genotoxic compound to humans (2A) and whose main precursor is the amino acid asparagine.

The aim of this study was to develop hallulla bread with added asparaginase in order to reduce the levels of acrylamide after baking while preserving its original sensorial characteristics.

Acrylamide content was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in the bread samples in triplicate.

It was determined that the level of acrylamide present in the control bread was 108 µg/kg. A concentration range of 20-300 ppm of asparaginase enzyme/ kg of flour was evaluated, with the optimum range of 100 to 150 ppm of enzyme/ kg of flour, reducing the amount of acrylamide between 80% and 99%, respectively.

A trained panel assessed the sensory quality and descriptive profile of bread made with enzyme asparaginase (300 and 150 ppm enzyme/ kg of flour) and the control bread formulation.

The results showed that the sensory quality was rated as grade 1, without significant differences ($p \leq 0,05$) between the control bread and bread made with asparaginase for the color, appearance / shape, aroma, flavor and texture attributes. Similar result was obtained with the descriptive profile since there was not significant difference ($p \leq 0,05$) between samples for color crust, fermented aroma, roasted / burnt aroma, touch hardness, elasticity crumb, hardness mouth, taste fermentation / yeast and toasted flavor descriptors.

The manufacture of hallulla bread with the addition of the enzyme asparaginase proved to be a succesfull method to mitigate acrylamide in the final bread, obtaining almost a complete reduction of acrylamide while maintaining the original sensory characteristics of bread.

1. INTRODUCCIÓN

La industria de la panificación es una de las más antiguas del mundo, pues su historia transcurre paralelamente al consumo de cereales por parte del hombre, siendo el pan un producto directo del procesamiento de los cereales. El desarrollo de este alimento ha sido paulatino enfocado en mejorar la calidad y aprovechamiento de las materias primas (Hernández, 2005).

Además, el pan es considerado según la cultura como un ingrediente de rituales religiosos y/o un alimento básico, siendo en la actualidad un elemento que influye en índices económicos tales como el IPC (Índice de Precios al Consumo), empleado para determinar la evolución del costo de vida en las naciones (Indupan AG., 2015).

En la actualidad, Chile se ubica como el segundo consumidor de pan en el mundo tras Alemania (106 kilos per cápita/ año) y como el primero a nivel Latinoamericano. Según un estudio ODEPA (2014), el consumo de pan ha sido en promedio 85,6 kilos por persona al año entre 2003 y 2013. Además se reporta que esta cifra ha expresado sólo leves variaciones dentro este período, manteniendo su participación en la dieta de los chilenos. Es así como el consumo de pan sigue siendo importante para la dieta de los chilenos, principalmente en sectores de menores ingresos.

Por otra parte, según las cifras entregadas por Euromonitor Internacional (Fundación Chile, 2012) dentro del mercado de los alimentos procesados, Chile alcanza un volumen de ventas cercano a los US\$11 billones anuales. Las categorías de panadería y productos horneados, como galletas y pasteles, representaron el 36% de las ventas de alimentos procesados durante el año 2012, alcanzando aproximadamente US\$ 4 billones (Figura 1).

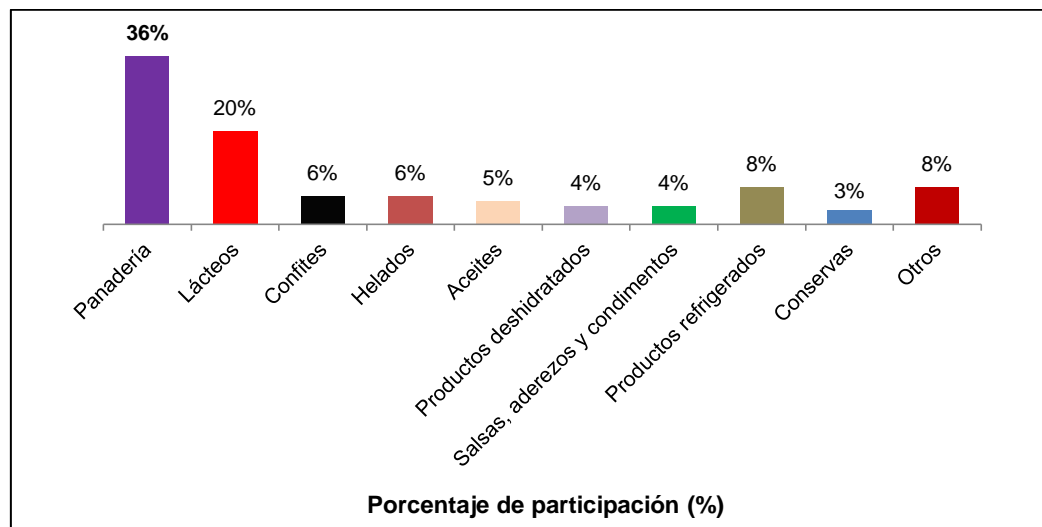


Figura 1: Mercado de alimentos procesados en Chile (Fundación Chile, 2012).

En cuanto a la importancia de la industria panificadora, según el “Estudio de competitividad para la industria de la panadería tradicional chilena” que llevó a cabo Fundación Chile (2010) con INDUPAN A.G., señala que las ventas de este rubro bordean los US\$ 1.000 millones, con un nivel de empleo de 25.000 trabajadores. El principal producto de la industria es indudablemente el pan, en todas sus variedades, que con 400 toneladas al año aporta el 54,8% de los ingresos por venta de productos elaborados en un establecimiento promedio. Le siguen las galletas con un volumen de 64 toneladas.

Del total comercializado de pan, la marraqueta y la hallulla concentran el 88% de los ingresos por venta (Fundación Chile, 2010). Los sondeos realizados por ODEPA (2014) incluyen pan especial (hallulla) y corriente (hallulla y marraqueta), siendo la marraqueta el más demandado (Figura 2).

Además, el estudio de Fechipan (2012) indica que Chile lidera el consumo per cápita en Latinoamérica. Este producto se vende mayoritariamente a granel y es elaborado por panaderías artesanales.

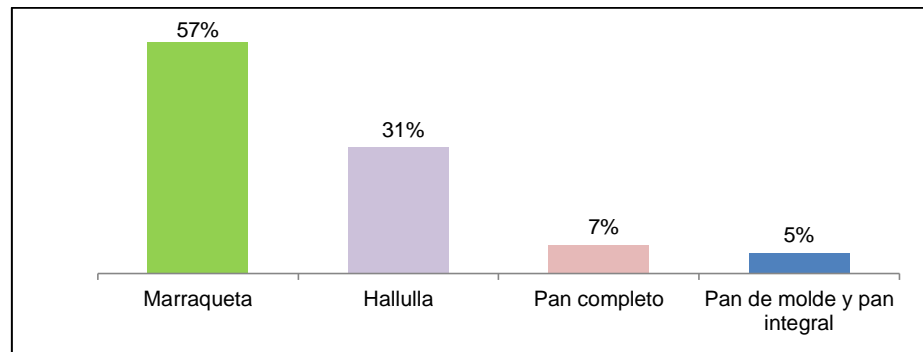


Figura 2: Distribución de las ventas de pan por producto en Chile (INDUPAN AG y Fundación Chile, 2010).

Un estudio realizado en Suecia en 2002, detectó la presencia de acrilamida en alimentos ricos en carbohidratos y que son sometidos a altas temperaturas ($T \geq 120 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para su elaboración (Tareke et al, 2002). La acrilamida es un compuesto probablemente cancerígeno y genotóxico para humanos (Grupo 2 A) según IARC (1994).

Según los hábitos de consumo de la población chilena, estar expuesto a la acrilamida dietaria podría representar un potencial riesgo para la salud. La acrilamida es generada en alimentos mayoritariamente durante la reacción de Maillard. Esta reacción se produce entre azúcares reductores y aminoácidos, siendo el aminoácido asparagina, el mayor precursor para alimentos en base a cereales (Amrein et al., 2004; Barutcu et al., 2009; Knol et al., 2009). Estudios realizados en otras matrices alimentarias, proponen que la reducción del nivel de precursores en las materias primas podría considerarse efectiva para mitigar la formación de acrilamida en el producto final (Keramat et al., 2011; Shojaee-Aliabadi et al., 2013). En base a lo anterior, la hipótesis de este estudio es que la asparaginasa es una enzima que hidroliza la asparagina libre en ácido aspártico, el cual no es precursor de acrilamida, su incorporación en la masa formulada de pan tipo hallulla, reduciría la cantidad de acrilamida formada en el horneado, conservando sus características sensoriales (Anese et al., 2011; Codex Alimentarius, 2009; Mustafa et al., 2011; Novozymes).

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Definición de Pan

Según la definición entregada por el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) en el Artículo 356: Pan sin otra denominación, se entiende el producto de la cocción de la masa resultante de una mezcla de harina de trigo, levadura de panificación, agua potable y sal comestible, con o sin adición de mejoradores de panificación y/o enriquecedores, tales como: leche, azúcares, materias grasas u otros autorizados por este reglamento. Si el pan se fabrica con otra harina, se denominará con el nombre de la harina que se emplee.

Además, “Hallulla” (Del ár. hisp. ḥallún, bollo de fiestas, y este del hebr. hallāh, torta de pan ácimo consumida en la Pascua) es definido según la Real Academia Española (REA) como pan que se cuece en rescoldo o en ladrillos de piedras muy calientes. Una segunda definición menciona que es un pan de forma circular de masa relativamente delgada.

2.2 Materias primas para elaboración pan tipo hallulla

2.2.1 Harina

Según la definición del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) en el Artículo 347: Harina sin otro calificativo, es el producto pulverulento obtenido por la molienda gradual y sistemática de granos de trigo de la especie *Triticum aestivum sp.vulgare*, previa separación de las impurezas, hasta un grado de extracción determinado. Dicho de otro modo, la harina es el producto obtenido de la molienda del endospermo del grano de trigo, que posee las características para la elaboración de pan, ya que contiene dos proteínas insolubles (gliadina y glutenina), que al unirse en presencia de agua forman el gluten (Hernández, 2005).

Tipos de Harinas:

Las harinas se clasifican teniendo en cuenta la variedad de trigo con las que fueron elaboradas:

a. Harina dura o fuerte para panificación: son harinas con alto contenido de proteínas (10-17%).

b. Harina suave o floja para galletería y bizcochería: estas harinas tienen un bajo contenido de proteínas (8-10%).

c. Semolina o harina para pastas: es una harina granulosa.

d. Harina integral: está compuesta por todas las partes del grano. Pueden ser duras o suaves.

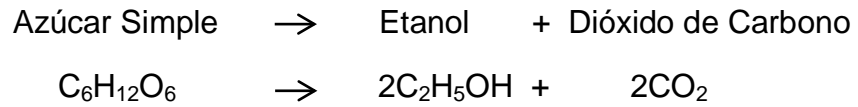
En el mercado se pueden encontrar harinas enriquecidas, mezclas de harinas y harinas acondicionadas (Hernández, 2005).

Desde el punto de vista panadero las harinas fuertes o duras dan panes de buen volumen y aceptan más agua, proporcionando un rendimiento mayor. Por otra parte, las harinas débiles o suaves son aquellas que dan panes de bajo volumen, aceptan menos agua y logrando un bajo rendimiento (Molinera San Cristóbal, 2004). Por lo tanto, la formación del gluten es un componente esencial en el proceso de panificación, siendo un factor importante que determina la calidad final del pan (Cauvain, 2001).

2.2.2 Levadura

Es el principal microorganismo responsable de la fermentación de la masa. La levadura que se emplea en panificación es *Saccharomyces cerevisiae* (Hernández, 2005). Su principal función, es transformar los azúcares de la harina y del azúcar adicional, para producir el gas dióxido de carbono y etanol, de esta forma la masa se expande en sus diversas etapas de procesamiento, gracias a esto se convierte la masa cruda en un producto ligero que al hornearse es 100% digerible, con el sabor característico al pan (Cauvain, 2001; Hernández, 2005; Molinera San Cristóbal, 2004).

A continuación se muestra en forma simplificada la acción de las levaduras:



La levadura necesita ciertos factores para actuar, estos son: azúcares para alimentarse, obteniéndolos de la harina y del azúcar adicional; humedad para activarse y asimilar los nutrientes necesarios para su desarrollo; materiales nitrogenados, obtenidos del nitrógeno de la proteína de la harina; minerales o sales minerales para una actividad vigorosa y temperatura para encontrarse en condiciones favorables para su desarrollo, para ello se recomienda utilizar temperaturas de 26–28°C (Hernández, 2005).

La levadura se encuentra disponible en varias formas, como levadura fresca también llamada levadura prensada o de panadero, levadura seca activa y levadura instantánea (Edwards, 2007). La más utilizada por los panaderos es la levadura prensada, pues presenta una alta eficacia y economía (Molinera San Cristóbal, 2004).

2.2.3 Sal

La función principal de la sal en la elaboración del pan, es la de contribuir en el sabor del producto final (Hernández, 2005).

Por otra parte, la sal ejerce un efecto inhibitor sobre la formación de gluten durante el mezclado, también tiene un efecto significativo sobre la presión osmótica de la célula de levadura y así se utiliza para controlar la velocidad de fermentación (Cauvain, 2001). Otras funciones que cumple la sal son: mejorar las propiedades plásticas de la masa, aumentando su tenacidad, resaltar los sabores de otros componentes, permitir una hidratación superior de la masa, restringir la actividad de las bacterias ácidas en la masa, y favorecer la coloración de la corteza, mejorando el aspecto del pan, produciendo una corteza más fina y agradable (Hernández, 2005).

2.2.4 Agua

El agua tiene como función principal formar la masa, pues facilita la unión de todos los componentes. Es importante determinar la cantidad de agua para que las proteínas se unan y formen el gluten (Hernández, 2005). El nivel óptimo de agua es la cantidad máxima que puede entrar en la masa y aun así ser capaz de moldear las piezas y dar un pan de calidad aceptable, dependiendo directamente de las propiedades de la harina (Cauvain, 2001).

Otras de las funciones del agua son: hidratar el almidón, permitir el desarrollo de la levadura, determinar la consistencia de la masa, permitir controlar la temperatura de la masa, evitar el resecamiento de la masa en el horno, posibilitar la propiedad de extensibilidad y plasticidad de la masa, permitiendo que crezca por la acción del CO₂ producido en la fermentación, y hacer posible la porosidad y el buen sabor del pan (Hernández, 2005).

2.2.5 Azúcar (sacarosa)

Este ingrediente sirve de alimento para la levadura, es responsable de la coloración de la corteza del pan, debido a su caramelización, además actúa como conservador, porque aumenta la presión osmótica, inhibiendo la proliferación de microorganismos, absorbe la humedad debido a la capacidad higroscópica de algunos azúcares (Hernández, 2005).

2.2.6 Leche

En el proceso de panificación se utiliza leche líquida entera o descremada, en polvo, o condensada (Hernández, 2005). La más utilizada en la panificación es la descremada en polvo (Molinera San Cristóbal, 2004).

La leche mejora la apariencia del pan, le proporciona color a la corteza, pues la lactosa se carameliza, le confiere una coloración característica a la miga, mejora la textura, aumenta la suavidad, eleva el valor nutritivo, proporciona proteínas, mejora el sabor, aumenta la absorción del agua, y mejora la conservación, ya que retiene la humedad (Hernández, 2005).

2.2.7 Materia grasa

Se emplean diversos tipos de materia grasa de acuerdo a la formulación, estas son: materia grasa animal o vegetal, mantecas vegetales hidrogenadas y aceite hidrogenado (Hernández, 2005).

En el proceso de panificación la materia grasa aumenta el valor nutritivo del producto, ayuda a fijar los líquidos, facilita el trabajo de las mezcladoras, se obtienen productos más suaves y manejables, evita el resecamiento de las masas, y lubrica el gluten manteniéndolo elástico. Además mejora la conservación, pues la grasa disminuye la pérdida de humedad, manteniendo el pan fresco (Hernández, 2005).

2.3 Proceso de Panificación

El proceso de panificación consta de operaciones secuenciales y sencillas, es un proceso que involucra cambios químicos y físicos importantes. A continuación se detalla las principales operaciones:

2.3.1 Recepción de materias primas

Proceso donde se obtienen todas las materias primas y son analizadas para verificar su calidad (Riofrío, 2004).

