



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESIS DE GRADO PARA LICENCIATURA EN QUÍMICA

Hanseniaspora vineae: Screening de cepas para su
potencial uso en la panificación.

Leandro Acevedo Baranda

Tutor: Dr. Francisco Carrau

Cotutor: Dra. Valentina Martín Russo

Lugar de Realización:

Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Facultad de Química

2024

Contenido

1. Introducción	3
2. Antecedentes	7
3. Objetivos	8
1. Objetivo general	8
2. Objetivos específicos	8
4. Metodología de trabajo	8
Levaduras utilizadas	8
Screening de capacidad de leudado	9
Medición de Compuestos Volátiles en masa fermentada	11
Medición de Compuestos Orgánicos Volátiles en panes fermentados	13
Elaboración de panes y análisis sensorial	14
Elaboración en panetera y Análisis Descriptivo Cualitativo (QDA)	14
Elaboración en panetera y test de preferencia	16
Elaboración estandarizada y test de preferencia	17
Elaboración de panes en Laboratorio de Cereales - FQ y test triangular	19
Resultados y discusión	21
Screening de capacidad de leudado	21
Medición de Compuestos Volátiles	23
Pruebas sensoriales de los panes realizados	34
Análisis descriptivo cualitativo (QDA)	34
Comparación pareada - INIA - 19/4/24	35
Comparación pareada - Sommelier FQ - 9/5/24	36
Test triangular - Sommelier FQ - 13/6/24	37
Conclusiones	37
Bibliografía	39
Anexo	42
Anexo 1 - Boleta de evaluación pan – QDA	42
Anexo 2 - Boleta evaluación pan - Comparación Pareada con Sommelier FQ	44
Anexo 3 - Método de elaboración de panes estandarizados – INIA	45
Anexo 4 - Boleta evaluación pan - Comparación Pareada INIA	49
Anexo 5 - Tablas para establecer diferencia significativa en comparación pareada y test triangular	50
Anexo 6 – Boleta evaluación pan – Prueba triangular	52

1. Introducción

Las levaduras son microorganismos muy importantes en la industria alimentaria ya que son parte clave en la producción de alimentos fermentados como el vino, la cerveza y el pan. En particular, se pueden encontrar evidencias de la elaboración de panes fermentados que se remontan al antiguo Egipto (Lahue et al., 2020). Con el correr de los siglos, la producción de pan se fue perfeccionando, popularizando el oficio de panadero. Estos primeros panaderos utilizaban microorganismos para realizar sus labores sin ser conscientes siquiera de su existencia. No fue hasta los trabajos de L. Pasteur (1860) que se identificó el rol de las levaduras en la fermentación.

La producción de estos panes fermentados dependía de la utilización de lo que hoy conocemos como masa madre. La masa madre es un cultivo de levaduras y bacterias que se realiza mezclando harina y agua y dejando que los microorganismos mencionados, presentes en el ambiente, colonicen dicho medio (Calvert et al. 2021). Otra posibilidad es utilizar en la elaboración una porción de la masa del día anterior, ya colonizado por los microorganismos deseados. En el siglo XIX, con la industrialización y el surgimiento de la microbiología, el proceso de elaboración de pan cambió drásticamente. La posibilidad de aislar cepas únicas, multiplicarlas y obtener una pasta o secarlas para su venta representó un avance significativo (Lahue et al., 2020). El uso de una cepa única (típicamente *S. cerevisiae*) otorga control y reproducibilidad al proceso industrial de producción. (Maicas, 2020; Joseph & Bachhawat, 2014)

Con respecto a los ingredientes utilizados en la elaboración, se suelen diferenciar en esenciales y no esenciales. La fórmula mínima para que un producto sea considerado pan consiste en harina, levadura, sal y agua. Otros ingredientes pueden estar presentes en la fórmula: azúcar, varias preparaciones enzimáticas, surfactantes, oxidantes, grasa y aditivos para proteger contra mohos. Todos estos últimos son los ingredientes no esenciales (Delcour, J.A. et. al. 2010).

En la actualidad existen varios métodos de elaboración de pan, pero dos de los más conocidos y utilizados son el método directo y el método de prefermentación. El método directo es de los más elegidos en investigación por su simplicidad (Luiz, R. et al. 2021). En el método directo, la etapa de fermentación se realiza después de mezclar los

ingredientes; mientras que en el método de prefermentación, parte de los ingredientes se mezcla con la levadura y se deja reposar durante algunas horas para realizar una prefermentación. Después de este período, los ingredientes restantes se mezclan con el resto para producir la masa final y continuar el proceso (Luiz, R. et al. 2021).

La Figura 1 muestra esquemáticamente el proceso de elaboración con el método directo. En el mismo se mezclan los ingredientes, incluida la levadura, y se procede a amasar hasta el grado deseado. Luego comienza un periodo de fermentación en bloque de tiempo variable. Cuando se considere que la primera fermentación está finalizada, se divide la masa en porciones de tamaño deseado y se les da la forma final. Las piezas ya formadas se dejan fermentando en lo que se conoce como segunda fermentación, en donde las piezas vuelven a crecer. Finalmente, cuando alcanzan el tamaño deseado, se hornean (Delcour, J.A. et. al. 2010).

Los términos primera fermentación y segunda fermentación pueden ser confusos. Hay que aclarar que en ambos casos hablamos de una fermentación alcohólica. Los términos primera y segunda se refieren a los dos periodos diferentes en los cuales se deja crecer a la masa.

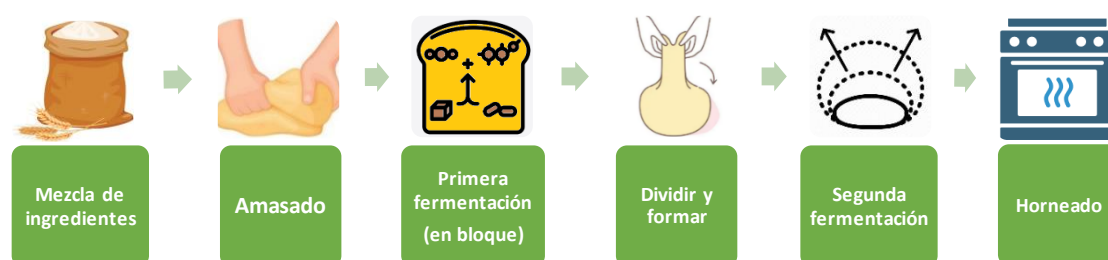


Figura 1 – Etapas en la elaboración de pan por método directo.

La calidad de los productos fermentados, y del pan entre ellos, depende de las materias primas utilizadas, de las condiciones de fermentación y de las cepas de levaduras utilizadas para llevar a cabo el proceso. Las levaduras liberan dióxido de carbono, que provoca el crecimiento del pan, y metabolitos primarios y secundarios que aportan ciertas características particulares a los productos (Zotta, et. al. 2022).

Los metabolitos secundarios (ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, aminoácidos) son particularmente importantes, ya que aseguran la diversidad y singularidad del producto (Zotta, et. al. 2022). Por ende, es importante seleccionar cepas

de levaduras cuyos metabolitos aporten características deseables para el consumidor, que cada vez más busca productos con identidad propia. Esto puede observarse en el auge de aquellas panaderías que ofrecen productos elaborados con masas madre, buscando diferenciarse de la oferta comercial, en donde se utilizan muy pocas cepas, mayoritariamente de *S. cerevisiae*.

Las masas madre generan sabores que dependen de las cepas de levaduras y bacterias que colonicen el medio, factor que depende del ambiente, dándole un carácter regional a los panificados (Arora et al., 2021). Sin embargo, los trabajos con masa madre requieren habilidades para poder conservar la misma y lograr consistencia. Investigaciones sobre la masa madre sugieren que los factores de manejo más influyentes son varios: tipo de harina, hidratación, temperatura, tiempo, las prácticas de alimentación, el entorno, entre otros factores (Arora et al., 2021).

Teniendo esto en cuenta es que se plantea analizar cepas de la levadura no-*Saccharomyces*, *Hanseniaspora vineae* (*H. vineae*), pertenecientes a la colección del Laboratorio de Enología y Biotecnología de las fermentaciones de Facultad de Química, UdelaR, (Enología-FQ) para estudiar su desempeño en la elaboración de pan.

El metabolismo de *H. vineae* es diferente al de *S. cerevisiae* (Carrau, F. et. al. 2023), produciendo un conjunto de metabolitos secundarios que podrían otorgar al pan elaborado con la misma algunas características interesantes. En la Figura 2 se enumeran algunas diferencias entre la levadura *H. vineae* y la *S. cerevisiae*.

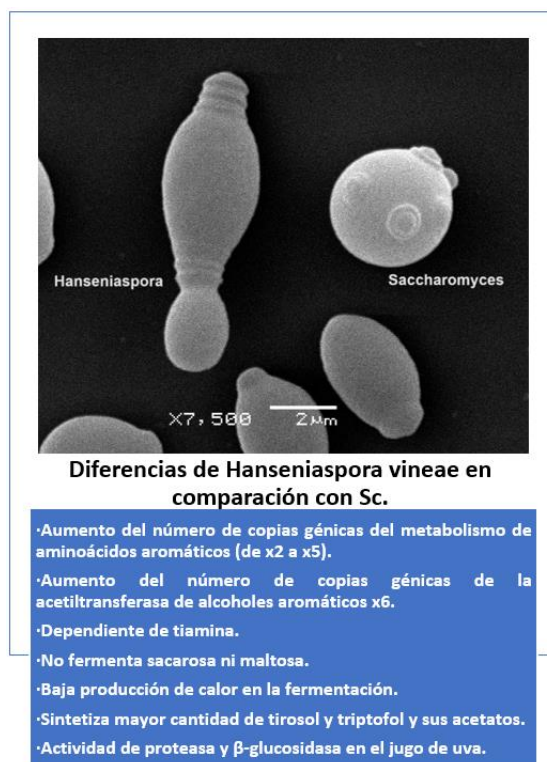


Figura 2 – Diferencias entre *H. vineae* y *S. cerevisiae*. Adaptada de (Carrau, F. et. al. 2023)

Una de las dificultades que presenta el uso de *H. vineae* para panificación es la imposibilidad de fermentar tanto sacarosa como maltosa. Esto hace que sea necesario agregar un jugo de fruta, glucosa o fructosa como ingrediente en los panes que se vayan a elaborar con esta levadura, lo cual implica una desventaja con respecto a *Saccharomyces*.