2.3.2 Pesaje y dosificación

Aquí se realiza el pesaje de las materias primas de acuerdo a la formulación con la que se va elaborar el pan (Riofrío, 2004).

2.3.3 Mezclado o amasado

Consiste en la distribución uniforme de los componentes y la formación y desarrollo del gluten, tiene como finalidad formar una masa elástica, consistente y homogénea (Hernández, 2005).

Etapas del amasado:

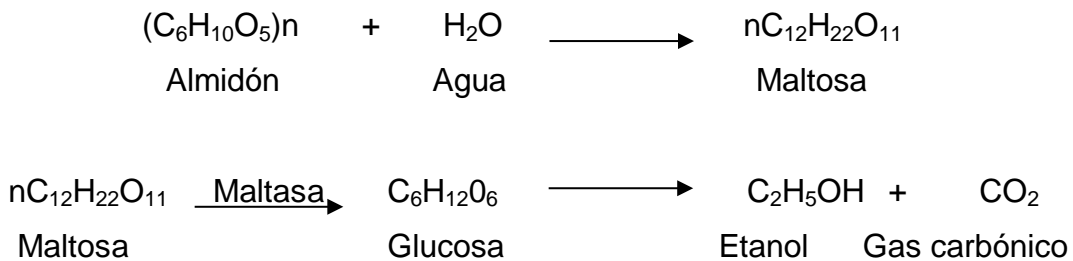
- a. Incorporación:** durante este período los ingredientes se combinan en una masa húmeda y pegajosa.
- b. Desarrollo preliminar:** la masa adquiere una consistencia pastosa.
- c. Comienzo de la elasticidad:** comienza el desarrollo del gluten.
- d. Desarrollo final del gluten:** la masa se torna tersa, seca y elástica.

Si se amasa en exceso, la masa se vuelve húmeda, muy pegajosa, brillante, con ninguna o muy poca elasticidad. Esto se debe a que el gluten se destruye y por ello el producto resultante será de mala calidad (Riofrío, 2004).

2.3.4 Fermentación

El proceso de fermentación se produce espontáneamente, y se activa por medio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las diastasas de la harina por acción de la levadura transforman el almidón en dextrina y luego ésta se transforma en maltosa (Hernández, 2005).

A continuación se muestra la transformación del almidón a glucosa:



Se presentan otros tipos de fermentaciones como la acética, láctica y butírica que le proporcionan sabor y aroma al pan. El gas al dilatarse por la acción del calor produce los llamados ojos del pan, la coagulación del gluten y la hinchazón del almidón (Hernández, 2005).

La fermentación comprende todo el tiempo transcurrido desde la mezcla hasta que el pan entre al horno. Es por eso que se ha dividido en tres etapas (Hernández, 2005; Riofrío, 2004):

a. Fermentación de la masa: es la primera fermentación que ocurre entre el final del amasado y el comienzo del laminado.

b. Fermentación intermedia: esta ocurre entre el laminado y corte. Es llamada fermentación de prueba intermedia.

c. Fermentación final: Se le conoce también como leudación.

2.3.5 Laminado

Luego del amasado, la masa es extendida con la ayuda de un rodillo o de una laminadora, para extraer completamente el gas (Hernández, 2005).

2.3.6 División o corte

En esta etapa la masa es cortada en trozos o en las porciones de panes que se vayan a elaborar. El objetivo de esta operación es asegurar un tamaño uniforme y el mismo rendimiento de cada porción de la masa (Hernández, 2005; Riofrío, 2004).

2.3.7 Leudación o fermentación final

Esta fermentación ocurre posterior a la división o corte, se realiza a una temperatura de 30-35°C, con una humedad relativa entre 80-85%, para evitar el resecamiento de la corteza. Este es un periodo de fermentación acelerada para airear y dar a la masa un buen volumen haciendo que la miga del pan se forme bien y sea pareja (Hernández, 2005).

2.3.8 Horneó

Esta es la etapa final del proceso de panificación, su objetivo es la cocción de las masas transformándolas en un producto alimenticio apetitoso y digerible (Edwards, 2007; Hernández, 2005).

Durante la cocción ocurren cambios químicos y físicos importantes detallados a continuación: Aumenta la actividad de la levadura y produce grandes cantidades de CO₂. A los 45°C, se inactiva la levadura, terminándose todo aumento de volumen a los 50°C, pues se produce su muerte. Por otra parte, la enzima diastasa transforma el almidón en maltosa, terminando la acción de la diastasa a los 77°C. Entre los 60-80°C, se presenta la coagulación de las proteínas del gluten y además se gelatiniza el almidón con pérdida de plasticidad, adquiriéndose la estructura definitiva del pan. Finalmente, la caramelización de la capa externa del pan, se inicia desde los 110-120°C. La máxima temperatura interna que alcanza el pan es de 100°C, y la externa es de 190-270°C, a esta temperatura el pan está cocido (Edwards, 2007; Hernández, 2005).

2.3.9 Enfriamiento

Terminada la cocción, el pan es enfriado antes de ser almacenado. Este enfriamiento se realiza sobre las mesas de trabajo o en bandas transportadoras de cinta o en mesas giratorias ventiladas con aire frío (Hernández, 2005).

2.4 Acrilamida

La acrilamida (2-propenamida; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) (Figura 3), es un sólido cristalino incoloro e inodoro con un peso molecular de 71,08 kDa. Tiene un punto de fusión de $84,5 \pm 0,3$ ° C, un alto punto de ebullición 136 ° C a 3,3 kPa / 25 mmHg (Eriksson, 2005). Es ampliamente utilizado en la industria química como en la síntesis de poliacrilamidas, en el tratamiento del agua potable y aguas residuales, en el procesado de la pulpa de papel, además existe un gran número de otras posibles aplicaciones (Valenzuela & Ronco, 2007). También, diversas investigaciones han demostrado que la acrilamida, puede ser producida en altos niveles en alimentos ricos en carbohidratos, sometidos a altas temperaturas (Claus et al., 2008; Valenzuela & Ronco, 2007).

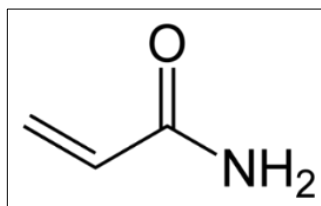


Figura 3: Estructura química de la molécula de acrilamida (Adaptado de Knol et al., 2010).

En 1994 se clasificó a la acrilamida como “potencialmente carcinogénico para humanos” por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (Grupo 2A, IARC 1994) y en 2001, el Comité Europeo de Toxicidad, Ecotoxicidad y Medioambiente, demostró sus inherentes propiedades tóxicas: neurotoxicidad, genotoxicidad, carcinogénesis y toxicidad reproductiva en animales. Resultados de un estudio realizado en varios modelos de roedores demuestran que la acrilamida produce tumorigénesis en múltiples órganos regulados hormonalmente, como son la glándula mamaria, tiroides y el mesotelio peritesticular (Camacho et al., 2012; Claus et al., 2008).

2.4.1 Acrilamida en alimentos

En abril del año 2002, un grupo de investigadores suecos, demostraron la presencia de niveles considerables de acrilamida en ciertos alimentos ricos en carbohidratos y procesados a altas temperaturas ($T \geq 120 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (Tareke et al., 2002; Valenzuela & Ronco, 2007). La acrilamida se encuentra en una amplia variedad de productos alimenticios, la mayor contribución es procedente de productos a base de cereales, papas y productos de café. Entre los productos de cereales, la principal contribución es de pasteles y galletas, productos de cereales transformados y panes. En la Figura 4, se detallan los niveles de acrilamida promedio en distintos alimentos obtenidos por grupos de investigadores noruegos, suecos, suizos, ingleses y norteamericanos (Valenzuela & Ronco, 2007).

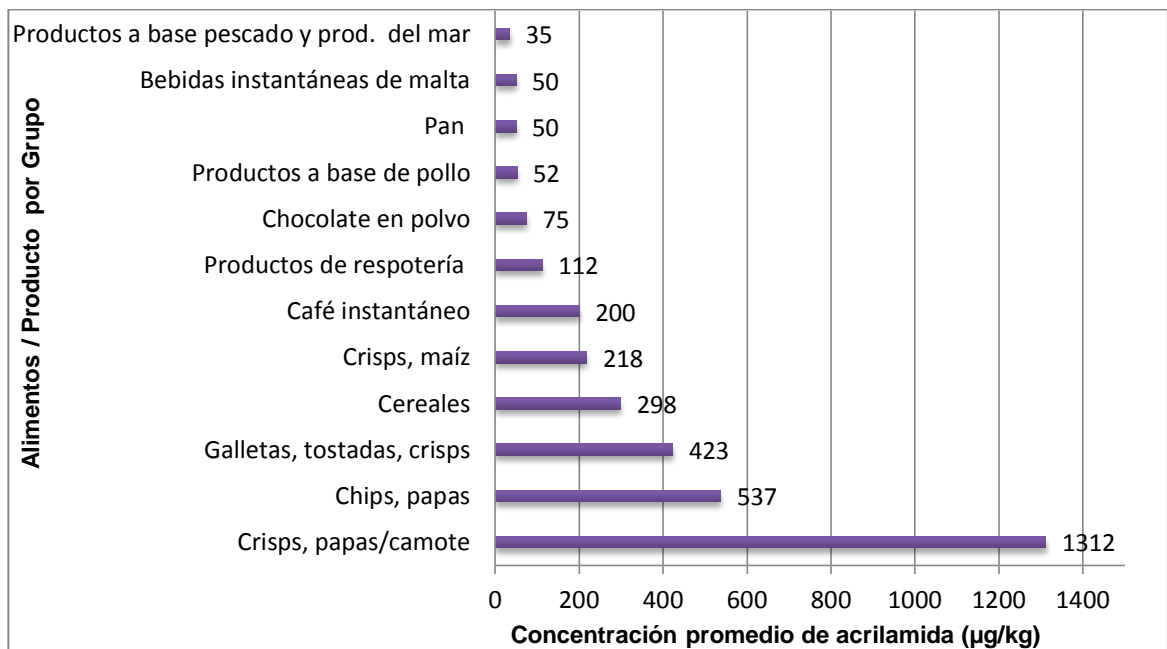


Figura 4: Promedio de acrilamida en distintos alimentos (Adaptado de Valenzuela & Ronco, 2007).

Además, la contribución de cada producto varía según los países en función de las tradiciones de elaboración, como los hábitos alimenticios, entre otros factores (Mustafa, 2008). La exposición del consumidor a la acrilamida

puede resultar: (i) en forma directa, por ingestión de alimentos altos en carbohidratos, sometidos a altas temperaturas, como: papas fritas, cereales tostados, y pan; y (ii) en forma indirecta, que podría resultar por trazas residuales del monómero en empaques de alimentos donde se utiliza poliacrilamida como agente de unión (Keramat et al., 2011; Valenzuela & Ronco, 2007).

Los productos de panadería tienen niveles relativamente bajos de acrilamida, sin embargo, debido al alto consumo de pan en Chile, la contribución de acrilamida por ingesta de este alimento es de gran importancia. Los niveles más altos se han detectado en la corteza del pan, mientras que la miga casi no contiene acrilamida. Al hornear pan a diferentes condiciones, se ha encontrado una relación significativa entre el color de la corteza del pan y la cantidad de acrilamida (Konings et al., 2007; Surdyk et al., 2004).

2.4.2 Formación de acrilamida en los alimentos

La formación de acrilamida ha sido estudiada por un gran número de investigadores, donde en un comienzo se propuso la reacción de Maillard como ruta de formación principal de acrilamida en alimentos, siendo los principales precursores de esta reacción el aminoácido asparagina (Figura 5) y azúcares reductores. Luego de varias investigaciones sugirieron diferentes vías dentro de la reacción de Maillard o vías alternativas (Mustafa, 2008).

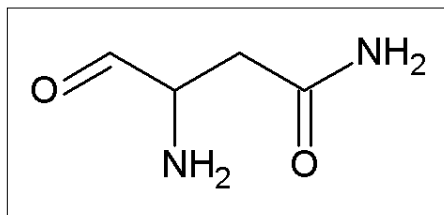


Figura 5: Estructura química de la molécula de asparagina (Adaptado de Knol et al., 2010).

En el caso de los alimentos a base de cereales la formación de acrilamida está determinada por el contenido de asparagina en la harina (Capuano et al., 2009). El contenido de asparagina es mayor en la harina de grano entero que en las fracciones tamizadas, y también depende del tipo de cultivo del cereal. Según el tipo de cereal, la concentración de asparagina varía muy poco, siendo mayor en harina de centeno que en harina de trigo (Pedreschi et al., 2014). Algunas de las vías sugeridas a través de la reacción de Maillard se resumen en la Figura 6.

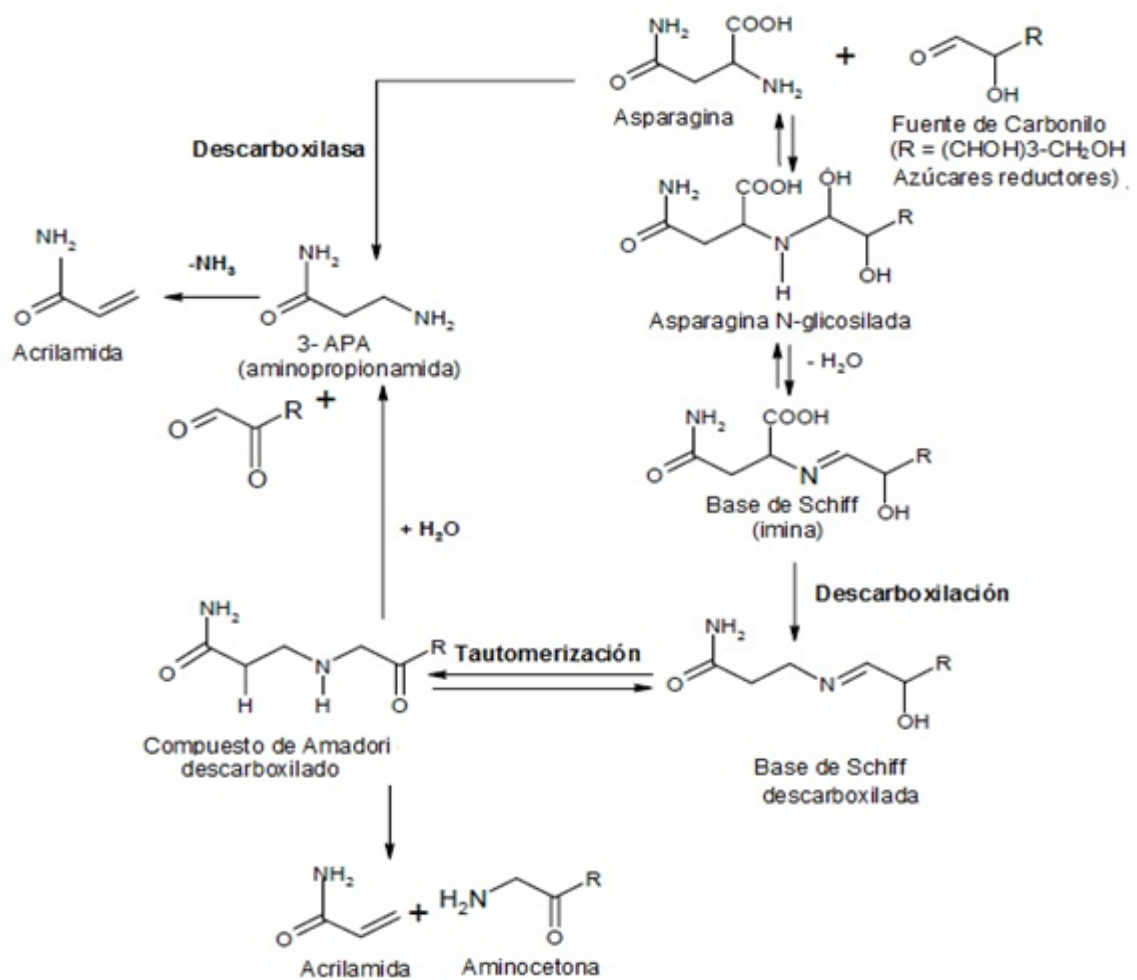


Figura 6: Algunas vías sugeridas para la formación de acrilamida a partir del aminoácido asparagina (Adaptado de Mustafa, 2008).

La primera etapa es la reacción entre la asparagina libre y una fuente de carbonilo (reacción amino-carbonilo), resultando es la asparagina N-glicosilada, la cual sufre deshidratación por altas temperaturas, para dar origen a la base de Schiff (imina) estable. La base de Schiff sufre aún más la descarboxilación que resulta en una base de Schiff descarboxilada, que después de la tautomerización forma el compuesto de Amadori (descarboxilado). Posteriormente el compuesto de Amadori reacciona a través de la ruptura del enlace covalente carbono-nitrógeno y se forma la acrilamida intermedia, junto con una aminocetona. La base de Schiff descarboxilada puede descarboxilar, formando 3-aminopropionamida (3-APA), que a su vez forma acrilamida con la eliminación de amoníaco. Se ha sugerido que temperaturas más altas (100-180°C) ocurre la descarboxilación de la asparagina libre, formando 3-aminopropionamida el cual forma acrilamida, por lo tanto, no siempre se necesita la presencia de azúcares reductores para la producción de acrilamida en alimentos sometidos a altas temperaturas durante el proceso de elaboración (Mustafa, 2008).

Los factores que afectan la formación y degradación de acrilamida en los alimentos son: (i) los precursores de acrilamida, tales como: aminoácidos libres (principalmente asparagina) y azúcares reductores y (ii) las condiciones del proceso, como son por ejemplo: tiempo de horneado y temperatura, el contenido de humedad y la matriz del producto (Keramat et al., 2011; Mustafa, 2008).

2.4.3 Técnicas de mitigación de acrilamida en alimentos

Entre los métodos para la mitigación de acrilamida en la dieta se encuentran:

- 1.- Selección de materias primas (papas, cereales u otras variedades de plantas de uso alimentario) que contengan bajos niveles de precursores de acrilamida, tales como asparagina y azúcares reductores (Claus et al., 2008; Shojaee-Aliabadi et al., 2013).

2.- Reducción de precursores de acrilamida, antes de su procesamiento (materiales crudos), mediante el uso de:

a) Enzimas, como la asparaginasa para hidrolizar la asparagina a ácido aspártico, en productos como galletas, pan y papas fritas con y sin combinación con escaldado (Anese et al., 2011; Hendriksen et al., 2009; Mustafa, 2008; Pedreschi et al., 2008; Pedreschi et al., 2011).

b) Adición de ingredientes que han sido reportadas como preventivos para la formación de acrilamida como alicina, NaHSO_3 , ácido ascórbico o NaCl (Pedreschi et al., 2010; Yuan et al., 2011), o el uso de antioxidantes de hojas de bambú en papas fritas (Zhang et al., 2006).

c) Cambios en las formulaciones, por ejemplo: el tipo de grasa utilizada o la cantidad de agua en galletas (Anese et al., 2011), o reemplazar el bicarbonato de amonio por bicarbonato de sodio, ya que el primero promueve la formación de acrilamida en productos horneados dulces (Friedman & Levin, 2008).

d) Uso de azúcares no reductores, como por ejemplo reemplazar glucosa por sacarosa o trehalosa (Amrein et al., 2004).

e) Uso de cationes monovalentes, divalentes y trivalentes (Corrigan, 2005), por ejemplo mediante el uso de cationes divalentes durante la reacción de Maillard en papas fritas (Gökmen & Şenyuva, 2007).

3.- Selección de las condiciones del proceso (pH, temperatura, tiempo, condiciones del proceso y almacenamiento) que minimicen la formación de acrilamida. Shojaee- aliabadi et al.,(2013) midió la cantidad de acrilamida en relación al tiempo y temperatura de escaldado y la temperatura de fritura en chips de papas fritas (Gökmen & Şenyuva, 2007) y estudió la relación entre tiempo de horneado con la cantidad de acrilamida, en sistema modelo de galletas.

2.4.4 Asparaginasa

La asparaginasa también llamada L-Asparagina amidohidrolasa (EC 3.5.1.1; CAS No. 9015-68-3), es una enzima de origen natural producida por distintos microorganismos, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Escherichia coli*, y algunos tipos de plantas. Puede ser utilizada para diferentes propósitos industriales o farmacéuticos, y últimamente se ha incrementado su uso como aditivo en la fabricación de alimentos (FAO & JECFA, 2007).

Por otra parte, la asparaginasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de asparagina en ácido aspártico y amonio, siendo ésta una forma muy efectiva de reducir la cantidad de acrilamida mediante la reducción de uno de sus precursores (asparagina) en la Reacción de Maillard. La asparaginasa ha sido probada en una amplia variedad de productos alimenticios, como: galletas, pan y productos fritos a base de papa. La aplicación de esta enzima ha tenido resultados de 34 a 92% de reducción del contenido de acrilamida en el producto final (Anese et al., 2011; Hendriksen et al., 2009; Novozymes, 2014; Pedreschi et al., 2008).

La actividad de la asparaginasa es afectada por su dosis, el tiempo de reacción, temperatura y pH en el cual la reacción ocurre. El control del pH es crucial. Su mejor rendimiento se logra a pH ligeramente ácido (pH 5) y/o ligeramente básico (pH 9). También influye la cantidad de agua presente en la matriz del producto, a mayor concentración de agua, mayor es la producción de acrilamida, debido a una mayor movilidad de los precursores, contrariamente, por este mismo motivo, sería mayor la acción de la enzima para eliminar el contaminante. Otro factor que afectaría la actividad de la enzima es la cantidad de grasa utilizada en la formulación, a mayor concentración de grasa, menor la cantidad final de acrilamida, esto podría deberse a que la grasa obstaculizaría el contacto entre los precursores y por lo tanto la acción de la enzima sería mayor (Hendriksen, et al 2009, Anese et al, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Elaborar pan tipo hallulla con adición de asparaginasa para obtener niveles reducidos de acrilamida, conservando sus características sensoriales originales.

3.1.1 Objetivos Específicos

- i. Elaborar pan tipo hallulla y establecer el método para la cuantificación del contenido de acrilamida en este pan.
- ii. Determinar la cantidad necesaria de asparaginasa a agregar a la formulación de pan tipo hallulla, para disminuir sus niveles de acrilamida.
- iii. Seleccionar, entrenar y validar un panel sensorial para la evaluación de pan tipo hallulla a través de un test de calidad y un perfil descriptivo.
- iv. Determinar la calidad sensorial y el perfil descriptivo del pan con asparaginasa y compararlo con el pan de la formulación control a través del panel entrenado.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de asparaginasa en la formulación de pan tipo hallulla reduce la cantidad final de acrilamida que se forma durante el horneado, conservando las características sensoriales del producto final.

5. MATERIALES Y EQUIPOS

5.1 Materiales elaboración pan tipo hallulla

- Harina sin polvos de hornear, marca Selecta.
- Manteca panadera emulsionada combinada, marca Crucina.
- Sal fina, marca Lobos.
- Levadura seca instantánea, marca Lefersa.
- Leche en polvo semidescremada instantánea, marca Calo.
- Azúcar blanca granulada, marca Iansa.
- Enzima Asparaginasa 3500 U/g, marca Acrylaway (productor Novozymes).

5.2 Equipos elaboración pan tipo hallulla

- Batidora eléctrica marca KitchenAid, modelo 5K45SS.
- Balanza granataria marca AND, modelo NX4100.
- Balanza analítica marca A&D Company, modelo GR-200.
- Laminadora eléctrica marca Malta, modelo 1001.
- Fermentador marca Cooking Technology, modelo 83 LI.
- Horno eléctrico por convección marca Garbin, modelo 43 DX UMI.
- Estufa de aire forzado marca Binder, modelo FD-115.
- Refrigerador marca VELP Scientifica, modelo FTC 90E.

5.3 Reactivos e insumos principales para la cuantificación de acrilamida

- Metanol grado analítico, marca Merck.
- Hexano grado analítico, marca Merck.
- Acrilamida 99,9% calidad especial para electroforesis para biología molecular, marca Merck.
- Acrilamida d-3, marca Sigma Aldrich.
- Cartridge LiCholut RP- 18 (40-63 μm) 500 mg 3 ml Standard Merck.

5.4 Insumos secundarios para la cuantificación de acrilamida

- Tubos de centrifuga Falcon 50 ml.
- Jeringa de 50 μ L, marca Hamilton.
- Jeringa de 1000 μ L, marca Hamilton.
- Jeringas descartables de 3 ml y Filtros de Jeringa 0,2 μ m, marca Merck.
- Viales 2 ml.
- Material de Vidrio de laboratorio.

5.5 Equipos para cuantificación de acrilamida

- Procesadora de alimentos marca Philips, modelo HR1617 650W.
- Balanza Analítica marca A&D Company, modelo GR-200.
- Ultrasonido marca VWR, modelo 970493-966.
- Centrifuga marca Hettich, modelo MIKRO 220R.
- Rotavapor marca Heidolph, modelo Hei-VAP advantage.
- Bomba marca Vacuubrand, modelo MZ 2C NT + AK + EK.
- CTC PAL ALS marca Agilent, modelo GC sampler 80.
- Cromatógrafo de Gases -Espectrómetro de Masas (GC-MS), marca Agilent, modelo 7890A GC System con Agilent 597C XL EI/CI MSD.
- Columna GC marca Agilent, modelo DB-FFAP 122-3232, 30 m, 0,25 mm ID, 25 μ m.

5.6 Materiales evaluación sensorial

- Fichas de respuestas, test de calidad, escala Karlsruhe y perfil descriptivo.
- Folio de fotografías, "Coloración de panes en distintos tiempos de horneado".
- Lápices grafito/ Goma de borrar.
- Platos blancos de cerámica.
- Vasos de vidrio transparentes.
- Agua purificada sin gas, marca Benedictino.
- Servilletas blancas, marca Elite 33 x 33 cm.

6. METODOLOGÍA

6.1 Elaboración pan tipo hallulla

La formulación para la elaboración de pan tipo hallulla se muestra en la Tabla 1.

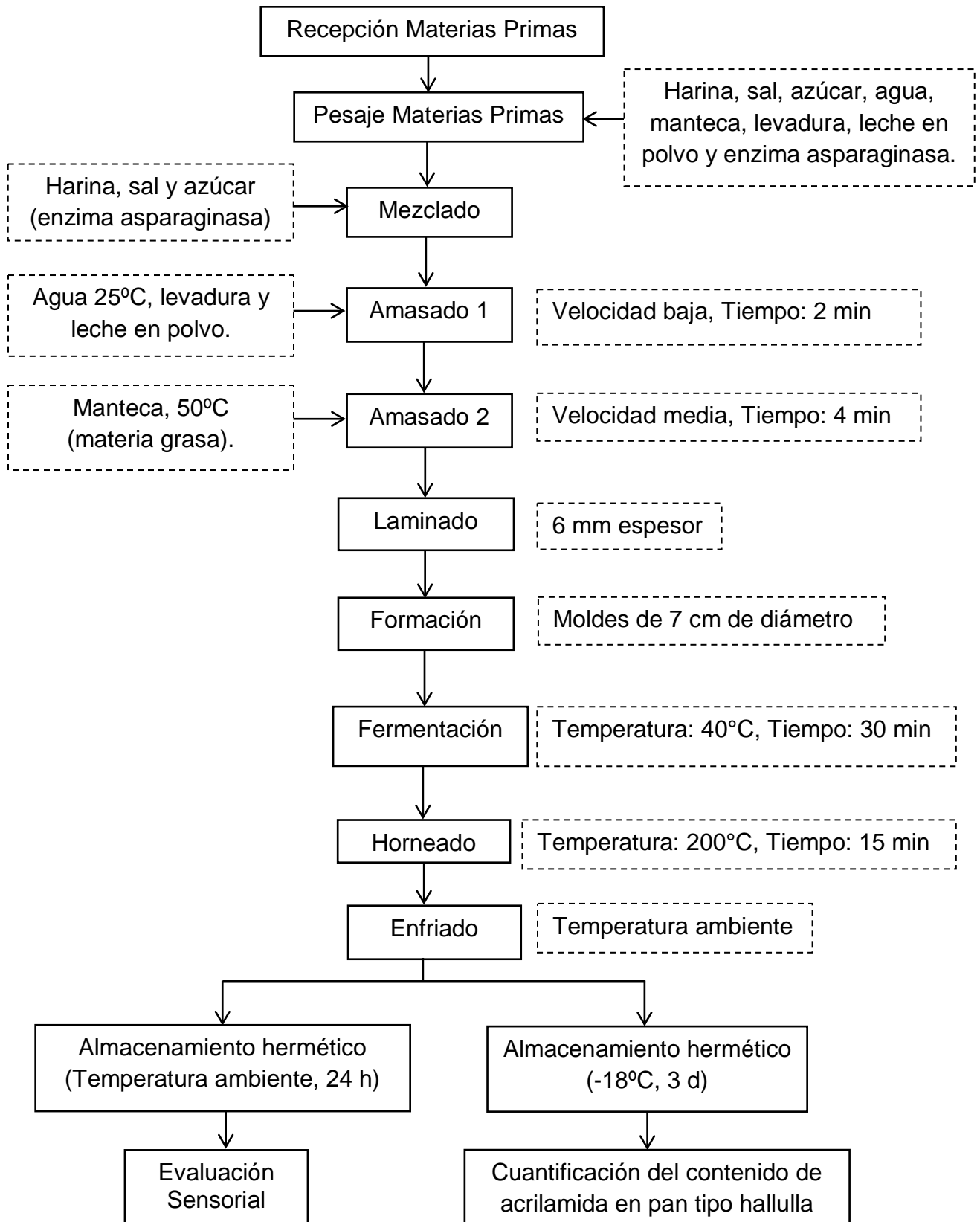
Tabla 1: Formulación pan tipo hallulla.

Ingredientes	Cantidad (g)
Harina	500
Agua tibia	250
Manteca	25
Sal	10
Levadura instantánea	10
Leche en polvo semidescremada	3
Azúcar	2,5

Fuente: Adaptado de Maquipan Chile (2014).

Con el fin de estandarizar el tamaño y forma de la hallulla, se utilizó un molde de acero inoxidable, con un diámetro de 7 cm y una laminadora eléctrica ajustada a un espesor de 6 mm.

6.2 Diagrama de bloques del proceso de elaboración de pan tipo hallulla.



6.3 Descripción del proceso de elaboración de pan tipo hallulla

- Recepción materias primas: Se recibieron las materias primas y se almacenaron en un lugar fresco y limpio. La manteca se mantuvo en refrigeración a 4°C.
- Pesaje materias primas: Se pesaron los ingredientes en una balanza granataria, y la asparaginasa en una balanza analítica.
- Mezclado: Se agregaron en la amasadora harina, azúcar, sal y enzima (esta última cuando fue necesario).
- Amasado1: Se introdujo a la amasadora el agua (a 25°C), previamente mezclada con la levadura y leche en polvo, a una velocidad baja por 2 min.
- Amasado 2: Se agregó a la amasadora la manteca (materia grasa) previamente derretida en una estufa a 50°C. Se trabajó a una velocidad media por 4 min.
- Laminado: Una vez formada la masa, se pasó 5 veces por la laminadora, a un espesor de 6 mm.
- Formado: Una vez laminado se procedió a cortar las unidades, utilizando un molde (de acero inoxidable), de 7 cm de diámetro. En esta etapa también se pinchó la superficie de las hallullas, con un tenedor.
- Fermentación: Se llevó a cabo en un fermentador por 30 min, a 40°C.
- Horneado: Se utilizó un horno eléctrico a 200°C, por 15 min, en 2 bandejas con 12 panes (por bandeja).
- Enfriado: Finalizado el horneado, los panes fueron enfriados a temperatura ambiente sobre las bandejas de horneado.
- Almacenamiento: Una vez enfriadas las muestras fueron colocadas en bolsas herméticas a -18°C por 3 d para la cuantificación de acrilamida y temperatura ambiente por 24 h para la evaluación sensorial.
- Cuantificación de acrilamida: Se realizó la cuantificación del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla descrita en metodología 6.4.
- Evaluación sensorial: Una vez elaborados los panes se procedió a realizar la evaluación sensorial, descrita en metodología 6.6.

6.4 Método para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla.

El método para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla consta de dos etapas: (i) extracción de la acrilamida del pan tipo hallulla y (ii) cuantificación de la acrilamida por GC/MS. La técnica que se utilizó fue la propuesta por Ciesarová et al. (2006), la cual estuvo sujeta a modificaciones.