Por otro lado, la gran producción de metabolitos, como por ejemplo el acetato de 2-feniletilo, representa la principal contribución de *H. vineae* desde el punto de vista de la composición volátil del vino (Martin et al. 2022). Este compuesto se caracteriza por sus notas afrutadas, de miel y florales. El alcohol bencílico, el benzaldehído, el *p*-hidroxibenzaldehído y el alcohol *p*-hidroxibencílico son sintetizados *de novo* en ausencia de precursores derivados de la uva por *H. vineae* (Martin et al. 2016). Los niveles de alcohol bencílico producidos por diferentes cepas de *H. vineae* fueron 20-200 veces más altos que los medidos en fermentaciones con *S. cerevisiae*.

Cepas de dicha especie ya han sido satisfactoriamente utilizadas por el grupo de Enología-FQ en la producción de vinos en cultivos mixtos que resultan en mayor diversidad microbiana en la vinificación e incrementan la complejidad sensorial de los

mismos (Medina, K. et. al. 2013). En este trabajo estudiaremos su desempeño en un medio de fermentación diferente como es el que se encuentra en la elaboración de pan.

2. Antecedentes

El grupo del Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química (UdelaR) ha realizado pruebas con cepas de *H. vineae* en panificación, con resultados auspiciosos.

Más recientemente, en la Universidad Obhiro, Japón, se han aislado cepas de *H. vineae* y probado su capacidad para producir panes (Takaya, et. al. 2019). Se ha reportado el aislamiento de una cepa (TW 15) y la producción de panes con buenas propiedades sensoriales. En dicho estudio observaron que hay diferencias de esta cepa con los panes convencionales. Por ejemplo, los niveles de producción de acetoina por parte de la levadura son mucho más elevados que los producidos por *S. cerevisiae*. Este compuesto es identificado en la bibliografía como responsable de mejorar el perfil aromático, incrementando las notas a manteca o caramelo, que han sido reportados también en los vinos elaborados con esta especie (Valera, et al. 2021). Asimismo, fueron realizadas pruebas de panificación a partir de la cepa de *H. vineae* en combinación con *S. cerevisiae* comercial. Siguiendo el concepto de levaduras amigables de Carrau y Henschke (2021), *H. vineae* podría ser una buena candidata como levadura amigable y permitir el desarrollo de flora nativa presente en los panes, además de las cepas nativas de *S. cerevisiae*, otras especies que aparecen en las masas madre. También se ha reportado en vinos que *H. vineae* estimula el desarrollo de las bacterias lácticas (Medina, K., et al. 2013), las que también juegan un papel importante en las masas madres (Calvert et al., 2021).

En otros estudios, fueron aisladas cepas de otras especies de levaduras no-*Saccharomyces*, como *H. uvarum* (Zotta, T., et. al. 2022), logrando panes con perfiles aromáticos particulares. Aunque en vinos, *H. uvarum* no muestra mucha capacidad fermentativa como *H. vineae*. Se destaca que algunas cepas de *Hanseniaspora* tienen capacidades fermentativas similares a *S. cerevisiae*, además de aportar un perfil aromático distinto (Martin, V., et. al. 2018)

3. Objetivos

1. Objetivo general

Realizar un relevamiento de las capacidades para la panificación de las cepas de *H. vineae* pertenecientes a la colección del Laboratorio de Enología-FQ utilizando como control levaduras de panificación convencional.

2. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de leudado de las distintas cepas.
- Realizar un perfil aromático de las masas fermentadas y de los panes elaborados utilizando GC/MS.
- Realizar pruebas sensoriales de los panes elaborados.

4. Metodología de trabajo

A partir de las cepas de *H. vineae*, con las que cuenta el Laboratorio de Enología-FQ, se realizan pruebas para determinar su potencial uso en panificación. Se compara el desempeño de dichas cepas con un control de *S. cerevisiae* comercial (INSTAFERM® 01 – Lallemand)

Levaduras utilizadas

Las 10 cepas de la especie *H. vineae* pertenecientes a la colección de levaduras de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones fueron recuperadas en placas con medio WLN (WL Nutrient Difco) a 28°C durante 48 hs (Figura 3). Se mantuvieron en placas en heladera hasta su utilización. Los códigos para cada una de las cepas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 - Cepas de *H. vineae* utilizadas

Cepas <i>H. vineae</i>
02-19
11-24
12-219
02-05
11-48
12-151
12-196
02-25
12-111
12-184

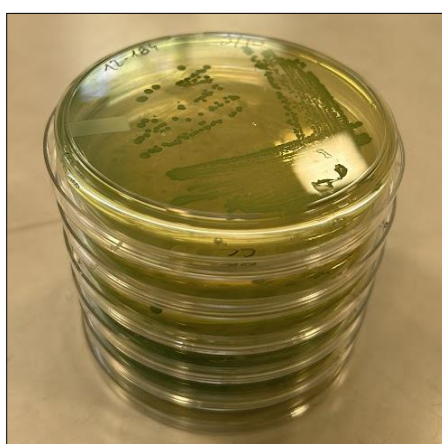


Figura 3 – Placas de cultivo de las cepas a estudiar.

Screening de capacidad de leudado

Con el fin de evaluar la capacidad de leudado de las distintas cepas se llevó a cabo un ensayo de capacidad de leudado según lo trabajado por Zotta (2022).

Para el mismo se realizó un pie de cuba en medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptonas 1%, Glucosa 2%) (100 rpm, 28 °C, 24 h) de las distintas cepas a analizar. Luego se estandarizó su población a 10^7 ufc/mL mediante recuento en cámara de Neubauer. Se inocularon 10 mL/100 g de masa para tener una concentración final de 10^6 ufc/g de masa.

Las masas se prepararon mezclando agua estéril, harina, NaCl (2% m/m) y una mezcla 50:50 de glucosa y fructosa (Figura 4). Se utilizó una masa inoculada con la levadura comercial *S. cerevisiae* como control.

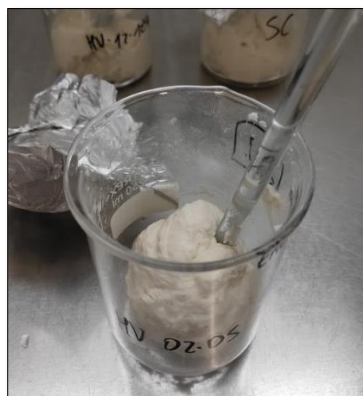


Figura 4- Mezcla de ingredientes para masa modelo.

Las masas modelo se colocaron en placas de Petri (10 g/cada una) (Figura 5) e incubaron a 28 °C durante 24 hs.

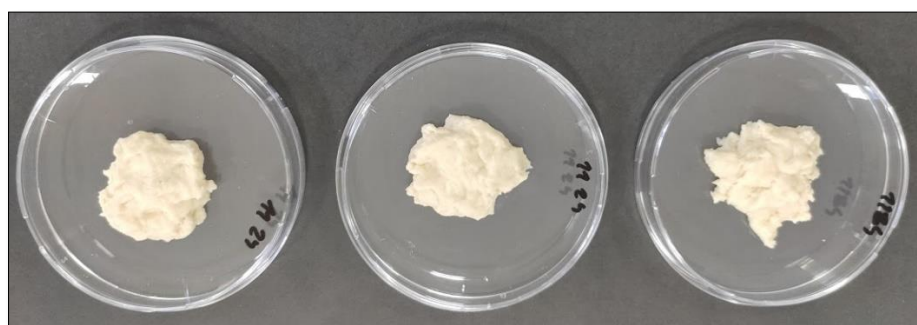


Figura 5 – Masas modelo a tiempo 0 en placas de Petri.

A las 0 hs y 24 hs de incubación, se evaluó la capacidad de leudado fotografiando las placas y midiendo la diferencia en las áreas de la masa con el programa ImageJ (Schneider, C., et. al. 2012). En la Figura 7 podemos apreciar una imagen analizada por dicho programa. El área en rojo es el área de la masa. La primera foto corresponde a la masa recién formada y colocada en la placa, la segunda corresponde a la misma masa luego de 24hs de fermentación.

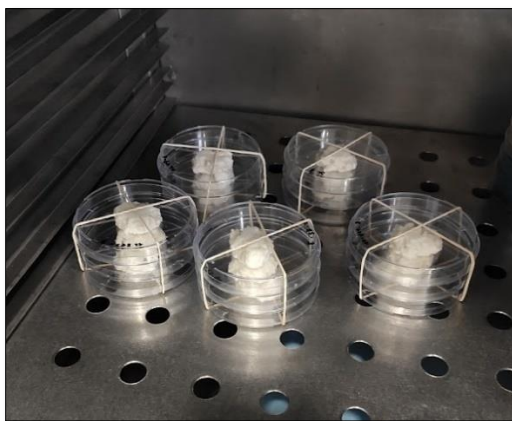


Figura 6 - Placas con masas modelo en incubadora.

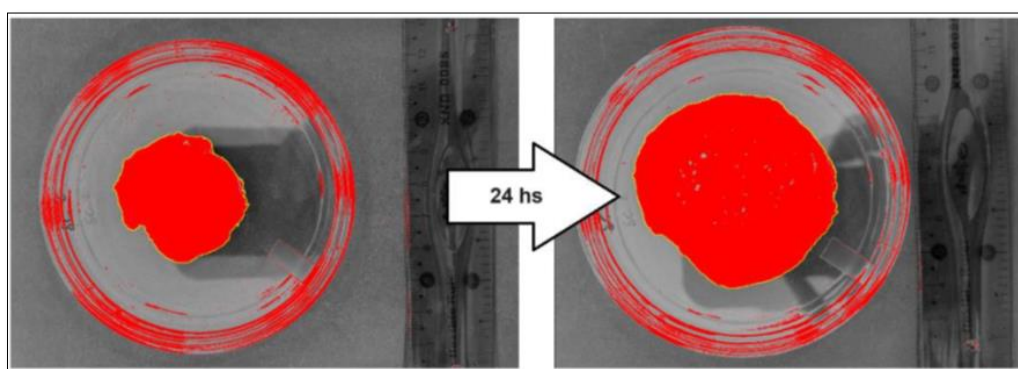


Figura 7 – Análisis de imágenes utilizando ImageJ. Se muestra a la izquierda la masa a tiempo 0 y a la derecha la masa luego de 24 hs.



Figura 8 – Esquema de método para análisis de capacidad de leudado utilizando ImageJ.

Medición de Compuestos Volátiles en masa fermentada.

Las cepas de mejor desempeño, seleccionadas en base al rendimiento en el screening de leudado, fueron evaluadas en su capacidad para afectar el perfil de aroma de las masas después de 24 horas de fermentación según lo trabajado por Reale et al. (2016).

Las masas se prepararon según se describe en el ensayo de leudado y se utilizó la levadura comercial *S. cerevisiae* como control. Un segundo análisis de masas crudas se hizo a partir del pan elaborado en el Laboratorio de Cereales del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Facultad de Química. Luego de la fermentación y previo al formado para la colocación en molde, se le tomaron 3 muestras a la masa utilizando guantes para la toma.

Los compuestos volátiles se extraen de las masas utilizando la Micro extracción en Fase Sólida (SPME) y se analizan con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (SPME/GC-MS) (Figura 10).

Se colocaron 2 g de muestra (masa cruda fermentada) en un vial de 20 mL (Figura 9), y se añadieron 5 μ L de 4-metil-2-pentanol (estándar interno, solución estándar de 100 mg/L).

Previo a la extracción, la muestra se dejó 15 minutos a 40°C para favorecer el pasaje de los compuestos volátiles al espacio cabeza. Luego empieza el periodo de extracción donde se coloca la fibra por 30 minutos a la misma temperatura. ambos procedimientos se realizaron manteniendo una agitación constante de 250 rpm.

Posteriormente, la muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS Shimadzu QP 2020 equipado con una columna DB-WAX (30 m longitud x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m) se trabajó con una energía de ionización de 70 eV y manteniendo la interfase a 200 °C. El programa de temperatura utilizado fue temperatura: 40 °C (8 min) subiendo 3 °C/min hasta 180 °C y posteriormente 5 °C/min hasta 220 °C permaneciendo 10 min, para finalmente subir 20 °C/min hasta 235 °C donde permaneció 5 min. La temperatura del inyector y la interfase se mantuvieron a 240 °C. El detector de masas se programó para realizar un escaneo cada 0,5 segundos del rango de masas de m/z 40 a 350.

La identificación de componentes volátiles se realizó utilizando bases de datos con espectros de referencia.



Figura 9 – Viales con masas fermentadas 24hs previo a análisis de compuestos orgánicos volátiles por GC/MS

Medición de Compuestos Orgánicos Volátiles en panes fermentados

Se elaboraron panes para evaluar el perfil aromático luego del horneado. Los panes se elaboraron con cepas de *H. vineae* seleccionadas en base a los ensayos anteriores y el pan restante se elabora con *S. cerevisiae* como control.

Para realizar la extracción y análisis de compuestos volátiles se utilizó como referencia la técnica reportada por Poinot et al. (2007), que se basa en una extracción en espacio cabeza con una fibra (SPME) y posterior análisis de volátiles por GC-MS (Figura 10).

La muestra se preparó moliendo con una procesadora de cocina la miga de los panes elaborados para el análisis.

Se realizó la extracción en forma automatizada mediante un inyector automático AOAC-6000 Shimadzu. En cada vial con septa se pesaron aproximadamente 2g de muestra (miga de pan triturada) y se agregaron 5 μ L de estándar interno (solución de estándar 0,278g/L de 2-octanol). La extracción se realizó con una fibra de SPME 50/30 mm DVB/C-WR/PDMS Agilent (1 cm).

Previo a la extracción, la muestra se dejó 15 minutos a 50°C para favorecer el pasaje de los compuestos volátiles al espacio cabeza. Luego empieza el periodo de extracción donde se coloca la fibra por 60 minutos a la misma temperatura. Ambos procedimientos se realizaron manteniendo una agitación constante de 250 rpm.

Posteriormente la muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas bajo las mismas condiciones que el ensayo anterior.

La identificación de componentes volátiles se realizó utilizando bases de datos con espectros de referencia y base de datos propia realizada con estándares datos reportados en la literatura.

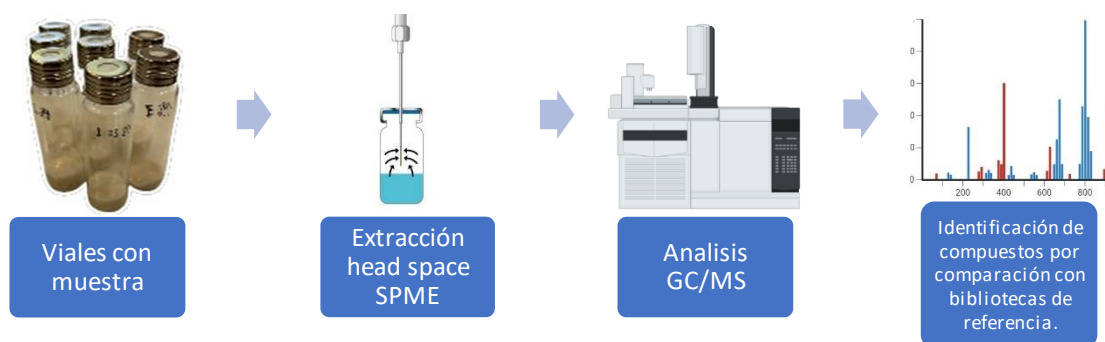


Figura 10 – Esquema de método para análisis de compuestos orgánicos volátiles por GC/MS.



Figura 11 – Viales con muestras de pan previo a análisis de compuestos volátiles por GC/MS.

Elaboración de panes y análisis sensorial

Las cepas que mostraron buena capacidad de leudado y un perfil aromático interesante según las pruebas descritas anteriormente, pasaron a la fase final, que consistió en la elaboración de panes en condiciones estandarizadas. Se utilizaron varias metodologías tanto de elaboración como de análisis sensorial.

Elaboración en panetera y Análisis Descriptivo Cualitativo (QDA)

Las levaduras a utilizar se inocularon en 150 mL de YPD por 24hs a 20°C. Luego de ese tiempo se centrifugó y se suspendió en 30 mL de agua con agregado de calcio para evitar

su floculación. Se calcula la toma de esa solución de levaduras para lograr una población estandarizada (10^7 ufc/mL).

La levadura control (INSTAFERM® 01 – Lallemand) se inoculó directamente en su forma seca junto con los ingredientes previo al amasado.

El amasado y horneado se llevó a cabo en una máquina panetera (Punktal bread maker PK-PA 6301), en el programa número 3. Dicho programa tiene una duración total de elaboración de 6:30 hs. Se estableció el peso del pan a elaborar en 500 g y el color medio.

La receta utilizada para la elaboración de dichos panes fue la siguiente:

Tabla 2 - Receta de pan utilizada para análisis descriptivo Cualitativo.

Harina San Agustín tipo 0	300g
Sal	5g
Glucosa	10g
Fructosa	10g
Agua	175g

Los panes elaborados fueron evaluados mediante panel de jueces semientrenado (16 participantes), formado por integrantes del laboratorio de Análisis Sensorial y el Laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones. Panes elaborados con *S. cerevisiae* fueron elaborados como control. El método utilizado para recabar la información del análisis sensorial fue Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA), en el que personas capacitadas identifican y cuantifican, en orden de ocurrencia, las propiedades sensoriales del producto en escalas continuas de 10 cm (Stone et. al. 1974).

Los participantes recibían una boleta de evaluación (anexo 1) escaneando un código QR.



Figura 12 – Fotos tomadas durante la elaboración y la realización del test sensorial (QDA)

Elaboración en panetera y test de preferencia.

En una segunda elaboración de panes se intentó reducir el tiempo de elaboración de los mismos. Para ellos se cambió la forma de inocular y la cantidad de levadura inoculada.

Los panes se elaboraron a partir de un pie de cuba de la levadura *H. vineae* 12-184. Se inocula un medio YPD con colonias de conservadas en placa de WLN. Se ponen a crecer 24hs a 20°C. Luego se centrifuga el medio para colectar las levaduras obtenidas. Dichas levaduras se utilizan para inocular los panes. La levadura control *S. cerevisiae* se inocula en su forma seca comercial (INSTAFERM® 01 – Lallemand).

El amasado y horneado se llevó a cabo en una máquina panetera (Punktal bread maker PK-PA 6301), en el programa número 4. Dicho programa tiene una duración total de elaboración de 3:10 hs. Se estableció el peso del pan a elaborar en 500g y el color medio.

La receta utilizada para la elaboración de dichos panes fue la siguiente:

Tabla 3 - Receta de pan utilizada en test de preferencia con grupo Sommelier FQ

Harina San Agustín tipo 0	300g
Sal	5g
Glucosa	20g
Agua	175g

Se realizaron dos panes con esta receta. Al pan realizado con *H. vineae* se le inocularon 6g de la levadura centrifugada. El pan elaborado como control se le inocularon 3g de levadura comercial seca.

A los panes así obtenidos se les realizó un test de preferencia (comparación pareada) (Yang, Q., et. al. 2017). Se sirvieron dos muestras de pan marcadas con códigos aleatorios de tres dígitos, y se les pidió a los panelistas que prueben/evalúen dichas muestras, seleccionando cual prefieren.