6.4.1 Preparación de las soluciones

a. Preparación de la solución estándar interno acrilamida d-3 20 ppm

En un matraz aforado de 10 ml se adicionó 400 μ L de estándar interno de acrilamida d-3 y se aforó con metanol. Una vez utilizado el estándar interno se mantuvo refrigerado a 4°C (la solución no tiene caducidad si se mantiene refrigerado).

b. Preparación de la solución estándar de acrilamida 0,01 mg/ml

En un matraz aforado de 10 ml se pesaron 10 mg de acrilamida y se aforó con metanol. De esta solución se extrajo 100 μ L y se llevó a un matraz de 10 ml, aforado con metanol. Una vez utilizada la solución se mantuvo refrigerada a 4°C (la solución no tiene caducidad si se mantiene refrigerada).

c. Preparación de las muestras

Se homogenizaron las muestras de pan utilizando una trituradora (la corteza y miga del pan fueron separadas con un cuchillo y cuchara, posteriormente cada una de ellas fue homogenizada en una trituradora). Luego se pesaron 2 g de muestra en un tubo de centrifuga, se le adicionaron 40 μ L de la solución estándar interno y 10 ml de metanol. Luego las muestras fueron agitadas por 30 s en vortex y fueron sonicadas por 20 min en el ultrasonido a 60°C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas por 10 min a -4°C y 6000 rpm. Se extrajo 5 ml del sobrenadante y fue pasado por un cartridge de fase reversa C18 con la ayuda de un manifold con vacío (-10 kPa) y fue recuperado en tubos de centrifuga, donde se adicionó 10 ml de hexano (1:1 hexano:metanol), nuevamente las muestras fueron agitadas por 30 s en

vortex y fueron sonicadas por 5 min a 30°C. Posteriormente fueron centrifugadas por 10 min a -10°C y 6000 rpm, luego se extrajo la fase rica en metanol en el fondo del tubo de centrifuga con una pipeta de 10 ml y fue traspasado a un balón esmerilado de 100 ml. El solvente de las muestras fue evaporado a 40°C con vacío (200 mbar), hasta la sequedad.

En seguida se adicionó 1 ml de metanol y se extrajo la mayor cantidad del reconstituido. Finalmente el reconstituido fue filtrado a través de una jeringa de 3 ml, con un filtro de 0,2 µm donde se vertió en viales de 2 ml.

d. Preparación de la curva de calibración.

De la solución estándar de acrilamida se extrajo 25, 150, 300, 450, 600, 750, 875, 1000 µL respectivamente en 8 matraces de 10 ml. Se adicionó a cada uno de los matraces con solución estándar de acrilamida, 200 µL de estándar interno y se aforaron con metanol. Se mantuvo los matraces refrigerados a 4°C.

6.4.2 Condiciones del equipo Cromatógrafo de Gases -Espectrómetro de Masas (GC-MS)

Las muestras fueron analizadas en el equipo Agilent 7890A GC System con Agilent 597C XL EI/CI MSD y con una columna Agilent DB-FFAP 122-3232 de 30 m x 0,25 mm ID, 25 micras. Las condiciones de operación del equipo fueron:

Autosampler (CTC CombiPal)

Velocidad de llenado 5 µL/sec. Tipo de llenado: 3, Inyección: GCInj2. Velocidad de inyección: 50 µL/sec. Volumen de Inyección 2 µL, Tiempo de espera Pre-Inyección: 500 ms, Tiempo de espera post-inyección: 500 ms.

Condiciones Cromatografías

Inicio: 60°C durante 1 min, 10°C/min a 190°C durante 0 min, luego 50°C/min a 240°C durante 0 min, Tiempo de tiraje: 15 min. Flujo de la columna GC: 43,8 mL/min helio (flujo constante). Temperatura entrada GC: 200°C.

Ahorro de gas: Desconectado. Bajo estas condiciones el tiempo de retención de acrilamida y acrilamida-d3 aprox. 13 min.

Parámetros Espectrómetro de Masas (MS)

Temperatura fuente del MS: 245°C, Temperatura cuádruplo del MS: 150°C y línea de transferencia del MS: 270°C, m/z 70, 73, tiempo de espera 50 ms.

6.4.3 Expresión de resultados para la cuantificación de acrilamida

Para determinar la cantidad de acrilamida en muestras de pan tipo hallulla se calculó la curva de calibración realizada entre el área de acrilamida (m/z 70) y acrilamida d-3 (m/z 73) y la relación que existe entre ellas (m/z 70 / m/z 73). Las distintas concentraciones de la curva de calibración 25, 150, 300, 450, 600, 750, 875 y 1000 ppb de acrilamida dispuestas en el eje X y las relaciones de área para cada concentración en el eje Y entregan una ecuación de la recta, en la cual fue posible extrapolar la relación de área de la muestra analizada y obtener su concentración (µg/L) de acrilamida despejándose de la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Relación para determinar la concentración de acrilamida en pan tipo hallulla.

$$\text{Conc. Acrilamida} = \frac{\text{Relación Área } \frac{70}{73} \text{ muestra} - (\text{Intercepto})}{\text{Pendiente}}$$

Tras obtener el valor de acrilamida en µg/L este fue convertido en µg/kg de muestra, considerando todos los volúmenes de la etapa de extracción.

6.4.4 Desempeño analítico de la técnica para la cuantificación de acrilamida

El desempeño analítico de la técnica fue evaluado mediante la determinación de los siguientes parámetros:

Validación experimental

- Linealidad: determinada de la curva de calibración
- Límite de detección (LOD): determinada gráficamente, considerando que $LOD=3 \times \text{Señal del ruido}$
- Límite de cuantificación (LOQ): determinada gráficamente, considerando que $LOQ= 10 \times \text{Señal del ruido}$
- Exactitud o Porcentaje de recuperación

6.5 Condiciones experimentales para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin y con la adición de enzima

Las condiciones experimentales para la medición de acrilamida en pan tipo hallulla fueron establecidas previo análisis de referencias bibliográficas, para matrices alimentarias similares al pan. A continuación se muestra en la Tabla 2 las condiciones experimentales para cuantificación de acrilamida con sus respectivas referencias bibliográficas.

Tabla 2: Condiciones experimentales para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin y con la adición de enzima asparaginasa.

Condiciones experimentales	Referencias Bibliográficas
Pan control	Forstova et al., 2014; Mustafa, 2008
Pan control sin fermentar horneado	Mustafa, 2008; Surdyk et al., 2004
Corteza pan y miga pan	Brathen & Knutsen, 2005; Surdyk et al., 2004
Pan con 150-300 ppm enzima asparaginasa/ kg de harina	Capuano et al., 2009; Novozymes, 2014

6.6 Metodología de evaluación sensorial

Las evaluaciones sensoriales fueron realizadas en el laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Los tests utilizados para la evaluación sensorial fueron: test de valoración de calidad con escala Karlsruhe específica para pan tipo hallulla y perfil descriptivo.

6.6.1 Elección de jueces

Los jueces escogidos fueron estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos, pertenecientes a la Universidad de Chile, que habían aprobado la asignatura de Evaluación Sensorial impartida por la misma Universidad, y que tuvieron disponibilidad e interés en participar. Se consideró que por sus conocimientos previos ya habían completado la etapa de selección, y no se realizaron tests sensoriales adicionales.

6.6.2 Entrenamiento

En la primera sesión de entrenamiento, se realizó una inducción a los jueces enseñándole las características típicas y los defectos del pan tipo hallulla, luego en una mesa redonda se llevó a cabo una evaluación descriptiva, donde se presentaron panes distintos (tipo hallulla), los cuales se describen en la Tabla 3. Posteriormente, se les solicitó a los jueces contestar una ficha de descripción de productos (Ficha en Anexo 1), donde evaluaron y describieron individualmente cada atributo. Finalmente, se realizó una discusión abierta respecto a los atributos evaluados y las diferencias entre las cuatro muestras analizadas. Los atributos para pan utilizados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3: Muestras y tests aplicados en las sesiones de entrenamiento del panel para pan tipo hallulla.

Sesión	Muestras evaluadas	Tests aplicados
1	1. Hallullas especiales añejada (24 hrs.), supermercado Líder Independencia. 2. Hallullas laboratorio, fórmula Tabla 1 3. Hallullas especial, Supermercado Líder Independencia. 4. Hallullas panadería de Barrio (Comuna de Independencia).	Perfil descriptivo de productos
2	1. Hallullas con 2% de sal y 5% de manteca. 2. Hallullas con 1% de sal y 5% de manteca.	Test valoración calidad Perfil descriptivo
3	1. Hallullas con 20 min de horneado. 2. Hallullas con 15 min de horneado. 3. Hallullas con 10 min de horneado.	Test valoración calidad Perfil descriptivo
4	1. Hallullas sin enzima asparaginasa. 2. Hallullas con 300 ppm de enzima/ kg harina	Test valoración calidad Perfil descriptivo
5	1. Hallullas sin enzima asparaginasa. 2. Hallullas con 300 ppm de enzima/ kg harina	Test valoración calidad Perfil descriptivo
6	1. Hallullas, 30 min de fermentación, 220°C de horneado. 2. Hallullas, 15 min de fermentación, 180°C de horneado.	Test valoración calidad Perfil descriptivo
7	1. Hallullas con 2% de sal y 5% de manteca. 2. Hallullas especiales Líder Independencia	Test valoración calidad Perfil descriptivo

Tabla 4: Características principales de los atributos para la evaluación sensorial de pan tipo hallulla, utilizados en la primera sesión de entrenamiento.

Atributo	Características principales
Color de la corteza /Miga	Tostada, dorada natural. La miga blanca crema.
Apariencia	Superficie lisa, plana. Defectos como grietas, arrugas, globos.
Aroma	Natural, a materia grasa y a levadura.
Sabor	Tostado. Defectos quemado, crudo.
Textura	Corteza: ni blanda-dura, ni delgada-gruesa. Miga: suave-blanda.

Fuente: Adaptado de Damásio (1999).

Con los resultados obtenidos en la primera sesión de entrenamiento se procedió a modificar la tabla de valoración de calidad escala Karlsruhe para pan tipo hallulla, elaborada anteriormente por Quezada (2011). La construcción de la tabla de valoración de calidad específica para pan tipo hallulla, consta de 9 puntos, que se agrupan en tres grados de calidad, los cuales a su vez se subdividen en tres subgrupos, como se muestra en la Tabla 5. Siendo, grado de Calidad 1 entre 9 a 7,0; grado de Calidad 2 entre 6,9 a 4,0 y grado de Calidad 3 entre 3,9 a 1,0.

Asimismo, con los datos aportados por la primera sesión de entrenamiento se elaboró una ficha preliminar para el perfil descriptivo (Ficha en Anexo 2), mediante una escala no estructurada de 10 cm, específica para pan tipo hallulla (Bassett, Gimenez, Pinho, & Sammán, 2013; Damásio, 1999). En la segunda sesión de entrenamiento se aplicó el test de valoración de calidad con escala Karlsruhe y perfil descriptivo (previamente elaborados) donde los jueces evaluaron muestras de pan tipo hallulla (Tabla 3) en una mesa redonda.

Tabla 5: Grados de calidad, calificación verbal y calificación numérica de escala Karlsruhe.

Grados	Calificación verbal	Calificación numérica
Grado 1 Características Típicas	Excelente	9
	Muy Buena	8
	Buena	7
Grado 2 Deterioro Tolerable	Satisfactoria	6
	Regular	5
	Suficiente	4
Grado 3 Deterioro Indeseable	Defectuoso	3
	Mala	2
	Muy Mala	1

Fuente: Adaptado de Quezada (2011).

Para orientar a los jueces durante la evaluación del atributo visual “Color corteza” se elaboró un folio de fotografías de “Coloración de panes tipo hallullas en distintos tiempos de horneado”. Estas fotografías fueron utilizadas en el entrenamiento de los jueces durante la evaluación de las muestras.

En total se realizaron 7 sesiones, con los productos y evaluaciones especificados en la Tabla 3, para posteriormente realizar la validación del panel.

6.6.3 Validación del panel sensorial

Con los jueces previamente entrenados se procedió a la validación del panel sensorial, bajo las directrices de la Norma ISO 11132-2012, la cual proporciona criterios para el seguimiento y la evaluación del rendimiento global de un panel descriptivo cuantitativo y de cada miembro. Esto comprende la capacidad del panel para detectar, identificar y medir descriptores, usar el test de forma adecuada y repetir sus resultados.

Para dicha validación se evaluaron 3 muestras distintas entre sí, durante tres sesiones, dichas muestra se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones experimentales de las muestras de pan tipo hallulla para la validación del panel.

Muestras	Tiempo de fermentación	Temperatura de fermentación	Tiempo de horneado	Temperatura de horneado
Muestra 1	30 min	40°C	15 min	220°C
Muestra 2	15 min	40°C	15 min	180°C
Muestra 3	30 min	40°C	15 min	200°C

Se comenzó realizando un análisis de varianza ANOVA para el panel en general y para cada juez. Con los datos obtenidos se evaluó el desempeño del panel y de cada juez, tal como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros para la evaluación del desempeño del panel.

Evaluación de desempeño	Indicadores de desempeño	Requisitos de aceptación
Panel	Discriminación	Existen D.S. entre muestras
	Homogeneidad	Sin D.S. entre interacción Muestras-Jueces
	Reproductibilidad	Sin D.S. entre interacción Sesiones, Sesiones-Muestras, Sesiones-Jueces
Juez	Discriminación	D.S. entre muestras por cada juez

Donde; D.S. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Fuente: Adaptado de Illanes (2014).

Aquellos jueces que no tuvieron un desempeño adecuado, como carencias en las habilidades requeridas para las evaluaciones y/o falta de compromiso, fueron eliminados para las sesiones siguientes.

6.6.4 Evaluación sensorial de pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa

Para determinar el efecto de la enzima asparaginasa sobre la calidad sensorial y el contenido de acrilamida en el pan tipo hallulla se realizaron tres sesiones con el panel sensorial previamente entrenado y validado. Se evaluaron 3 muestras, donde la Muestra 1: pan tipo hallulla control (sin enzima). Muestra 2: pan tipo hallulla con 300 ppm de enzima/ kg de harina y Muestra 3: pan tipo hallulla con 150 ppm de enzima/ kg de harina.

6.6.5 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa StatGraphics Centurion XVI.I, fabricado por StatPoint Technologies, 2007.

6.6.6 Análisis de varianza

Para el análisis de los resultados de la evaluación sensorial del test de calidad con escala Karlsruhe y perfil descriptivo, se realizó un análisis de varianza ANOVA de tres factores (muestras, jueces y sesiones) para cada atributo, utilizando un nivel de confianza del 95% para determinar la existencia de diferencias significativas entre las muestras-jueces-sesiones, para cada atributo sensorial. Los atributos que presentaron diferencias significativas fueron analizados por el test de diferencias múltiples de Tukey.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Desempeño analítico de la técnica para la cuantificación de acrilamida

Para determinar la cantidad de acrilamida en muestras de pan tipo hallulla se realizó la curva de calibración que se observa en la Figura 7.

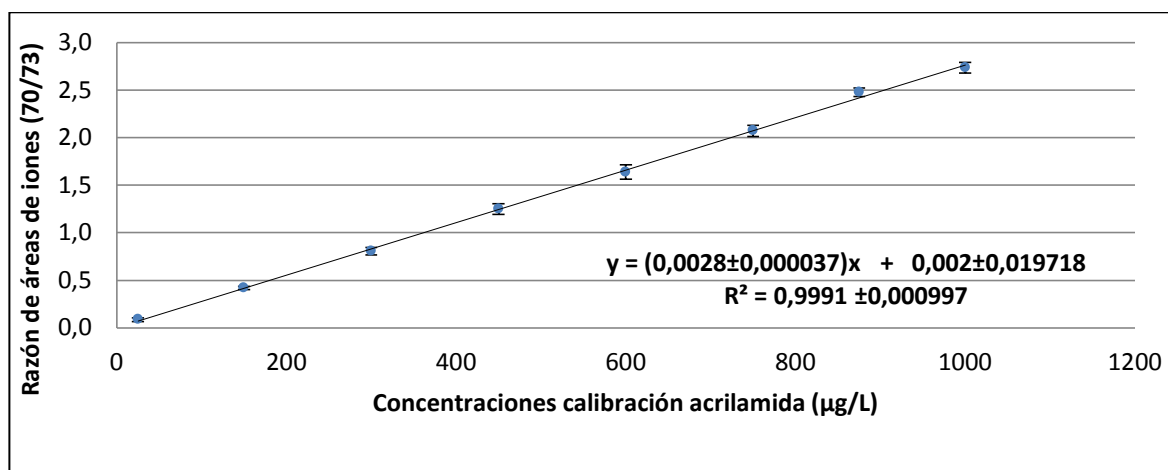


Figura 7: Curva de calibración para la cuantificación de la concentración de acrilamida para pan tipo hallulla.