Se aplicó este test al grupo de 25 estudiantes de la carrera de Sommelier de la Facultad de Química. La boleta que se entregó a los participantes se muestra en el anexo 2.

Elaboración estandarizada y test de preferencia

Una tercera tanda de pruebas sensoriales se llevó a cabo en conjunto con el INIA La Estanzuela. Los panes elaborados en dicho instituto se realizaron de manera estandarizada (AACC International, 2000) a partir del protocolo que se adjunta en el anexo 3. A dicho protocolo se le suma una hora extra de fermentación para adaptarse a los tiempos de leudado de *H. vineae*. Las condiciones de dicha elaboración son más aproximadas a las de una panadería tradicional, en comparación con las primeras elaboraciones en panetera.

Estos panes de molde estandarizados son inoculados unos con la cepa de *H. vineae* seleccionada (Hv12-184) y otros con la cepa de *S. cerevisiae* como control. Las cantidades de levadura inoculadas fueron las siguientes:

- Levadura seca control *S. cerevisiae* (INSTAFERM® 01 – Lallemand) - 1.2g
- Levadura húmeda *H. vineae* Hv12-184 - 4.5g

La levadura húmeda fue preparada inoculando la misma a partir de una placa de WLN, en 150 mL de YPD por 24hs a 20°C. Luego de ese tiempo se centrifugó y se pasó la misma a un tubo falcón esterilizado. Se conservó la misma en heladera hasta su utilización.

Los panes así elaborados fueron evaluados por 23 participantes voluntarios vinculados al INIA. El cuestionario consistió en un test de preferencia (comparación pareada) entre dos muestras de pan que se les brindaron (Yang, Q., et. al. 2017). Los datos sobre preferencia obtenidos fueron analizados con las tablas estadísticas para estimar la significancia en pruebas de preferencia pareada (Roessler et. al, 1978). La ficha suministrada a los participantes y la tabla de significancia se adjuntan en el anexo (Anexo 4 y 5 respectivamente).



Figura 13 – Fotos tomadas durante la realización del test sensorial en conjunto con el INIA.

Elaboración de panes en Laboratorio de Cereales - FQ y test triangular.

Para esta panificación se utilizó el Laboratorio de Cereales de la Facultad de Química. En el mismo se cuenta con un fermentador y un horno de tipo profesional (UNOX - BAKERLUX SHOP.Pro™) (Figura 14).



Figura 14 – Horno (izquierda) y fermentador (derecha) pertenecientes al Laboratorio de Cereales de la Facultad de química, utilizados en la elaboración de panes.

Se realizaron dos panes de molde, uno con *H. vineae* 12-184 y otro con *S. cerevisiae* como control. Las levaduras se prepararon a partir de un pie de cuba. Se inoculan medios YPD con colonias de ambas levaduras conservadas en placa de WLN. Se ponen a crecer 24hs a 20°C. Luego se centrifuga el medio para colectar las levaduras.

La receta utilizada fue la siguiente:

Tabla 4 - Receta de pan utilizada para la elaboración de panes en el laboratorio de cereales de Facultad de Química.

Harina San Agustín tipo 0	400g
Sal	8g
Glucosa	27g
Agua	240g
Levadura centrifugada	11g

El amasado y fermentación se llevó a cabo en máquina panetera (Punktal bread maker PK-PA 6301). Se utilizó un programa manual que consistía en un amasado y un periodo posterior de fermentación con una duración de 1:30 hs. Posteriormente, los panes son formados a mano y colocados en moldes para pasar a una segunda fermentación en el fermentador del Laboratorio de Cereales que se muestra en la figura 14. Esta segunda fermentación fue de 1 hs a 25°C. Finalmente, se hornean los panes a 180°C por 20min

en el horno mostrado en la Figura 14. El programa incluye la incorporación de humedad en los primeros 10 min de horneado y el encendido de los ventiladores en la parte final del mismo.



Figura 15 – Fotos tomadas durante la elaboración de panes en el laboratorio de cereales de Facultad de Química.

Estos panes (Figura 15) fueron utilizados para realizar un test triangular. Se presentan simultáneamente tres muestras, dos de las cuales son idénticas, a cada panelista, quien debe identificar la que es diferente de las otras dos (Sinkinson, C. 2017). La boleta entregada a los participantes se muestra en el anexo 6.

Las tres muestras están marcadas con códigos aleatorios de tres dígitos, y se pide a los panelistas que prueben/evalúen los productos para identificar la muestra diferente.

La interpretación de los resultados se basa en el número mínimo de respuestas correctas requeridas para alcanzar significancia a un nivel de significancia predeterminado, dado el número total de respuestas recibidas (Roessler et. al, 1978) (Anexo 5)

Resultados y discusión

Screening de capacidad de leudado

La capacidad de leudado de las diferentes cepas se muestra en la Tabla 5. Los valores se expresan como porcentaje de crecimiento respecto de la cepa control (*S. cerevisiae*). A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (Figura 17) utilizando el software estadístico Infostat, versión 2020.

Como se puede apreciar en el análisis de varianza, no se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de las primeras cuatro cepas (12-184, 12-111, 02-25, 12-196). Estas cepas son las que muestran un porcentaje de crecimiento más aproximado al de la cepa control. De dichas cepas se seleccionó la 12-196 y 12-184 para futuros estudios. Esto debido a su alto porcentaje de crecimiento en el caso de 12-184 y a la alta formación de fenilpropanoides en el caso 12-196, además de su buena capacidad de leudado.

Tabla 5 - Resultados de análisis de capacidad de leudado para las cepas estudiadas.

Cepa	% crecimiento	ds
02-19	5,5	3,3
11-24	15,7	0,6
12-219	21,4	7,6
02-05	28,2	3,0
11-48	31,3	7,7
12-151	48,5	7,7
12-196	55,7	5,9
02-25	57,7	6,0
12-111	57,9	8,6
12-184	61,1	9,0
Sc	100,0	

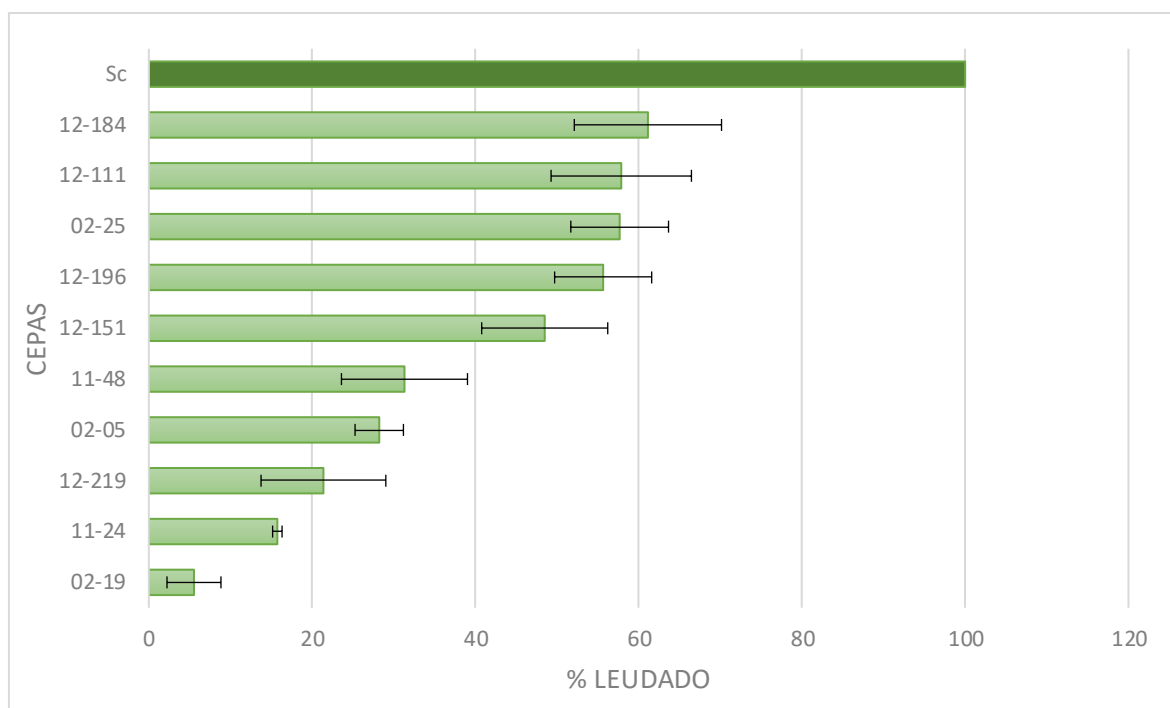


Figura 16 - Resultados de análisis de capacidad de leudado para las cepas estudiadas y su correspondiente error representado como su desviación estándar. El primer valor corresponde al control de *S. cerevisiae* que ofició de referencia en cada ensayo.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
porcentaje leudado	30	0,93	0,90	17,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11112,10	9	1234,68	29,12	<0,0001
cepa	11112,10	9	1234,68	29,12	<0,0001
Error	848,09	20	42,40		
Total	11960,19	29			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=11,09093

Error: 42,4047 gl: 20

cepa	Medias	n	E.E.	
hv 02 19	5,53	3	3,76	A
hv 11 24	15,74	3	3,76	A B
hv 12 219	21,39	3	3,76	B C
hv 02 05	28,23	3	3,76	C
hv 11 48	31,32	3	3,76	C
hv 12 151	48,50	3	3,76	D
hv 12 196	55,65	3	3,76	D E
hv 02 25	57,68	3	3,76	D E
hv 12 111	57,87	3	3,76	D E
hv 12 184	61,14	3	3,76	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 17 – Resultados de análisis de capacidad de leudados tratados con el programa Infostat. Se muestran los resultados del análisis de varianza.