Los resultados del desempeño analítico de la técnica para la medición de acrilamida en pan tipo hallulla se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados medición de los parámetros para determinar el desempeño analítico para la cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla.

Parámetros	Pan	Requisitos
Linealidad	0,9991±0,000997	0,99
Exactitud (% de recuperación)	83%	>80%
Límite de detección(µg/kg)	1,30	--
Límite de cuantificación (µg/kg)	4,35	--

Al observar los resultados se puede afirmar que la técnica es adecuada y presenta un buen desempeño, pues el ajuste de la linealidad es superior a 0,99. El porcentaje de recuperación fue mayor de 80%, siendo superior al requisito de aceptación (Validación Métodos Físicoquímicos, 2011).

Para los límites de detección y cuantificación se observa que el equipo es capaz de detectar concentraciones de acrilamida para el pan tipo hallulla control, siendo el límite de cuantificación más bajo que la cantidad en las muestras de pan. Una muestra de pan control contiene 108 µg/kg de acrilamida, cantidad superior al límite de cuantificación, por lo tanto, se considera que la técnica es apta para la medición de acrilamida en pan.

7.2 Cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin la adición de enzima asparaginasa

En la Tabla 9 se presentan los resultados del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla, según las condiciones experimentales estudiadas, para ello las muestras fueron evaluadas por triplicado (n=3).

Tabla 9: Resultados cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla sin la adición de enzima asparaginasa.

Condiciones experimentales	Promedio concentración de acrilamida (µg/kg)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Pan control	108	6,05	6%
Pan sin fermentar horneado	111	8,94	8%
Corteza pan	145	1,94	1%
Miga pan	< LOD	--	--

Donde; LOD Límite de Detección y n=3 número de repeticiones.

Los resultados indican que el pan tipo hallulla contiene 108 µg/kg de acrilamida, resultado esperado para este alimento, pues según Pedreschi et al., (2014), los productos de panadería poseen una bajo contenido de acrilamida en comparación con alimentos, tales como, papas fritas, papas fritas tipo chips, café, entre otros. Por otra parte, dicha concentración es difícil de comparar con otros panes, pues se ha demostrado que los niveles de acrilamida en diferentes tipos de panes varía según la concentración de precursores en las materias

primas y la temperatura del proceso, así como las tradiciones de elaboración (Boyacı Gündüz & Cengiz, 2014; Mustafa, 2008).

El pan sin fermentar horneado obtuvo un contenido de acrilamida de 111 µg/kg, cantidad similar al pan tipo hallulla control (fermentado), sin embargo, se esperaba encontrar una mayor cantidad de acrilamida en el pan sin fermentar, al tener una mayor disponibilidad de asparagina como precursor para la reacción de Maillard, quizás la temperatura máxima alcanzada por la corteza del pan sin fermentar fue por poco tiempo, ya que al momento de introducirlo al horno su temperatura era cercana a la ambiente y se debió calentar en forma progresiva pero lenta en esta etapa, a diferencia del pan control o fermentado que alcanzaba una temperatura de 40°C durante la fermentación y posteriormente en la etapa final del horneado llegaba a unos 170-200°C sostenido por un tiempo suficiente, donde obtuvo la coloración típica café debido a las reacciones de pardeamiento, principalmente por la reacción de Maillard (Stear, 1990). Dicho efecto se puede observar en la Figura 8, donde se aprecia que el pan sin fermentar carecía de coloración respecto al pan control (fermentado).

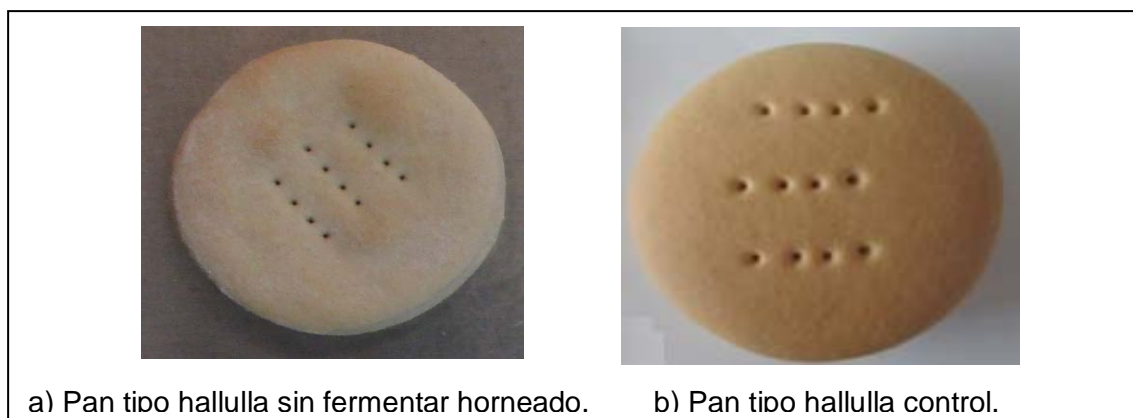


Figura 8: Comparación fotográfica pan tipo hallulla sin fermentar horneado respecto a pan tipo hallulla control (fermentado).

No obstante, se ha reportado que la fermentación con levadura tiene un papel importante en la reducción del contenido de acrilamida en niveles bajos

del precursor asparagina, según Mustafa (2008), la levadura consume asparagina como fuente de nitrógeno para su actividad metabólica.

En otro estudio realizado por este mismo autor (Mustafa, Åman, Andersson, & Kamal-Eldin, 2007), muestra que en el pan elaborado con harina de trigo, se redujo la asparagina libre en un 85%, durante la fermentación y la cocción. Una rápida degradación de asparagina ocurre durante la fermentación y una cantidad menor es reducida durante la cocción.

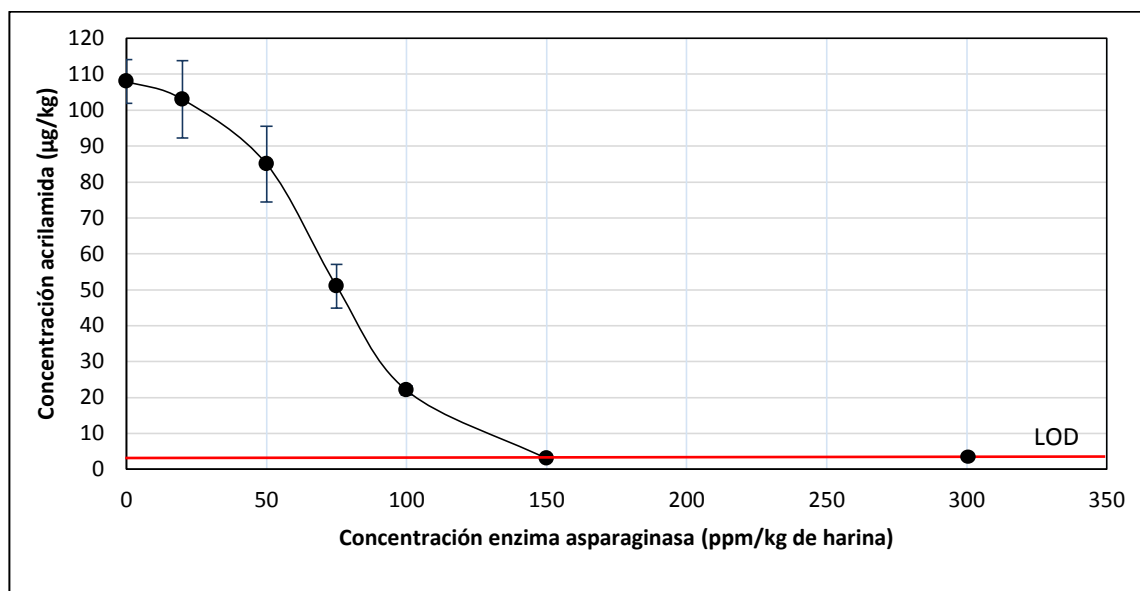
Otras investigaciones realizadas para estudiar el efecto de la fermentación en pan (a base de harina de trigo), mostraron que el tiempo de fermentación tiene un efecto reductor sobre los niveles de azúcares reductores en la masa, pero dicha reducción no afecta los niveles de acrilamida en el pan, en apoyo a lo anterior se concluye que la asparagina es el precursor crítico para la formación de acrilamida en productos a base de cereales (Mustafa, 2008; Surdyk et al., 2004). Además se ha observado que el nivel de asparagina en la masa, está altamente correlacionado con el nivel de acrilamida final en el pan (Capuano et al., 2009; Mustafa et al., 2007; Xu et al., 2014).

El contenido de acrilamida detectado en la corteza del pan fue de 145 µg/kg, y en la miga bajo el Límite de Detección (< LOD), por lo que más del 99% de acrilamida se encontró contenida en la corteza del pan. Este resultado también fue reportado por Surdyk et al. (2004) ya que, detectó que más de 99% de la acrilamida se encontraba en la corteza del pan (elaborado con harina de trigo). Por otra parte, se ha observado que existe una fuerte correlación entre el color y el contenido de acrilamida en la corteza del pan, al hornear el pan a diferentes temperaturas con los mismos ingredientes. Dichos efectos pueden ser explicados por el mecanismo de transferencia de calor durante el proceso de cocción. En la etapa inicial de cocción, las capas externas de la masa adquieren una temperatura cercana a los 100°C (a los 3 min) ocurriendo una transferencia de calor desde el exterior al interior de la masa, la humedad libre de la masa se evapora en la llamada “zona de evaporación” tanto las capas

externas adquieren 100°C o más. Durante la etapa final, la temperatura del horno con la que se esté trabajando (200-220°C) se mantiene constante, la corteza alcanza 170-200°C y adquiere la coloración típica café debido a las reacciones de pardeamiento generadas principalmente por la reacción de Maillard. Por otra parte, el interior del pan (miga) en esta etapa solo alcanza los 100°C, temperatura que no es suficiente para producir la reacción de Maillard y con ella la coloración típica café (Boyacı Gündüz & Cengiz, 2014; Stear, 1990).

7.3 Cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa

A continuación la Figura 9 muestra los resultados de la concentración de acrilamida en pan tipo hallulla con la adición de la enzima asparaginasa, el rango de concentración evaluado fue de 20-300 ppm de enzima asparaginasa/ kg de harina (Véase Anexo 3).



Donde; la línea roja indica el Límite de Detección (LOD) del equipo, correspondiente a 1,3 µg/kg.

Figura 9: Concentración de acrilamida respecto a la concentración de enzima asparaginasa adicionada al pan tipo hallulla.

Los resultados indican que el pan tipo hallulla con 20 ppm de enzima/ kg de harina contiene 103 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida, dicha cantidad es muy cercana al contenido del pan tipo hallulla control (108 $\mu\text{g}/\text{kg}$), por lo que esta concentración de enzima no fue lo suficientemente adecuada para una reducción significativa de la acrilamida. De forma similar, el pan tipo hallulla con 50 ppm de enzima/ kg de harina contiene 85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida; ambas concentraciones de enzima no generan una reducción significativa del contenido de acrilamida en la formulación de pan tipo hallulla estudiada.

El pan tipo hallulla con 75 ppm de enzima/ kg de harina contiene 51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida, y el pan tipo hallulla con 100 ppm de enzima/ kg de harina contienen 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida, reduciendo el contenido de acrilamida entre un 53 y 80% respectivamente. Dichas concentraciones muestran una reducción significativa con respecto a las otras concentraciones de enzimas mencionadas, siendo capaces de minimizar el contenido de acrilamida, sin embargo no lo reduce del todo. Hendriksen et al. (2009), obtuvo resultados similares en pan, pues reportó que al aplicar una dosis de 700 ppm de enzima asparaginasa se obtiene una reducción entre 76-87% del contenido de acrilamida en los productos finales. Los parámetros críticos en estos ensayos fueron dosis de enzimas, el tiempo de descanso de masa y contenido de agua. Se ha reportado que la asparaginasa fue eficaz en reducir el contenido de acrilamida en pan entre 55-90% con una concentración de 300-700 ppm respectivamente (Amrein et al., 2007). Un ensayo piloto industrial realizado por Novozymes, (2014) mostró una reducción del 50% del contenido de acrilamida a una dosis de 150 ppm de enzima asparaginasa. Un aumento de la dosis a 600 ppm no redujo la concentración de acrilamida significativamente.

Finalmente, las concentraciones más altas de enzima adicionada a la formulación 150 y 300 ppm/ kg de harina, redujeron significativamente el contenido de acrilamida obteniendo una concentración de acrilamida bajo el

Límite de Detección (< LOD) del equipo, mitigando casi en forma completa a la acrilamida presente en el pan tipo hallulla estudiado.

Es importante considerar que la adición de enzima asparaginasa para reducir los niveles de acrilamida, debe ser estudiada en forma particular para cada matriz alimentaria, pues varía dependiendo de las materias primas utilizadas, la formulación, el proceso y la reducción de acrilamida esperada (Mustafa, 2008; Novozymes, 2014).

7.4 Entrenamiento panel sensorial

Se entrenó a un total de 10 jueces en 7 sesiones, con distintas muestras descritas con anterioridad en la Tabla 3. Para orientar a los jueces se utilizó un folio de fotografías de “Coloración de panes tipo hallullas en distintos tiempos de horneado”, como se muestra en la Figura 10, el cual fue aplicado desde la segunda sesión de entrenamiento en adelante.



25 minutos Horneado



20 minutos Horneado



15 minutos Horneado



10 minutos Horneado



5 minutos Horneado

Figura 10: Folio de fotografías “Coloración de panes en distintos tiempos de horneado”.

7.4.1 Test de calidad

Con los datos aportados por la primera sesión de entrenamiento, cuyos resultados se encuentran en Anexo 4, se elaboró de una ficha preliminar para el test descriptivo, mediante una escala no estructurada de 10 cm, específica para pan tipo hallulla. Además se perfeccionó la escala Karlsruhe elaborada por Quezada (2011).

Los resultados obtenidos entre la segunda y séptima sesión de entrenamiento para el test de calidad se exponen en el Anexo 5.

En la segunda sesión de entrenamiento, se obtuvo la tabla de valoración de calidad final, específica para pan tipo hallulla, tal como se muestra en el Anexo 6, con su respectiva ficha de respuesta en el Anexo 7.

Se observó que los jueces en la mayoría de las sesiones no presentaron diferencias con un nivel de significancia del 5%. Para aquellos atributos que presentaron problemas, antes de comenzar la siguiente sesión se realizó una explicación más exhaustiva respecto a su evaluación.

Por otra parte, con los resultados de la séptima sesión de entrenamiento se confirmó que el panel fue capaz de clasificar los panes tipo hallulla según la tabla de valoración de calidad con escala Karlsruhe, puesto que los jueces no presentaron diferencias con un nivel de significancia de 5%.

7.4.2 Perfil descriptivo

En la segunda sesión de entrenamiento, se aplicó un test de perfil descriptivo específica para pan tipo hallulla (resultados Anexo 8). De estos resultados se puede desprender que en ciertos descriptores los jueces presentaron diferencias a un nivel de significancia del 5%. Entre la segunda y cuarta sesión, como medida correctiva se realizó una explicación más exhaustiva respecto a los descriptores que presentaron diferencias. También se consideró una disminución en la cantidad de descriptores evaluados, para ello a partir de la quinta sesión se aplicó una nueva ficha de perfil descriptivo.

Los resultados se muestran en la Tabla 10, donde en color rojo se encuentran aquellos descriptores que presentaron diferencias con un nivel de significancia del 5%.

Tabla 10: Resultado entrenamiento panel sensorial para el perfil descriptivo.

Sesiones	Descriptores	Diferencia significativa, jueces ($p \leq 0,05$)
5	Color corteza	SI
	Aroma	NO
	Dureza al Tacto	SI
	Elasticidad Miga	NO
	Dureza en Boca	SI
	Sabor Fermentación / Levadura	NO
	Sabor Tostado	SI
6	Color corteza	NO
	Aroma	NO
	Dureza al Tacto	NO
	Elasticidad Miga	NO
	Dureza en Boca	NO
	Sabor Fermentación / Levadura	NO
	Sabor Tostado	NO
7	Color corteza	NO
	Aroma Fermentando	SI
	Aroma Tostado/Quemado	NO
	Dureza al Tacto	NO
	Elasticidad Miga	NO
	Dureza en Boca	NO
	Sabor Fermentación / Levadura	NO
	Sabor Tostado	NO

Donde; SI: presentan diferencias significativas, ($p \leq 0,05$).

En la séptima sesión se observa que no hubo diferencias entre muestras y jueces con un nivel de significancia del 5% para la mayoría de los descriptores evaluados, por lo tanto se puede decir que los jueces mejoraron su desempeño, siendo un panel homogéneo y capaz de discriminar muestras. En cuanto al descriptor aroma a fermentado hubo diferencias entre jueces, esto pudo originarse debido a que es un atributo complejo de evaluar y se necesita un mayor entrenamiento.

Finalizada la séptima sesión de entrenamiento se procedió a realizar una selección de panel y se estableció la ficha definitiva para el perfil descriptivo (Anexo 9). De los 10 jueces entrenados se descartó a una persona por problemas de asistencia, por lo tanto se contó con 9 jueces para la validación del panel y la evaluación de las condiciones experimentales.

7.5 Validación del panel sensorial

La Norma ISO 11132 indica que se debe trabajar con descriptores claves (significativamente diferentes) para evaluar el desempeño del panel sensorial, por ello fueron escogidos los descriptores color corteza, dureza en boca y sabor tostado/quemado.

La validación del panel, fue realizada en 3 sesiones mediante 3 muestras, tal como se describió en la metodología 6.6.3. En la Tabla 11, se muestran los resultados de los descriptores que presentaron diferencias significativas en color rojo, con un nivel de significancia del 5%, al realizar un ANOVA de tres vías entre jueces, muestras y sesiones.

Tabla 11: Resultados validación del panel sensorial para el perfil descriptivo.

EFECTOS PRINCIPALES	Diferencias significativas, descriptores ($p \leq 0,05$)		
	Color corteza	Dureza al tacto	Sabor tostado/quemado
Muestras	SI	SI	SI
Jueces	NO	NO	NO
Sesiones	NO	NO	NO
INTERACCIONES			
Muestras-Jueces	NO	NO	NO
Muestras-Sesiones	NO	NO	NO
Jueces-Sesiones	NO	NO	NO

Donde; SI: presentan diferencias significativas, ($p \leq 0,05$)

Se puede concluir que el panel en general es capaz de discriminar entre muestras, ya que existen diferencias significativas entre éstas para los tres descriptores considerados. Además es un panel homogéneo, pues no presenta diferencias significativas en las interacciones entre jueces y sesiones. Finalmente, es un panel reproducible puesto que no existen diferencias significativas entre sesiones, muestras-sesiones y jueces-sesiones.

Por otra parte, para evaluar el desempeño de los jueces se realizó un análisis ANOVA de una vía a cada juez, los resultados se muestran en la Tabla 12, en color rojo se encuentran las diferencias significativas con un nivel de significancia del 5%.

Tabla 12: Resultados validación jueces para perfil descriptivo.

Jueces	Diferencias significativas, descriptores ($p \leq 0,05$)		
	Color corteza	Dureza al tacto	Sabor tostado/ Quemado
1	SI	SI	SI
2	SI	NO	SI
3	SI	NO	SI
4	SI	NO	SI
5	SI	SI	SI
6	SI	SI	NO
7	SI	SI	SI
8	SI	SI	SI
9	SI	SI	SI

Donde; SI: presentan diferencias significativas, ($p \leq 0,05$).

Se concluyó que todos los jueces fueron capaces de discriminar color corteza, ya que existen diferencias significativas entre las muestras para este descriptor. Tanto para el descriptor dureza al tacto y sabor tostado/quemado la mayoría de los jueces presentaron diferencias significativas entre muestras, a excepción de los jueces 2,3 y 4 para dureza al tacto y el juez 7 para sabor a tostado/quemado. Esto indica que ellos no fueron capaces de discriminar de forma correcta estos descriptores, sin embargo no se consideró eliminarlos, ya que presentaron un desempeño general satisfactorio.

Para corregir dichas diferencias en la siguiente sesión, se conversó con los jueces que presentaron diferencias y se les realizó una explicación exhaustiva respecto a estos atributos.

7.6 Evaluación sensorial de pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa

7.6.1 Test de calidad

Al analizar los resultados para el test de calidad (resultados Anexo 10), se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre jueces para la mayoría de los atributos evaluados, a excepción de textura. Para identificar aquellos jueces con mayor dispersión en los atributos que presentaron diferencias, se aplicó un test de rangos múltiples de Tukey (Anexo 11). Se decidió eliminar a los jueces 5 y 9, pues evaluaban muy distinto al resto del panel. Finalmente para el análisis del test de calidad el panel sensorial quedó compuesto por 7 jueces, logrando la homogeneidad del panel. Los resultados fueron analizados por ANOVA multifactorial de tres vías (jueces, muestras y sesiones) con un nivel de significancia del 5%. Los resultados se pueden observar en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados test de calidad con escala Karlsruhe para pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.

Atributos	Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) jueces	Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) muestras	Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) sesiones
Color	NO	NO	NO
Apariencia/ Forma	NO	NO	NO
Aroma	NO	NO	NO
Sabor	NO	NO	NO
Textura	NO	NO	NO

Donde; NO: presentan diferencias significativas, ($p \leq 0,05$)

Se observa que, no hubo diferencias entre jueces y sesiones con un nivel de significancia del 5%, esto quiere decir que el panel fue correctamente

entrenado validando así los resultados para el test de calidad. Esto se puede explicar, porque las muestras eran muy similares entre sí en todas sus características, en la Tabla 14 se muestran los promedios de los atributos de las tres muestras evaluadas y en Anexo 12 se comparan las tres muestras de pan, donde se aprecia el color y la apariencia de estas.

Tabla 14: Resultado test de calidad para pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa con los 7 jueces finales.

TEST DE CALIDAD			
Atributos	Promedio Pan control	Promedio pan con 300 ppm enzima/kg de harina	Promedio pan con 150 ppm enzima/kg de harina
Color	7,8	7,8	7,8
Apariencia	7,9	7,9	7,8
Aroma	7,7	7,7	7,5
Sabor	7,6	7,6	7,6
Textura	7,3	7,5	7,5
Grado de calidad	1	1	1

En rojo: Atributos limitantes por muestra.

Las tres muestras presentaron en casi todos los atributos un promedio similar, donde la textura fue el atributo limitante para las tres muestras, pues obtuvo el promedio más bajo de la evaluación de calidad. Esto puede deberse a que las muestras eran evaluadas un día después de su elaboración, pues el proceso de envejecimiento del pan comienza aproximadamente después de 3 a 4 h finalizado el horneado, proceso que conlleva ciertos cambios fisicoquímicos cuyas consecuencias son pérdida de la textura suave de la miga y crujencia de la corteza, resequedad del pan, entre otros (Luna & Bárcenas, 2011).

Finalmente, las tres muestras obtuvieron calidad grado 1, presentando según la escala Karlsruhe las características típicas del pan tipo hallulla para todos los atributos evaluados (color, apariencia/forma, aroma, sabor y textura).

7.6.2 Perfil descriptivo

Al analizar los resultados del perfil descriptivo (resultados Anexo 13) se encontraron diferencias significativas con un nivel de significancia del 5% entre jueces para la mayoría de los descriptores evaluados, a excepción del sabor a fermentado y color corteza. Esto demuestra que los jueces fueron correctamente entrenados para estos descriptores, además en color corteza se contó con un folio de coloración (Figura 10) como referencia. Para identificar aquellos jueces que se desviaron de los rangos, al igual que el test de calidad, se aplicó un test de rangos múltiples de Tukey (Anexo 14), donde se decidió eliminar a los jueces 5 y 9, ya que evaluaban distinto al resto del panel. El panel definitivo para el perfil descriptivo quedó formado por 7 jueces, los mismos que conformaron los resultados finales para el test de calidad.

Análogo al test de calidad, se realizó un ANOVA multifactorial de tres vías (jueces, muestras y sesiones) para el análisis de los resultados del perfil descriptivo, con un nivel de significancia del 5%, tal como se observan en la Tabla 15.

Tabla 15: Resultados perfil descriptivo para pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa con los 7 jueces finales.

Atributos	Diferencias significativas (p≤0,05) jueces	Diferencias significativas (p≤0,05) muestras	Diferencias significativas (p≤0,05) Sesiones
Color corteza	NO	NO	NO
Aroma Fermentando	NO	NO	NO
Aroma Tostado/Quemado	NO	NO	NO
Dureza al Tacto	SI	NO	NO
Elasticidad Miga	NO	NO	NO
Dureza en Boca	NO	NO	NO
Sabor Fermentación / Levadura	NO	NO	NO
Sabor Tostado	NO	NO	NO

SI: diferencias significativas (p≤0,05)

Al igual que el test de calidad, no hubo diferencias significativas para la mayoría de los descriptores entre jueces y sesiones con un nivel de significancia del 5%, esto quiere decir que el panel fue correctamente entrenado validando así los resultados. A excepción del atributo dureza al tacto que presentó diferencias significativas entre jueces.

Cabe destacar que a pesar que el panel sensorial se encontraba validado para el descriptor dureza al tacto, en las sesiones donde se evaluaron las condiciones experimentales, se presentaron diferencias entre los jueces con un nivel de significancia del 5%.

Los resultados del perfil descriptivo son similares al test de calidad. Se observó que no hubo diferencias entre las muestras con un nivel de significancia del 5% para los descriptores evaluados. Esto se puede explicar, porque las muestras eran muy similares entre sí en todas sus características. En la Figura 11 se observa el perfil del gráfico de tela de araña para pan tipo hallulla con y sin la adición de enzima asparaginasa (Resumen de los resultados en Anexo 15).

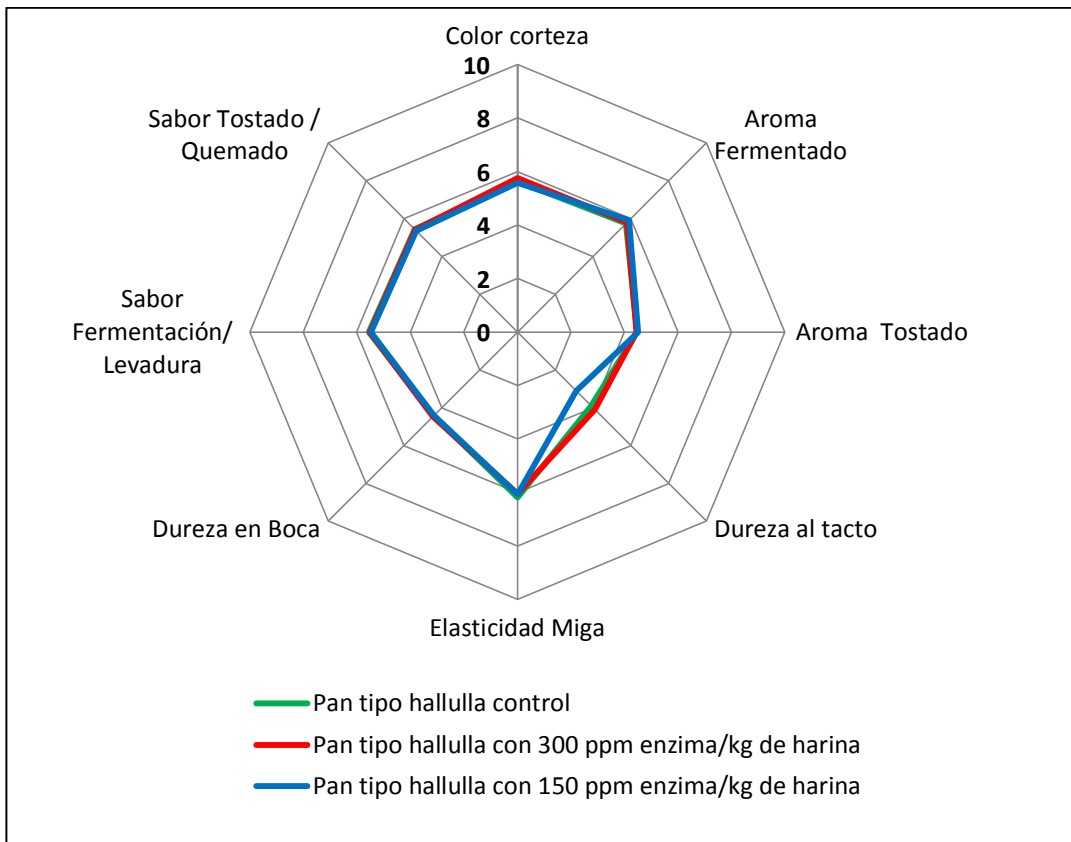


Figura 11: Análisis descriptivo para pan tipo hallulla sin y con la adición de enzima asparaginasa.

Se puede decir que la muestra de pan tipo hallulla control y pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa (300 y 150 ppm/ kg de harina), presentaron en todos los descriptores un promedio similar en el test descriptivo, reafirmando la similitud existente entre las tres muestras de pan.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó un contenido de acrilamida en el pan tipo hallulla control de 108 µg/kg, previa validación del desempeño analítico de la técnica para la cuantificación de acrilamida; la cual demostró ser un método adecuado para la investigación de acrilamida en pan tipo hallulla.
- El pan sin fermentar horneado presentó una concentración de acrilamida de 111 µg/kg, cercana al pan control, sin embargo se esperaba encontrar una mayor concentración del contaminante. Se determinó que más del 99% de la acrilamida se encontraba en la corteza del pan, siendo despreciable su contenido en la miga.
- La adición de la enzima asparaginasa tuvo un efecto reductor en la acrilamida del pan final, siendo el rango de concentración óptima para la disminución de acrilamida 100 a 150 ppm de enzima/ kg de harina, obteniendo una reducción del 80% y más del 99%, respectivamente.
- Se seleccionó, entrenó y válido un panel sensorial según la Norma ISO 11132-2012, compuesto por 7 jueces, tanto para el test de calidad y perfil descriptivo, siendo capaces de evaluar las muestras sin diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos.
- La calidad sensorial del pan con enzima asparaginasa con 150 y 300 ppm enzima/ kg de harina, evaluada a través de un panel entrenado, fue calificada como grado 1, sin diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al pan de la formulación control.
- El perfil descriptivo del pan con enzima (150 y 300 ppm enzima/ kg de harina), obtenido a través de un panel entrenado y validado, no tuvo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al pan de la formulación control, para todos los descriptores evaluados.
- La incorporación de la enzima asparaginasa es una medida adecuada para la mitigación de acrilamida en pan tipo hallulla, debido a que reduce los niveles de acrilamida y conserva sus características sensoriales originales.

9. BIBLIOGRAFÍA

Amrein, T. M., Schönbacher, B., Escher, F., & Amadò, R. (2004). Acrylamide in Gingerbread: Critical Factors for Formation and Possible Ways for Reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4282-4288.

Amrein, T. M., Andres, L., Escher, F., & Amadò, R. (2007). Occurrence of acrylamide in selected foods and mitigation options. *Food additives and contaminants*, 24(sup1), 13-25.

Anese, M., Quarta, B., Peloux, L., & Calligaris, S. (2011). Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. *Food Research International*, 44(9), 2837-2842.

Anese, M., Suman, M., & Nicoli, M. (2010). Acrylamide removal from heated foods. *Food Chemistry*, 119(2), 791-794.

Barutcu, I., Sahin, S., & Sumnu, G. (2009). Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 17-22.

Bassett, M. N., Gimenez, A., Pinho, O., & Sammán, N. (2013). Importancia del pan blanco como fuente de nutrientes: reducción de sodio y fortificación con calcio. *Diaeta*, 31, 07-14.

Boyacı Gündüz, C. P., & Cengiz, M. F. (2014). Acrylamide Contents of Commonly Consumed Bread Types in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 18(4), 833-841.

Brathen, E., & Knutsen, S. H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chemistry*, 92(4), 693-700.