Medición de Compuestos Volátiles

En cuanto a los compuestos aromáticos en masas crudas mostrados en las Tablas 7 y 9, podemos ver la presencia de gran cantidad de alcoholes, siendo el alcohol isoamílico (notas frutales) el que se encuentra en mayor proporción en todas las muestras. Estos valores son similares a los hallados en masas crudas por Zotta, et. al. (2022). El alcohol feniletílico también fue detectado en cantidades significativas en las tres cepas. La levadura que mostró mayor porcentaje de producción de este alcohol fue *S. cerevisiae*, lo cual concuerda por lo trabajado por Martín (2016) en vinos. Sin embargo, en la segunda prueba en masas crudas, esta tendencia se revierte, pasando a ser la *H. vineae* 12-184 la que forma mayor cantidad de alcohol feniletílico. Esto puede deberse a la diferencia en tiempos de fermentación de ambas muestras de masas (las primeras fermentaron durante 24hs y las segundas solo 3hs).

Tanto el alcohol isoamílico como el alcohol feniletílico (alcoholes superiores) son formados por la vía de Ehrlich en levaduras. Esta vía utiliza aminoácidos como precursores para formar dichos alcoholes. El detalle de la vía se puede ver en la Figura 18 (Valera. Et al. 2021).

Dentro de los ésteres que se detectaron podemos resaltar la presencia de acetato de feniletilo, compuesto que fue encontrado solo en muestras de masas fermentadas con la cepa *H. vineae* 12-184, pero no fue encontrado en las cepas del control de *S. cerevisiae*. Mas destacable aun es el hecho de que también se encontró en los panes elaborados, indicando que dicho compuesto no se pierde durante el proceso de horneado. Se puede observar que la cepa Hv 12-184 es la de mayor producción de este éster dentro de las cepas seleccionadas, superando a la cepa Hv 12-196 en la producción de este compuesto en panes elaborados (Figura 18). En la elaboración del pan #2 podemos apreciar una baja sensible en la concentración de este compuesto luego del horneado (Figura 19). También hay una diferencia apreciable en la concentración del éster entre el pan #1 y el pan #2 (Figura 20), diferencia que podría deberse al tiempo de fermentación más prolongado en el pan #1, mostrando una mayor concentración del compuesto. La producción de acetato de feniletilo representa la principal contribución de *H. vineae* desde el punto de vista de la composición volátil en vinos y se caracteriza

por sus notas frutales, de miel y florales. La capacidad de formar este compuesto puede explicarse por el aumento en el número de copias de genes que expresan la enzima alcohol acetiltransferasa presentes en el genoma de *H. vineae* (x6), en comparación con las cepas industriales de *S. cerevisiae* (x2) (Valera, et. al 2024). Esta enzima se encarga de acetilar el alcohol feniletílico.

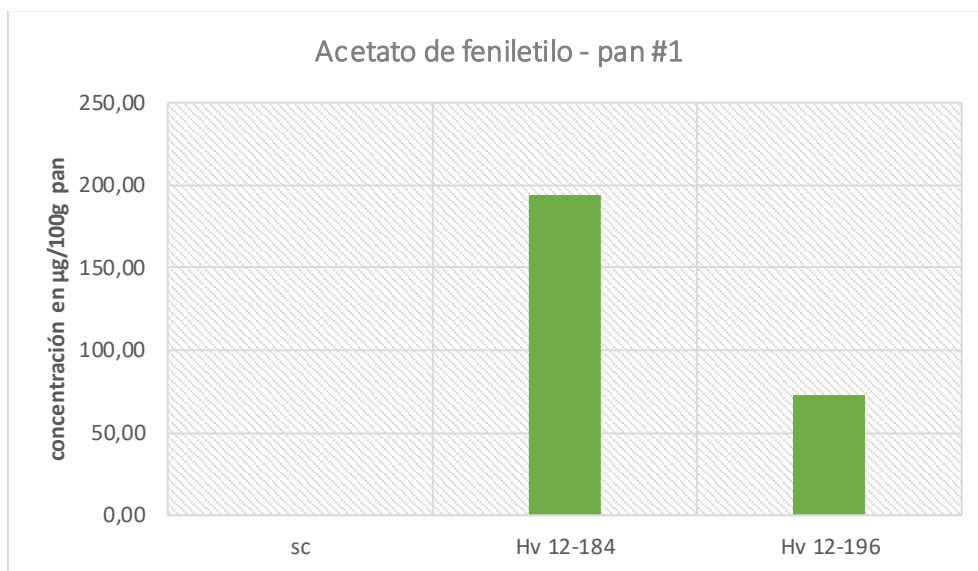


Figura 18 - Concentración de acetato de feniletilo en primera tanda (#1) de panes horneados

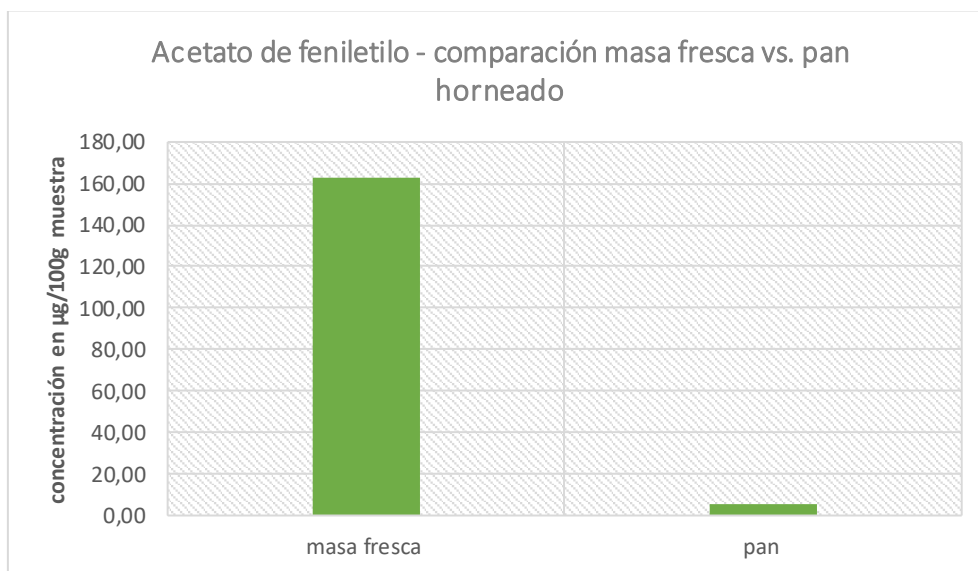


Figura 19 - Comparación de la concentración de acetato de feniletilo entre masa fresca y pan horneado.

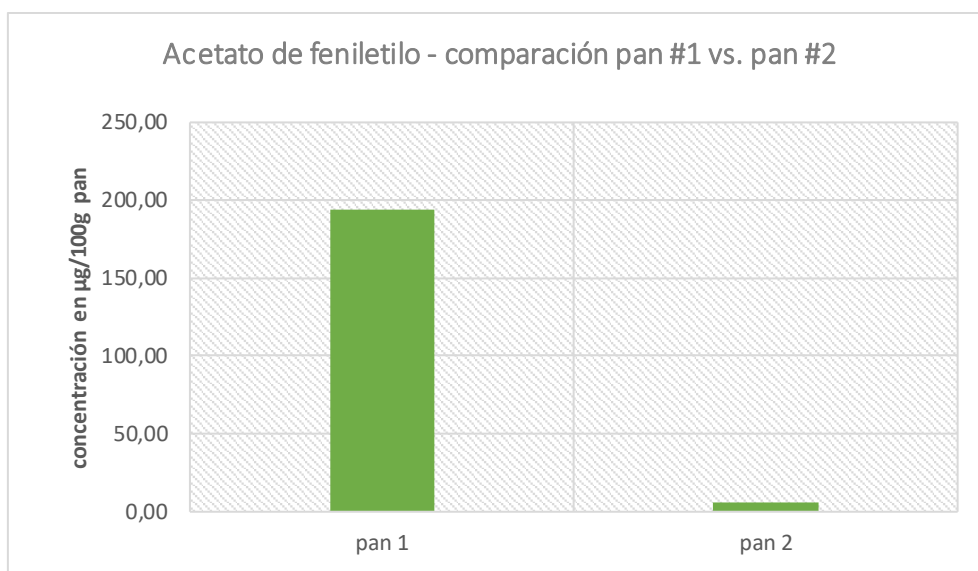


Figura 20 - Comparación de la concentración de acetato de feniletilo entre los panes #1 y #2.

Otros alcoholes y aldehídos encontrados en las muestras, como el isobutanol, el pentanol, metionol o el benzaldehído también pueden ser sintetizados por levaduras utilizando otros aminoácidos como precursores de la vía de Ehrlich (Tabla 6).

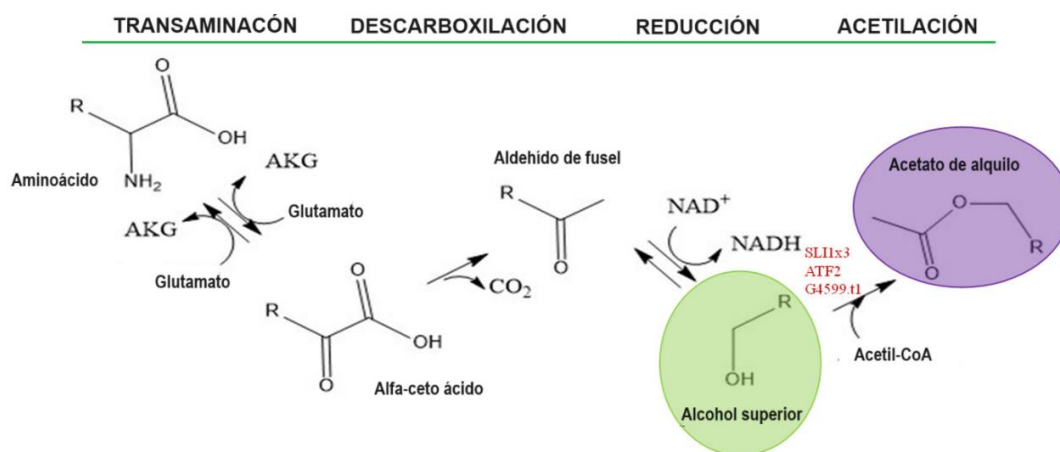


Figura 21 - Biosíntesis de alcoholes superiores y acetatos de alquilo en levaduras mediante la vía de Ehrlich y acetilación de alcoholes superiores. (Imagen adaptada de Valera et. al. 2021).

Tabla 6 - Aldehídos y alcoholes formados durante la fermentación de la masa a partir de los aminoácidos de la harina a través de la vía de Ehrlich. (Adaptado de Birch, et. al 201)

Aminoácidos precursores	Aldehído	Alcohol
Valina	2-metilpropanal	2-metil-1-propanol
Leucina	3-metilbutanal	3-metil-1-butanol
Isoleucina	2-metilbutanal	2-metilbutanol
Metionina	Metional	Metionol Metantio
Fenilalanina	Fenilacetaldehído Benzaldehído	2-Feniletanol Fenilmetanol

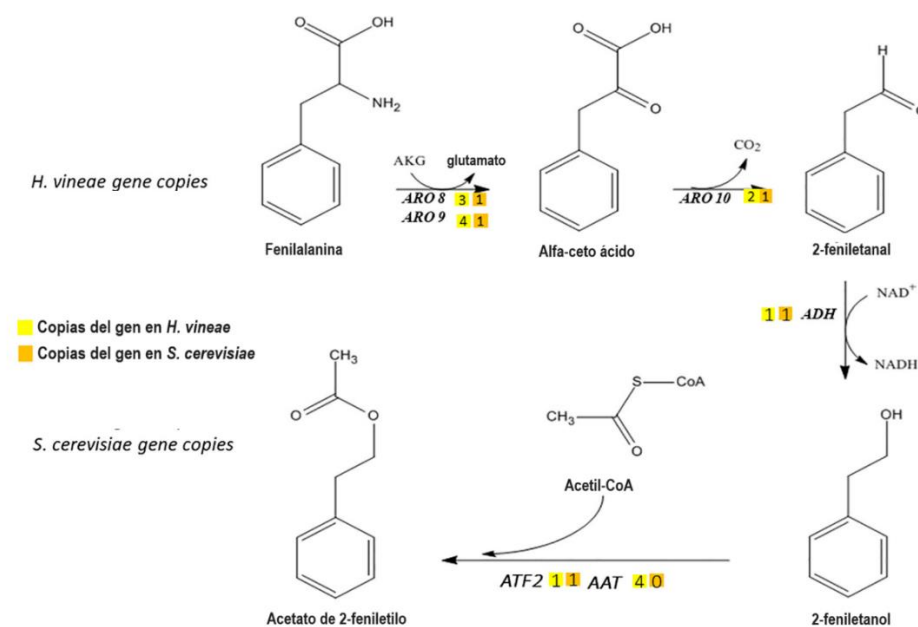


Figura 22 - Biosíntesis de 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo en levaduras. Se especifican los genes involucrados y sus números de copias correspondientes para *H. vineae* (amarillo) y *S. cerevisiae* (naranja) en las diferentes reacciones. (Imagen adaptada de Valera et. al. 2024)

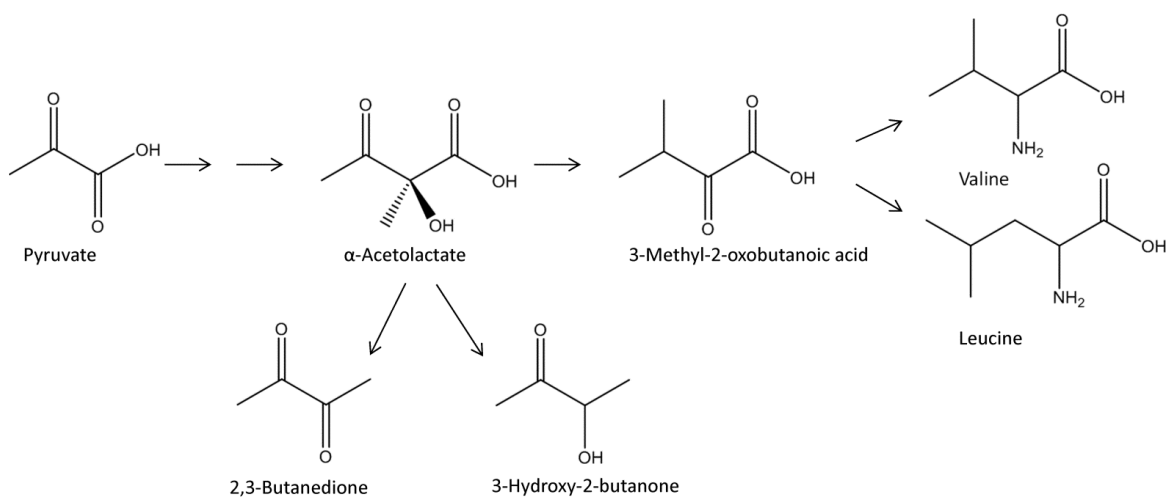


Figura 23 - Origen biosintético del 2,3-butanodiona y 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) fuera de la célula de levadura (Adaptado de Birch, et. al 2014)

La acetoína era otro compuesto de interés, dadas las características deseables que aporta al pan (notas a manteca, crema) (Takaya, M, et. al. 2019). Contrariamente a lo visto por Takaya (2019) para otras cepas de *H. vineae*, los niveles de acetoína fueron significativamente mayores en la levadura comercial de control.

Las cetonas 2,3-butanodiona y 3-hidroxi-2-butanona se producen a partir del α -acetolactato mediante una reacción no enzimática fuera de la levadura (Figura 23). El α -acetolactato se produce como un intermediario en la síntesis de valina y leucina en las levaduras. La 2,3-butanodiona puede ser reabsorbida en la célula de levadura, donde puede ser reducida a 3-hidroxi-2-butanona por la enzima diacetil reductasa. La 2,3-butanodiona no fue detectada en el análisis de compuestos aromáticos, pero si el 2,3-butanodiol, un compuesto que se puede formar a partir de la reducción de la acetoína (Birch, et. al. 2014). Hay que destacar que este último compuesto solo fue encontrado en las cepas control, tanto en panes como en masas.

Otra fuente de compuestos aromáticos es la degradación de ácidos grasos insaturados en la harina de trigo. Estos contribuyen significativamente al aroma del pan (Birch, et. al. 2014). Algunos aldehídos que se forman de esta manera son el 2-nonenal, nonanal, hexanal, heptanal y octanal. Representan una gran parte de los compuestos aromáticos importantes del pan. Estos aldehídos tienen olores a verde, sebo, champiñón y cítrico, y a menudo se les atribuye como desagradables. Estos compuestos se forman principalmente a través de procesos de peroxidación, que pueden ser autooxidativos o enzimáticos. Estos compuestos fueron detectados en el presente trabajo, pero no se presentaron diferencias significativas entre las cepas utilizadas.

También pueden derivar de la degradación de ácidos grasos los furanos. El más activo en aroma en la miga del pan es el 2-pentilfurano, con un olor floral y afrutado. Este compuesto fue detectado en ambas elaboraciones de pan y en todas las cepas trabajadas, incluido el control. Esto es coherente ya que el origen de este compuesto no es la fermentación, sino la degradación de ácidos grasos, por ende, la levadura utilizada no debería causar grandes diferencias en este compuesto. El 2-pentilfurano se forma durante el horneado a partir de (E)-2-nonenal, el producto de oxidación lipídica del ácido linoleico (De Luca, et. al. 2021).

Según Birch (2014), la mayoría de los alcoholes identificados en la miga del pan que no se forman por la fermentación de la levadura se forman por la reducción de aldehídos provenientes de la oxidación de lípidos mediante alcohol deshidrogenasa. De estos alcoholes, el 1-heptanol (olor verde) fue el más influyente en el aroma identificado en la miga del pan. En este trabajo dicho compuesto fue encontrado en cantidades significativamente mayores en masas fermentadas con la cepa de *S. cerevisiae*.

En el análisis de componentes principales para la totalidad de los aromas se realizó con el programa Infostat (Figura 24-27). En el mismo podemos ver que las cepas de *H. vineae* se agrupan y a su vez se separan de la cepa control de *S. cerevisiae*, indicando que sus poseen distintos perfiles aromáticos. Este fenómeno se aprecia en todas las pruebas realizadas para compuestos volátiles, tanto en masas crudas como en los panes elaborados.

Tabla 7 - Aromas encontrados en masas frescas fermentadas agrupados por familias. Se informa el correspondiente error como su desviación estándar. (nota - nd: no detectado.)

concentración en µg/100g de masa			
	SC	HV 12-184	HV 02-05
Aldehídos			
Benzaldehído	33.2 ± 10.3 ^b	7.5 ± 0.3 ^a	4.8 ± 0.6 ^a
Alcoholes			
Alcohol isoamílico	3485.5 ± 525.4 ^b	1306.7 ± 234.3 ^a	2080.7 ± 213.8 ^a
Alcohol bencílico	5.0 ± 1.3 ^a	1.6 ± 2.2 ^a	1.1 ± 0.8 ^a
Alcohol feniletílico	326.1 ± 115.8 ^b	109.4 ± 10.6 ^a	158.6 ± 17.5 ^{ab}
1-Hexanol	332.4 ± 8.2 ^b	221.6 ± 2.0 ^a	401.2 ± 8.5 ^c
1-Octanol	20.6 ± 3.5 ^b	11.1 ± 0.3 ^a	13.9 ± 0.1 ^a
1-Heptanol	80.0 ± 6.9 ^b	56.1 ± 0.3 ^a	58.4 ± 10.7 ^{ab}
1-Nonanol	5.3 ± 0.1 ^a	3.6 ± 0.9 ^a	4.1 ± 0.9 ^a
1-Butanol	6.8 ± 5.7 ^a	nd	nd
1-Pentanol	22.5 ± 12.8 ^a	17.0 ± 7.0 ^a	17.7 ± 0.2 ^a
Isobutanol	543.9 ± 92.0 ^c	106.2 ± 20.4 ^a	337.5 ± 14.6 ^b
3-etoxi-1-propanol	12.6 ± 3.7 ^a	nd	nd
2,3-Butanediol	32.6 ± 15.1 ^a	nd	nd
Ácidos Carboxílicos			
Ácido hexanoico	5.5 ± 1.5 ^a	8.4 ± 5.0 ^a	14.8 ± 1.5 ^a
Ácido nonanoico	nd	2.7 ± 2.4 ^a	nd
Cetonas			
Acetoína	1153.5 ± 35.2 ^b	81.7 ± 7.9 ^a	98.6 ± 5.4 ^a
7-Octen-2-ona	9.4 ± 0.0 ^a	nd	nd
2-metil-1-Hepten-6-ona	nd	nd	5.7 ± 1.1 ^a
Ésteres			
Hexanoato de etilo	17.0 ± 2.7 ^b	2.2 ± 1.6 ^a	nd
Octanoato de etilo	36.8 ± 15.0 ^a	nd	nd