Camacho, L., Latendresse, J. R., Muskhelishvili, L., Patton, R., Bowyer, J. F., Thomas, M., & Doerge, D. R. (2012). Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicology Letters*, 211(2), 135-143.

Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Serpen, A., Acar, O. C., Gokmen, V., & Fogliano, V. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42(9), 1295-1302.

Cauvain, S. (2001). Breadmaking. In W. L. y. C. P. LLC (Ed.), *Cereals processing technology* (pp. 213). Cambridge, England y North and South America, USA.

Ciesarová, Z., Kiss, E. & Boegl, P. (2006). Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *Journal of Food and Nutrition Research* 45, 141-146.

Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 118-133.

Codex Alimentarius. (2009). Código de prácticas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos. [en línea] <<http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/.../cvfq032011.pdf>> [Consulta junio 2014]

Corrigan, P. J. (2005). Method for reducing acrylamide in foods, foods having reduced levels of acrylamide, and article of commerce: US Patent 20,050,079,254.

Damáso, M. H. (1999). *Temas en tecnología de alimentos : manual de conceptos para análisis sensorial de los alimentos*: Instituto Politécnico Nacional. Dirección de Publicaciones y Materiales Educativos.

Edwards, W. P. (2007). *The Science of Bakery Products*: Royal Society of Chemistry.

Eriksson, S. (2005). Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology. (Doctoral Thesis), Stockholm University. Stockholm.

FAO, & JECFA. (2007). Asparaginase from *Aspergillus Oryzae* expressed in *A. Oryzae*. [en línea] <<http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-498-m4.pdf>> [Consulta mayo 2015]

Fechipan. (2012). La industria Latinoamericana del pan en cifras. [en línea] <http://www.fechipan.cl/pdf/cifras_Panaderia_Latinoamericana.pdf> [Consulta mayo 2015]

Forstova, V., Belkova, B., Riddellova, K., Vaclavik, L., Prihoda, J., & Hajslova, J. (2014). Acrylamide formation in traditional Czech leavened wheat-rye breads and wheat rolls. *Food Control*, 38, 221-226.

Friedman, M., & Levin, C. E. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6113-6140.

Fundación Chile. (2012). Chile saludable, volumen 2, Oportunidades y desafíos de innovación. [en línea] <<http://www.revolucionsaludable.cl/wp-content/uploads/2014/10/ESTUDIO-CHILE-SALUDABLE-VOLUMEN-II1.pdf>> [Consulta junio 2014]

Fundación Chile. (2010). Competitividad Panadera [en línea] <http://fechipan.cl/pdf/estudio_Diagnostico_Competitividad.pdf> [Consulta junio 2014]

Gökmen, V., & Şenyuva, H. Z. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 103(1), 196-203.

Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R., & Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4168-4176.

Hernández, E. (2005). *Tecnología de Cereales y Oleaginosas*. Bogotá, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería: Universidad Nacional Abierta y a Distancia-UNAD.

IARC. (1994). Monographs on the evaluation of carcinogen risk to humans: Some industrial chemicals. International Agency on Research on Cancer. 60, 389 – 433.

Illanes, C. (2014). *Efecto de la lixiviación de azúcares reductores sobre la formación de furano en papas fritas*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Santiago de Chile.

Indupan A.G. (2015). Historia del Pan. [en línea] <http://www.indupan.cl/historia_del_pan.html> [Consulta marzo 2015]

Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., & Jafari, M. (2011). Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 530-543.

Knol, J. J., Linssen, J. P. H., & van Boekel, M. A. J. S. (2010). Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modelling. *Food Chemistry*, 120(4), 1047-1057.

Knol, J. J., Viklund, G. A. I., Linssen, J. P. H., Sjöholm, I. M., Skog, K. I., & van Boekel, M. A. J. S. (2009). Kinetic modelling: A tool to predict the formation of acrylamide in potato crisps. *Food Chemistry*, 113(1), 103-109.

Konings, E. J., Ashby, P., Hamlet, C. G., & Thompson, G. A. (2007). Acrylamide in cereal and cereal products: A review on progress in level reduction. *Food additives and contaminants*, 24(sup1), 47-59.

Luna, M., & Bárcenas, M. (2011). Envejecimiento del pan: causas y soluciones *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 5(2), 40 -53

Maquipan Chile. (2014). Receta hallulla tradicional [en línea] <http://www.maquipan.cl/v2/index.php?option=com_content&task=view&id=24&Itemid=53>[Consulta julio 2014]

- Molinera San Cristóbal. (2004). Curso de panadería básica.
- Mustafa, A. (2008). Acrylamide in Bread: Precursors, Formation and Reduction. (Doctoral thesis), Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Mustafa, A., Åman, P., Andersson, R., & Kamal-Eldin, A. (2007). Analysis of free amino acids in cereal products. *Food Chemistry*, 105(1), 317-324.
- Mustafa, A., Andersson, R., Kamal-Eldin, A., & Aman, P. (2011). Fortification with Free Amino Acids Affects Acrylamide Content in Yeast Leavened Bread. *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*, 325-335.
- Novozymes. (2014). Acrylaway [en línea] <<http://www.acrylaway.novozymes.com/en/Pages/default.aspx>> [Consulta mayo 2014]
- ODEPA. (2014). Evolución del Consumo aparente de los principales Alimentos en Chile: 2003-2013. [en línea] <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1410803066EVOLUCI%C3%93NDELCONSUMOAPARENTEALIMENTOSENCHILE20032013.pdf>[Consulta marzo 2015]
- Pedreschi, F., Granby, K., & Risum, J. (2010). Acrylamide mitigation in potato chips by using NaCl. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 917-921.
- Pedreschi, F., Kaack, K., & Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*, 109(2), 386-392.
- Pedreschi, F., Mariotti, M. S., & Granby, K. (2014). Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 9-20.
- Pedreschi, F., Mariotti M. S., Granby, K., & Risum, J. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT - Food Science and Technology*.
- Quezada, N. (2011). "Clasificación de la Calidad sensorial de Pan tipo Hallulla mediante Visión Computacional". Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Santiago de Chile. .
- REA. Real Academia Española. Definición de Hallulla. [en línea] <<http://lema.rae.es/drae/?val=hallulla>>[Consulta marzo 2015]
- Riofrío, S. (2004). *Determinación de Variables y Parámetros para Masas Laminadas utilizando un Prototipo de Laboratorio*. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito.
- RSA. (Actualizado Enero 2015). Reglamento Sanitario de los Alimentos [en línea] <http://web.minsal.cl/reglamento_san_alimentos>[Consulta marzo 2015]

Shojaee-Aliabadi, S., Nikoopour, H., Kobarfard, F., Parsapour, M., Moslehihad, M., Hassanabadi, H., Dahaghin, E. (2013). Acrylamide reduction in potato chips by selection of potato variety grown in Iran and processing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2556-2561.

Stear, C. (1990). Aims and Requirements of the Baking Process *Handbook of Breadmaking Technology* (pp. 539-552): Springer US.

Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R., & Åman, P. (2004). Effects of Asparagine, Fructose, and Baking Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2047-2051.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4998-5006.

Valenzuela, B., & Ronco, A. (2007). Acrilamida en los Alimentos. *Revista chilena de nutrición*, 34, 8-16.

Válidación Métodos Físicoquímicos. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos. Ministerio de Salud México. (2011). [en línea] <<http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/.../cvfq032011.pdf>>[Consulta mayo 2015]

Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G., & Shi, J. (2014). Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 1-12.

Yuan, Y., Shu, C., Zhou, B., Qi, X., & Xiang, J. (2011). Impact of selected additives on acrylamide formation in asparagine/sugar Maillard model systems. *Food Research International*, 44(1), 449-455.

Zhang, Y., Chen, J., Zhang, X., Wu, X., & Zhang, Y. (2006). Addition of Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB) Effectively Reduces Acrylamide Formation in Potato Crisps and French Fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 523-528.

10. ANEXOS

Anexo 1: Ficha de respuesta descripción de pan tipo hallulla. Primera sesión de entrenamiento.

FICHA DESCRIPCIÓN PRODUCTOS

Nombre: _____ Fecha: _____

Set: _____

Por favor describa lo más detalladamente que pueda cada una de las características del alimento. NO COLOQUE PALABRAS como “agradable”, “desagradable”, “bueno” o “malo”.

ATRIBUTO	PRODUCTO	DESCRIPCIÓN
Apariencia	A	
	B	
	C	
	D	
Aroma	A	
	B	
	C	
	D	
Sabor	A	
	B	
	C	
	D	
Textura	A	
	B	
	C	
	D	

Anexo 2: Ficha test descriptivo para pan tipo hallulla. Segunda sesión de entrenamiento.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE PAN TIPO HALLULLA

Nombre:.....

Fecha:..... Muestras:.....

Evalúe las dos muestras que se presentan en todos los descriptores descritos. Apóyese en la **definición** que aparece en esta ficha.

APARIENCIA

Homogeneidad superficie: Apreciación de grietas, arrugas y rugosidad superficial.

Homogénea |-----| Heterogénea

Color corteza: Grado de intensidad del color de la corteza.

Tostado claro |-----| Tostado oscuro

AROMA

Fermentado: Acerque la muestra a la nariz para percibir su aroma. Aroma característico a masa fermentada.

Ausente |-----| Muy marcado

Materia grasa: Acerque la muestra a la nariz para percibir su aroma. Aroma característico a materia grasa.

Ausente |-----| Muy marcado

Tostado: Acerque la muestra a la nariz para percibir su aroma. Aroma característico a pan tostado/quemado.

Poco tostado |-----| Muy tostado

TEXTURA

Al tacto: Coloque el pan entre los dedos y evalúe:

Dureza: Resistencia del pan a la presión ejercida con los dedos.

Blando |-----| Duro

Elasticidad miga: Capacidad del pan para volver a la posición inicial después de la compresión.

_____ |
Poco elástico Muy elástico

Sensación en la boca:

Cohesividad: Grado en que el material se puede deformar antes que se rompa.

_____ |
Poco cohesivo Muy cohesivo

Adhesividad: Análisis después de la compresión entre la lengua y el paladar. Grado en que el producto se adhiere al paladar.

_____ |
Poco adhesivo Muy adhesivo

SABOR: Evalúe la intensidad de los componentes del sabor durante la etapa de masticación.

Ácido: Característico de un pan con un tiempo de fermentación larga en el proceso tecnológico.

_____ |
Poco ácido Muy ácido

Tostado: Sabor que se produce durante el horneado.

_____ |
Ausente Muy marcado

Materia Grasa: Característico de un pan con materia grasa.

_____ |
Ausente Muy marcado

Quemado: Sabor que se produce al exceder tiempo/temperatura de horneado.

_____ |
Nada Muy marcado

Añejo: Sabor que se produce durante almacenamiento prolongado.

_____ |
Nada Muy marcado

SENSACIONES RESIDUALES: Trague la muestra y evalúe la sensación residual.

Sabor residual: sabor que queda después de tragar.

_____ |
Ausente Muy marcado

Comentarios:..... ***¡Muchas Gracias!***

Anexo 3: Resultados cuantificación de acrilamida en pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.

Condiciones experimentales	Promedio concentración de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Pan con 20 ppm enzima / kg de harina	103	10,82	10%
Pan con 50 ppm enzima/ kg de harina	85	10,49	12%
Pan con 75 ppm enzima/ kg de harina	51	6,11	12%
Pan con 100 ppm enzima/ kg de harina	22	1,27	6%
Pan con 150 ppm enzima/ kg de harina	< LOD	--	--
Pan con 300 ppm enzima/ kg de harina	< LOD	--	--

Donde; LOD Límite de Detección y n=3 número de repeticiones.

Anexo 4: Resultados primera sesión de entrenamiento.

DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS

Primera sesión entrenamiento panel sensorial “Pan tipo hallulla”. Donde;

1. Hallulla añejada (24 h) Líder ___**A**
2. Hallulla Laboratorio PUC _____**B**
3. Hallulla especial Líder (del día) ___**C**
4. Hallulla panadería de barrio _____**D**

Atributos	Muestras			
	A	B	C	D
Apariencia	<p>Presencia de Globos Color típico del horneado Tostado uniforme en la corteza superficie, pero poco intenso Forma circular, algo irregular Uniformidad de tamaño entre las muestras Perforaciones desuniformes Volumen adecuado</p>	<p>Presencia de arrugas Falta de brillo Volumen medio Color pálido, tenue Uniformidad de tamaño entre las muestras Desuniformidad de color entre las muestras Superficie harinosa Corteza sin grietas, superficie lisa Perforaciones uniformes Forma circular perfecta Agujeros uniformes y regulares Algo artificial, no natural</p>	<p>Presencia de globos, Volumen uniforme, mucho volumen Color típico de horneado, un poco oscuro en algunas zonas Color tostado prácticamente uniforme en la corteza superior Superficie lisa, uniforme Semicircular Muestras homogéneas</p>	<p>Presencia de arrugas, grietas y globos Un poco tostado (tostado medio), color no informe Algo planos y grandes Forma semicircular, perforaciones uniformes</p>
Aroma	<p>Poco intenso Aroma muy suave a levadura Marcado a materia grasa Leve aroma a pan Algo añejo</p>	<p>Poco intenso Aroma a levadura típico del pan, aroma a fermentación No aroma a tostado</p>	<p>Poco intenso Aroma característico (levadura, materia grasa) Aroma a levadura intermedia sin aroma a tostado Leve aroma a harina</p>	<p>Característico, típico del pan (levadura, materia grasa) Aroma a levadura muy fuerte y aroma a tostado en la corteza</p>

Sabor	Característico, pero poco intenso, falta de sal Algo ácido de sabor residual, sabor a fermentación Leve a materia grasa Algo dulce	Sabor suave y algo graso a manteca Poco salado Poco sabor a materia grasa Leve sabor ácido Sabor suave a levadura, sin sabor residual ácido Levemente dulce	No se siente ácido Poco sabor a grasa Sabor suave más bien dulce A levadura, no existe sabor a tostado, no sabor a fermentando Sabor a leche	Equilibrado a materia grasa, sabor leve a ácido Ligeramente ácido Sabor característico del pan Se siente sabor a materia grasa Sabor a tostado Sabor a levadura Salado y a materia grasa
Textura	Miga algo compacta Un poco dura Seca Miga poco esponjosa más apelmazada Muy elástica, masa no crujiente Corteza delgada, poco firme, miga muy compacta le da dureza al pan, difícil de dirigir No se distingue entre miga y corteza respecto a textura	Esponjosa, Blanda, Suave Corteza blanda, delgada y esponjosa Textura elástica media, no crujiente Firme como estructura Bajo nivel de alveolos Poco crocancia, porque la corteza es muy delgada Miga muy blanda	Suave, esponjosa Corteza más bien blanda, miga muy esponjosa Masa elástica poco crujiente Miga blanda	Corteza más bien dura, masa esponjosa, miga dura Un poco duro Presenta crujencia, masa elástica Típica a este tipo de pan Compacta pero blanda

Anexo 5: Resultados entrenamiento panel sensorial para el test de calidad.

Atributo	Sesiones					
	2	3	4	5	6	7
	Jueces	Jueces	Jueces	Jueces	Jueces	Jueces
Color	SI	NO	NO	SI	NO	NO
Apariencia/ Forma	NO	SI	SI	NO	NO	NO
Aroma	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Sabor	NO	NO	NO	SI	NO	NO
Textura	NO	SI	SI	NO	SI	NO

Donde; SI: presenta diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Anexo 6: Tabla para valoración de calidad con escala Karlsruhe

Tabla de valoración de calidad pan tipo hallulla con escala de Karlsruhe.