Decanoato de etilo	5.7 ± 1.4 ^a	nd	nd
Acetato de isoamilo	47.2 ± 8.5 ^a	33.0 ± 11.9 ^a	56.5 ± 5.9 ^a
Acetato de hexilo	nd	nd	1.8 ± 0.9 ^a
Acetato de feniletilo	nd	9.6 ± 1.8 ^a	nd
Fenoles			
Guayacol	2.3 ± 0.4 ^a	4.2 ± 1.7 ^a	3.2 ± 0.2 ^a
Otros Compuestos			
Metionol	nd	5.0 ± 0.5 ^a	7.0 ± 0.6 ^b
Decano	207.3 ± 164.3 ^a	217.4 ± 92.5 ^a	84.3 ± 47.5 ^a
Hexadecano	19.4 ± 11.7 ^a	11.9 ± 1.1 ^a	15.4 ± 4.1 ^a

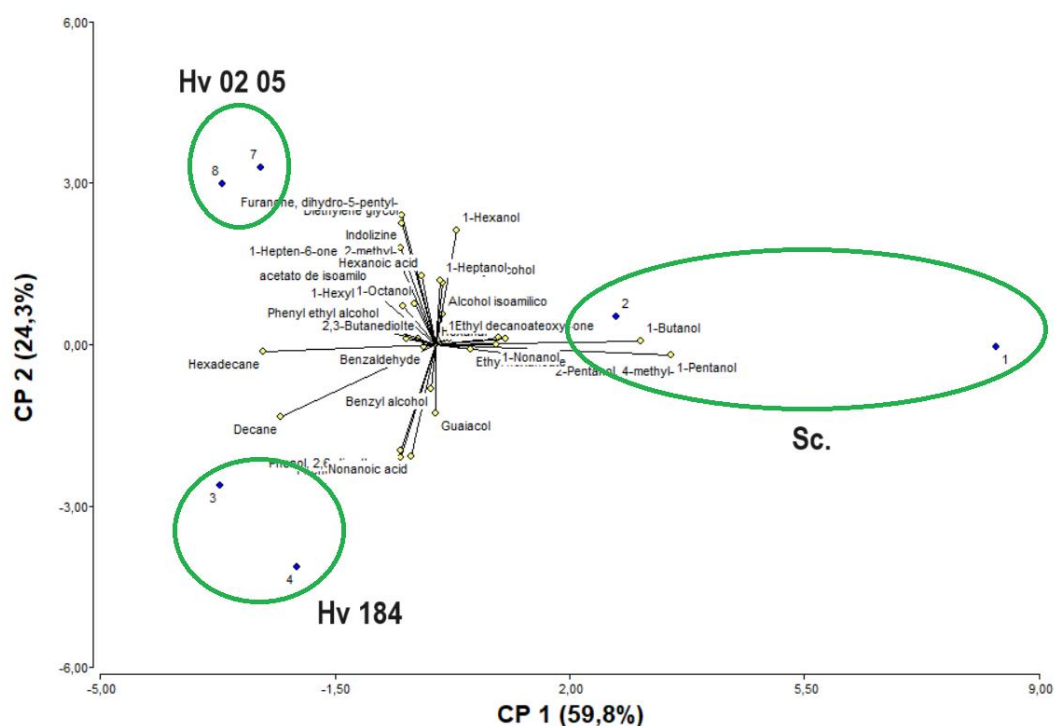


Figura 24 - análisis de componentes principales utilizando los aromas encontrados para las muestras de masas fermentadas.

Tabla 8 - Aromas encontrados en panes elaborados. Se informa el correspondiente error como su desviación estándar. (nota - nd: no detectado.)

	concentración en µg/100g pan		
	SC	HV 12-184	HV 12-196
Aldehídos			
Hexanal	417.6 ± 98.9 ^b	85.7 ± 27.2 ^a	85.6 ± 7.8 ^a
Heptanal	182.3 ± 101.3 ^b	30.7 ± 9.9 ^a	53.5 ± 15.7 ^a
2-Heptenal	132.6 ± 33.8 ^b	46.8 ± 11.0 ^a	26.5 ± 8.1 ^a
Nonanal	30.1 ± 2.0 ^a	31.3 ± 0.2 ^a	57.9 ± 1.6 ^b
Benzaldehído	767.3 ± 180.1 ^b	237.7 ± 61.2 ^a	237.4 ± 32.2 ^a
Alcoholes			
Isobutanol	217.8 ± 62.1 ^b	66.8 ± 32.6 ^a	49.4 ± 29.1 ^a
Alcohol isoamílico	5023.6 ± 1086.5 ^b	1230.6 ± 355.4 ^a	853.1 ± 180.0 ^a
1-Pentanol	30.3 ± 10.9 ^b	10.4 ± 0.1 ^a	9.7 ± 0.6 ^a

Acetoína	1256.4 ± 332.2 ^b	728.7 ± 195.7 ^a	542.7 ± 31.6 ^a
1-Hexanol	565.5 ± 146.0 ^b	189.9 ± 48.9 ^a	176.9 ± 21.6 ^a
2-etil-1-hexanol	119.6 ± 36.9 ^a	104.3 ± 21.9 ^a	nd
1-Octanol	nd	5.9 ± 2.1 ^a	4.3 ± 1.1 ^a
2,3-Butanediol	904.7 ± 306.0 ^a	nd	nd
1,3-Butanediol	247.5 ± 81.5 ^a	nd	nd
Alcohol furfurílico	41.1 ± 0.3 ^b	16.1 ± 0.0 ^a	15.8 ± 0.1 ^a
Alcohol feniletílico	3487.2 ± 972.3 ^b	751.2 ± 223.0 ^a	498.0 ± 36.0 ^a
Ácidos carboxílicos			
Ácido acético	366.3 ± 140.7 ^b	87.4 ± 29.1 ^a	98.6 ± 10.1 ^a
Ácido isobutírico	nd	13.3 ± 2.8 ^a	nd
Ácido hexanoico	170.7 ± 36.1 ^b	62.7 ± 6.1 ^a	47.1 ± 1.5 ^a
Ácido-3-metil-butanoico	36.8 ± 6.4 ^a	nd	nd
Ácido octanoico	14.7 ± 4.2 ^a	10.9 ± 4.4 ^a	nd
Ésteres			
Octanoato de etilo	206.1 ± 55.7 ^b	9.7 ± 3.0 ^a	3.4 ± 1.0 ^a
Acetato de feniletilo	nd	194.4 ± 52.3 ^b	73.1 ± 19.8 ^a
Hidrocarburos			
D-Limoneno	nd	15.3 ± 4.7 ^a	nd
Farnesano	38.9 ± 3.3 ^b	33.8 ± 3.4 ^b	12.3 ± 1.3 ^a
1-Octeno	nd	nd	54.6 ± 6.0 ^a
Furanos			
2-pentil furano	1238.4 ± 91.3 ^c	478.1 ± 59.1 ^b	234.3 ± 82.6 ^a
Otros compuestos			
Gamma nonalactona	58.2 ± 16.9 ^b	7.5 ± 2.9 ^a	nd
Guayacol	nd	10.6 ± 1.1 ^b	3.3 ± 0.1 ^a
Siringol	13.9 ± 1.5 ^a	15.5 ± 7.3 ^a	7.2 ± 2.5 ^a
4-Vinil guayacol	nd	34.8 ± 24.1 ^b	3.7 ± 1.0 ^a

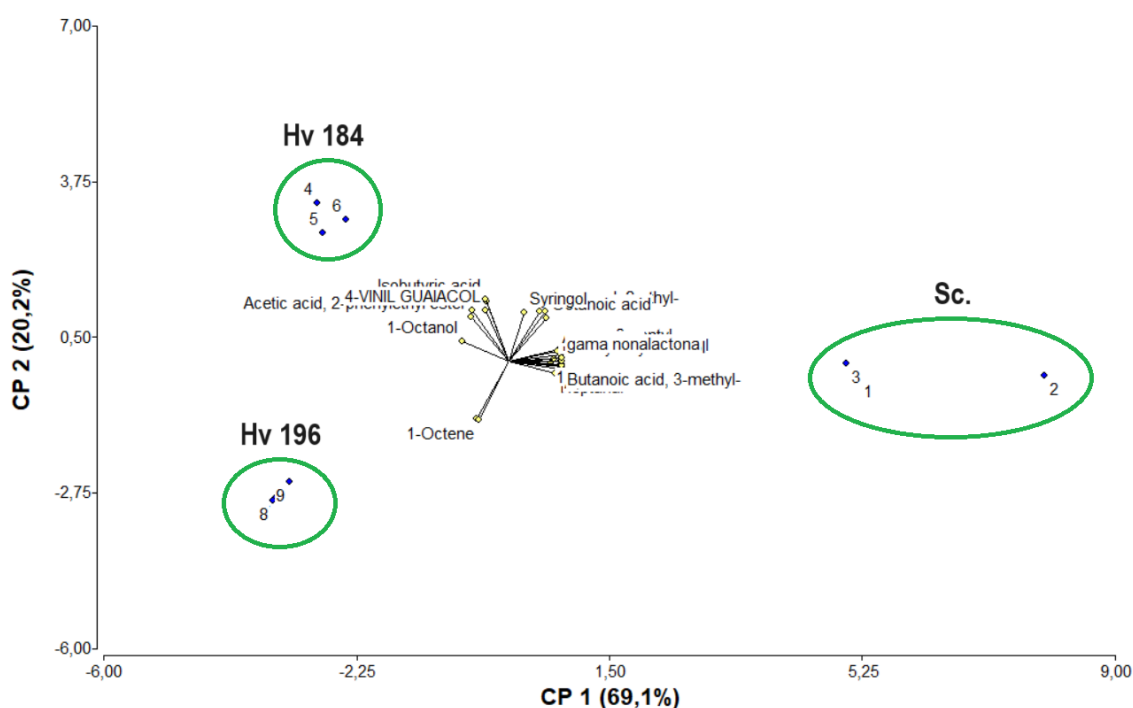


Figura 25 - Análisis de componentes principales utilizando los aromas encontrados para los panes elaborados