Características	Calidad Grado 1: Características Típicas			Calidad Grado 2: Deterioro Tolerable			Calidad Grado 3: Deterioro Indeseable		
	Excelente	Muy Buena	Buena	Satisfactoria	Regular	Suficiente	Defectuosa	Mala	Muy Mala
	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Color	Dorado, natural, típico, tostado, excepcional, uniforme, homogéneo.	Natural, típico, uniforme, levemente tostada, levemente pálida.	Natural, típico, algo pálido u oscuro, aún uniforme y homogéneo.	Ligeramente alterado por ej. Algo claro o algo oscuro, algo desuniforme, poco homogéneo.	Alterado, algo descompensado, muy claro; muy oscuro. Desuniforme no homogéneo.	Muy descompensado. Presencia de manchas.	Demasiado quemado o demasiado pálida, o con apariencia cruda o quemado. Color atípico.	Color totalmente atípico.	Inaceptable, totalmente alterada, atípica.
Apariencia/ Forma	Completamente bien conservada, lisa, plana, redonda, bien cocida, sin arrugas.	Muy bien conservada, algunas unidades ligeramente modificada, aún redondas, sin arrugas y lisa.	Corteza aún conservada, sin grietas, aún redonda, con algo de arrugas o abultado o englobado.	Poco lisa, ligeramente modificada, algunas grietas suaves en la superficie. Forma algo modificada, ovalada no redonda, con arrugas o abultado o englobado.	Presencia de grietas visibles, forma modificada, aplastada, asimétrica, muy abultado o arrugada.	Hundida, agrietada, forma muy modificada. Muchas grietas.	Intensamente hundida, y/o asimétrica, con aberturas.	Muy alterada, apretada, rota, con deformaciones.	Completamente alterada.
Aroma	Muy característico a pan, muy típico, natural, intenso, equilibrado. Aromático. Muy fresco.	Característico, típico y natural, aroma algo leve a levadura.	Característico, típico y natural. Leve aroma a levadura, poco intenso.	Algo plano, no redondeado, no característico, algo intenso a levadura, leve a materia grasa. Algo tostado.	Muy plano, alterado, intenso a levadura, a materia grasa. Algo crudo. Algo intenso a tostado.	Alterado, muy intenso a levadura, intenso a materia grasa. Muy tostado, aún aceptable.	Claramente alterado, atípico, algo ácido.	Alterado, rancio, aroma a masa cruda.	Totalmente deteriorado.
Sabor	Específico, muy característico y natural. Muy equilibrado. Muy fresco. Típico.	Característico, típico y natural, con sabor tostado. Fresco. Típico.	Característico, aún equilibrado. Algo suave. Algo salado o leve falta de sal. Aún típico y natural con menos sabor a tostado.	Ligeramente plano, no redondeado. Aún aceptable. No tan típico. Algo salado, con leve sabor a tostado, leve sabor a materia grasa.	Plano, no redondeado, aún aceptable. Dulce o salado, o sabor a materia grasa.	No típico, insípido, amargo, claramente dañado con intenso sabor a materia grasa. Algo ácido, aún aceptable.	Alterado, completamente atípico. Amargo, ácido, crudo, mohoso.	Alterado, rancio, muy amargo.	Extraño, fermentado. Claramente deteriorado.
Textura	Corteza de dureza y grosor característico. Miga suave y blanda. Muy típica y característica.	Buena, típica, corteza ni blanda ni dura, delgada. Miga suave y blanda, típica característica.	Normal, típica, corteza levemente blanda o dura y algo gruesa. Miga menos suave y menos blanda o levemente áspera y/o seca, algo elástica.	Ligeramente alterada. Corteza algo blanda o algo dura y gruesa. Miga algo áspera.	Desuniforme, corteza dura y muy gruesa. Miga, áspera y/o elástica, textura seca.	Muy desuniforme, corteza dura y demasiado gruesa. Miga muy áspera, seca, muy elástica.	Claramente alterada, corteza muy dura y excesivamente gruesa. Miga excesivamente áspera o muy seca.	Modificada, excesivamente dura, muy elástica o muy húmeda.	Completamente alterada, inaceptable.

Anexo 7: Ficha de respuesta test de calidad para pan tipo hallulla.

TEST DE KARLSRUHE PARA PAN TIPO HALLULLA

Nombre: _____ Fecha: _____

Set : _____

MUESTRA	ATRIBUTO	PUNTAJE	OBSERVACIONES
	COLOR		
	APARIENCIA/FORMA		
	AROMA		
	SABOR		
	TEXTURA		
	COLOR		
	APARIENCIA/FORMA		
	AROMA		
	SABOR		
	TEXTURA		
	COLOR		
	APARIENCIA/FORMA		
	AROMA		
	SABOR		
	TEXTURA		
	COLOR		
	APARIENCIA/FORMA		
	AROMA		
	SABOR		
	TEXTURA		

Anexo 8: Resultados entrenamiento panel sensorial para el perfil descriptivo. Primera parte.

Sesiones	Descriptores	Diferencia significativa jueces (p≤0,05)
2	Homogeneidad superficie	NO
	Color corteza	NO
	Aroma Fermentado	SI
	Aroma Materia Grasa	NO
	Aroma Tostado	NO
	Dureza	SI
	Elasticidad Miga	SI
	Cohesividad	NO
	Adhesividad	NO
	Sabor Ácido	SI
	Sabor Tostado	NO
	Sabor Materia Grasa	NO
	Sabor Quemado	NO
	Sabor Añejo	SI
Sabor residual	SI	
3	Homogeneidad superficie	SI
	Color corteza	SI
	Aroma	NO
	Dureza tacto	NO
	Elasticidad Miga	NO
	Dureza en Boca	NO
	Adhesividad	SI
	Sabor Fermentación/Levadura	NO
	Sabor Tostado/ Quemado	NO
	Sabor Materia Grasa	SI
	Sabor Añejo	NO
	Sabor residual	SI
4	Homogeneidad superficie	NO
	Color corteza	SI
	Aroma Fermentado	NO
	Aroma Materia Grasa	SI
	Aroma Tostado	SI
	Dureza	NO
	Elasticidad Miga	SI
	Cohesividad	SI
	Adhesividad	SI
	Sabor Ácido	NO
	Sabor Tostado	SI
	Sabor Materia Grasa	SI
	Sabor Añejo	SI
	Sabor residual	SI

Donde; SI: presenta diferencias significativas, (p≤0,05).

Anexo 9: Ficha final test descriptivo para pan tipo hallulla.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE PAN TIPO HALLULLA

Nombre:.....

Fecha:.....

Muestras:.....

Evalúe las muestras que se presentan en todos los descriptores descritos. Apóyese en la **definición** que aparece en esta ficha.

APARIENCIA

Color corteza: Grado de intensidad del color de la corteza.

|-----|
Tostado claro Tostado oscuro

AROMA

Fermentado: Acerque la muestra a la nariz para percibir su aroma. Aroma característico de un pan con un tiempo de fermentación larga en el proceso tecnológico.

|-----|
Ausente Muy marcado

Tostado/Quemado: Acerque la muestra a la nariz para percibir su aroma. Aroma característico que se produce durante el horneado.

|-----|
Poco tostado Muy tostado

TEXTURA

Al tacto: Coloque el pan entre los dedos y evalúe:

Dureza: Resistencia del pan a la presión ejercida con los dedos.

|-----|
Blando Duro

Elasticidad miga: Capacidad del pan para volver a la posición inicial después de la compresión.

|-----|
Poco elástico Muy elástico

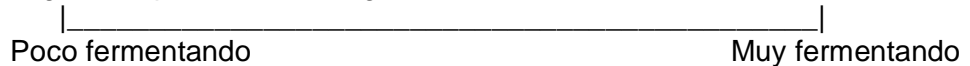
Sensación en la boca: Coloque el pan entre los dientes incisivos, masque completamente, y evalúe:

Dureza: Fuerza requerida para morder a través de la muestra.

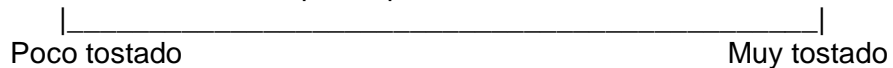


SABOR: Evalúe la intensidad de los componentes del sabor durante la etapa de masticación.

Fermentación/Levadura: Característico de un pan con un tiempo de fermentación larga en el proceso tecnológico.



Tostado/Quemado: Sabor que se produce durante el horneado.



Comentarios:.....

¡Muchas Gracias!

Anexo 10: Resultados ANOVA tres vías para test calidad con 9 jueces.

Atributos	Diferencias significativas (p≤0,05) jueces	Diferencias significativas (p≤0,05) muestras	Diferencias significativas (p≤0,05) sesiones
Color	SI	NO	NO
Apariencia/ Forma	SI	NO	NO
Aroma	SI	NO	NO
Sabor	SI	NO	NO
Textura	NO	NO	NO

Donde; SI: presenta diferencias significativas, (p≤0,05)

Anexo 11: Prueba de múltiples rangos de Tukey (ANOVA tres vías) del test de calidad con 9 jueces.

Multiple Range Tests for Color by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Jueces	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5	9	7,11111	0,203555	X
1	9	7,55556	0,203555	X
2	9	7,66667	0,203555	X
7	9	7,77778	0,203555	XX
6	9	7,88889	0,203555	XX
3	9	7,88889	0,203555	XX
4	9	8,0	0,203555	XX
8	9	8,0	0,203555	XX
9	9	8,66667	0,203555	X

Multiple Range Tests for Apariencia/Forma by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Jueces	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5	9	6,66667	0,205626	X
8	9	7,66667	0,205626	X
3	9	7,66667	0,205626	X
1	9	7,77778	0,205626	X
6	9	7,77778	0,205626	X
4	9	7,88889	0,205626	X
2	9	7,88889	0,205626	X
7	9	8,0	0,205626	X
9	9	8,44444	0,205626	X

Multiple Range Tests for Aroma by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

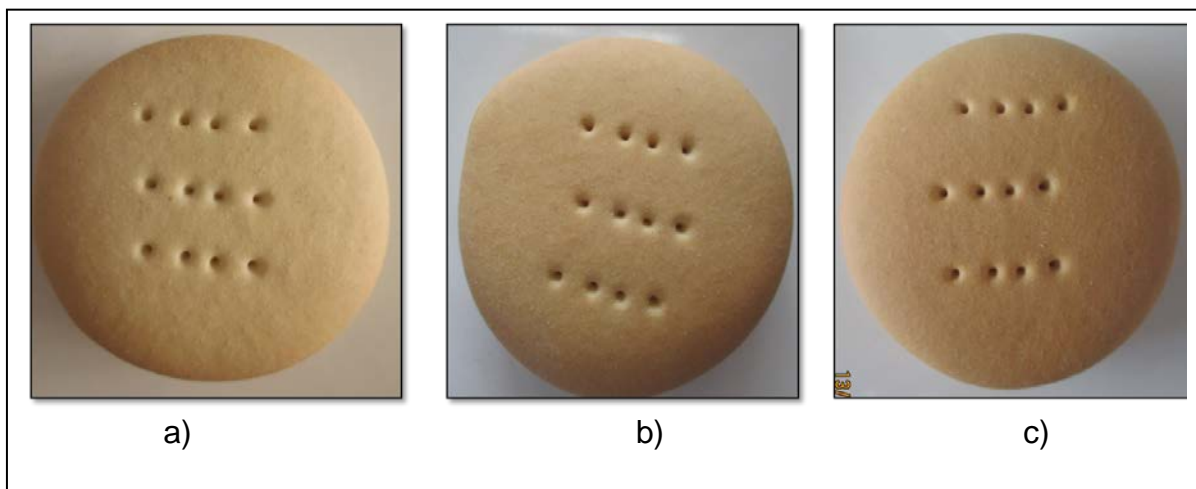
Jueces	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5	9	6,55556	0,265487	X
7	9	7,44444	0,265487	XX
8	9	7,44444	0,265487	XX
3	9	7,55556	0,265487	XX
6	9	7,66667	0,265487	XX
1	9	7,66667	0,265487	XX
9	9	7,66667	0,265487	XX
2	9	8,11111	0,265487	X
4	9	8,33333	0,265487	X

Multiple Range Tests for Sabor by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Jueces	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5	9	6,66667	0,278612	X
1	9	7,22222	0,278612	XX
9	9	7,44444	0,278612	XX
8	9	7,44444	0,278612	XX
7	9	7,55556	0,278612	XX
3	9	7,66667	0,278612	XX
6	9	7,88889	0,278612	XX
4	9	8,0	0,278612	X
2	9	8,0	0,278612	X

Anexo 12: Comparación fotográfica de panes tipo hallulla control y con la adición de enzima asparaginasa.



a) Pan tipo hallulla control (sin enzima asparaginasa). b) Pan tipo hallulla con 300 ppm de enzima asparaginasa/ kg de harina. c) Pan tipo hallulla con 150 ppm de enzima/ kg de harina.

Anexo 13: Resultados ANOVA tres vías para perfil descriptivo con 9 jueces.

Descriptor	Diferencias significativas (p≤0,05) jueces	Diferencias significativas (p≤0,05) muestras	Diferencias significativas (p≤0,05) sesiones
Color corteza	NO	NO	NO
Aroma Fermentado	SI	NO	NO
Aroma Tostado/Quemado	SI	NO	NO
Dureza al Tacto	SI	NO	NO
Elasticidad Miga	SI	NO	SI
Dureza en Boca	SI	NO	SI
Sabor Fermentación / Levadura	NO	NO	NO
Sabor Tostado	SI	NO	SI

Donde; SI: presenta diferencias significativas, (p≤0,05)

Anexo 14: Prueba de múltiples rangos de Tukey (ANOVA tres vías) del perfil descriptivo con 9 jueces.

Multiple Range Tests for Aroma Fermentado by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Jueces</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
9	9	4,74444	0,313086	X
6	9	5,0	0,313086	XX
8	9	5,76667	0,313086	XX
5	9	5,83333	0,313086	XX
1	9	5,83333	0,313086	XX
7	9	5,85556	0,313086	XX
3	9	5,93333	0,313086	XX
2	9	6,12222	0,313086	XX
4	9	6,18889	0,313086	X

Multiple Range Tests for Aroma Tostado/Quemado by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Jueces</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
7	9	4,15556	0,201777	X
4	9	4,37778	0,201777	XX
3	9	4,37778	0,201777	XX
9	9	4,37778	0,201777	XX
1	9	4,42222	0,201777	XX
8	9	4,51111	0,201777	XX
6	9	4,58889	0,201777	XX
2	9	4,9	0,201777	XX
5	9	5,22222	0,201777	X

Multiple Range Tests for Dureza al tacto by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Jueces</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
7	9	2,74444	0,34644	X
9	9	2,96667	0,34644	X
6	9	3,03333	0,34644	X
8	9	3,31111	0,34644	X
1	9	3,58889	0,34644	X
3	9	3,75556	0,34644	X
4	9	3,88889	0,34644	X
2	9	4,22222	0,34644	XX
5	9	5,58889	0,34644	X

Multiple Range Tests for Elasticidad de la miga by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

<i>Jueces</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
6	9	5,76667	0,18789	X
3	9	6,01111	0,18789	XX
8	9	6,05556	0,18789	XX
4	9	6,14444	0,18789	XX
1	9	6,15556	0,18789	XX
7	9	6,22222	0,18789	XX
2	9	6,35556	0,18789	XX
5	9	6,83333	0,18789	X
9	9	6,85556	0,18789	X

Multiple Range Tests for Dureza en boca by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Jueces	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
9	9	3,45556	0,241667	X
8	9	4,02222	0,241667	XX
7	9	4,23333	0,241667	XX
3	9	4,38889	0,241667	XX
2	9	4,44444	0,241667	XX
1	9	4,53333	0,241667	XX
4	9	4,68889	0,241667	X
6	9	4,75556	0,241667	X
5	9	5,93333	0,241667	X

Multiple Range Tests for Sabor tostado/quemado by Jueces

Method: 95,0 percent Tukey HSD

Jueces	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
9	9	4,85556	0,123547	X
3	9	5,17778	0,123547	XX
7	9	5,3	0,123547	XX
6	9	5,31111	0,123547	XX
4	9	5,4	0,123547	XX
8	9	5,48889	0,123547	X
1	9	5,5	0,123547	X
2	9	5,52222	0,123547	X
5	9	6,47778	0,123547	X

Anexo 15: Promedios descriptores del perfil descriptivo para pan tipo hallulla control y pan tipo hallulla con la adición de enzima asparaginasa.

PERFIL DESCRIPTIVO			
Descriptores	Pan control	Pan con 300 ppm de enzima/ kg de harina	Pan con 150 ppm de enzima/ kg de harina
Color corteza	5,6	5,8	5,6
Aroma Fermentado	5,7	5,8	5,9
Aroma Tostado	4,5	4,4	4,5
Dureza al tacto	3,9	4,1	3,1
Elasticidad Miga	6,2	6,1	6,1
Dureza en Boca	4,4	4,5	4,4
Sabor Fermentación/ Levadura	5,6	5,5	5,5
Sabor Tostado	5,4	5,4	5,3