Tabla 9 - Aromas encontrados en masas frescas de panes elaborados en Laboratorio de Cereales. Se informa el correspondiente error como su desviación estándar. (nota - nd: no detectado.)

concentración en µg/100g de masa #2		
	SC	HV 12-184
Aldehídos		
Hexanal	364.9 ± 107.1 ^a	184.9 ± 27.9 ^a
Heptanal	31.3 ± 8.7 ^a	nd
Nonanal	16.6 ± 0.8 ^b	12.9 ± 1.2 ^a
2-Heptenal	78.3 ± 20.0 ^a	60.6 ± 3.9 ^a
2-Octenal	83.9 ± 20.9 ^a	69.7 ± 13.2 ^a
Benzaldehído	86.4 ± 17.0 ^a	44.3 ± 8.5 ^a
2-Nonenal	17.4 ± 3.3 ^a	19.2 ± 1.4 ^a
2,4-Decadienal	37.9 ± 8.9 ^a	33.9 ± 9.3 ^a
Alcoholes		
Isobutanol	1373.7 ± 422.6 ^a	1465.0 ± 523.3 ^a
1-Butanol	28.6 ± 0.3 ^a	nd
Alcohol Isoamílico	6294.2 ± 2291.3 ^a	15590.6 ± 6568.5 ^a
1-Hexanol	1296.9 ± 213.8 ^b	724.9 ± 73.3 ^a
1-Octen-3-ol	242.9 ± 68.5 ^a	167.9 ± 4.9 ^a
1-Pentanol	112.8 ± 18.6 ^a	78.0 ± 3.9 ^a
1-Heptanol	360.9 ± 51.5 ^b	230.7 ± 26.2 ^a
2-etil-1-Hexanol	28.9 ± 4.2 ^a	32.0 ± 3.2 ^a
1-Octanol	357.5 ± 82.6 ^a	238.6 ± 56.0 ^a
1-Nonanol	38.3 ± 11.7 ^a	57.8 ± 13.4 ^a
3-Nonen-1-ol	nd	139.1 ± 0.2 ^a
Metionol	nd	23.5 ± 5.6 ^a
Alcohol feniletílico	1013.4 ± 397.3 ^a	3146.4 ± 1182.3 ^a
2,3-Butanediol	250.9 ± 68.9 ^a	nd
Ésteres		
Acetato de isoamilo	153.4 ± 62.5 ^a	1086.8 ± 755.2 ^a
Hexanoato de etilo	144.7 ± 50.6 ^a	nd
Acetato de hexilo	39.1 ± 12.9 ^a	53.3 ± 27.8 ^a
Heptanoato de etilo	25.9 ± 9.3 ^a	18.4 ± 6.6 ^a
Octanoato de etilo	687.0 ± 227.6 ^a	273.2 ± 91.1 ^a
Nonanoato de etilo	12.0 ± 4.2 ^a	nd
Hexadecanoato de etilo	97,15 ± 3,5 ^a	120,28 ± 65,88 ^a
Benzoato de etilo	18.8 ± 3.8 ^a	24.0 ± 2.9 ^a
Acetato de feniletilo	nd	163.1 ± 129.5 ^a
Cetonas		
3-Octanona	64.7 ± 25.3 ^a	37.9 ± 3.1 ^a
Acetoína	3494.7 ± 115.0 ^b	2984.6 ± 62.6 ^a
7-Octen-2-ona	nd	18.6 ± 1.6 ^a
2-Nonanona	nd	11.4 ± 4.2 ^a
Otros		
Nonlactona	71.8 ± 22.7 ^a	nd

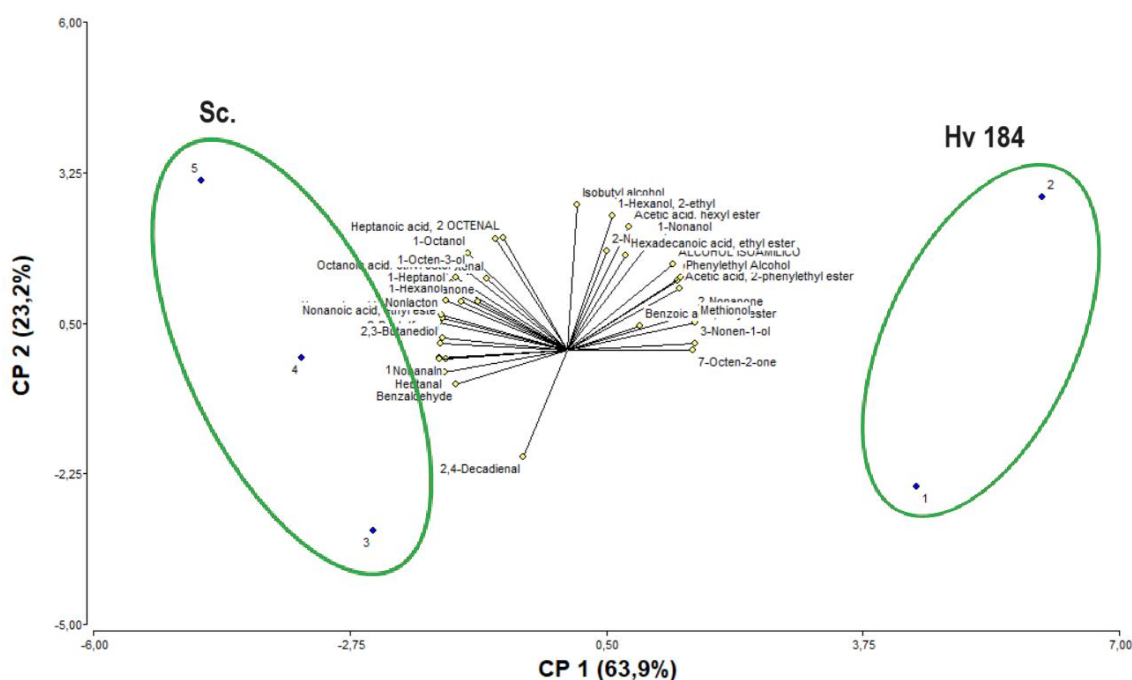


Figura 26 - análisis de componentes principales utilizando los aromas encontrados para las muestras de masas fermentadas de la prueba realizada en Laboratorio de Cereales.

Tabla 10 - Aromas encontrados en panes elaborados en Laboratorio de Cereales. Se informa el correspondiente error como su desviación estándar. (nota - nd: no detectado.)

concentración en µg/100g pan #2		
	SC	HV 12-184
Aldehídos		
Hexanal	24,67 ± 7,41 ^a	20,00 ± 7,42 ^a
Heptanal	4,19 ± 1,76 ^a	2,19 ± 0,84 ^a
Nonanal	3,24 ± 0,79 ^a	4,48 ± 1,63 ^a
Octanal	nd	1,29 ± 0,47 ^a
2-Octenal	4,54 ± 1,05 ^a	3,68 ± 1,50 ^a
2-Nonenal	4,08 ± 1,06 ^a	3,66 ± 1,19 ^a
Benzaldehído	3,22 ± 0,85 ^a	3,17 ± 0,17 ^a
2,4-Decadienal	7,10 ± 1,17 ^a	13,46 ± 4,17 ^a
Alcoholes		
Isobutanol	20,15 ± 6,84 ^a	11,77 ± 2,83 ^a
1-Pentanol	4,00 ± 1,14 ^a	2,16 ± 0,84 ^a
1-Hexanol	35,27 ± 11,27 ^a	20,58 ± 8,51 ^a
2-etil-1-Hexanol	3,17 ± 0,59 ^a	3,49 ± 1,45 ^a
1-Octanol	3,01 ± 0,80 ^a	2,63 ± 0,97 ^a
3-Octen-1-ol	0,45 ± 0,10 ^a	nd
3-Nonen-1-ol	nd	2,00 ± 0,80 ^a
1-Nonanol	0,36 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,20 ^a
Alcohol isoamílico	199,37 ± 21,26 ^b	136,91 ± 1,59 ^a

Alcohol feniletílico	11,88 ± 2,79 ^a	35,70 ± 9,55 ^b
Metionol	0,42 ± 0,15 ^a	0,72 ± 0,19 ^a
3-Decen-1-ol	6,18 ± 1,42 ^a	nd
2,3-Butanodiol	3,74 ± 0,92 ^a	nd
Ésteres		
Acetato de isoamilo	3,08 ± 0,84 ^a	4,69 ± 1,13 ^a
Hexanoato de etilo	3,15 ± 0,14 ^a	2,82 ± 1,23 ^a
Acetato de hexilo	1,74 ± 0,54 ^a	nd
Octanoato de etilo	5,68 ± 1,39 ^b	2,63 ± 0,77 ^a
Acetato de feniletilo	nd	5,60 ± 2,10 ^a
Cetonas		
2-Heptanona	nd	0,51 ± 0,18 ^a
3-Octanona	3,14 ± 1,22 ^a	1,65 ± 0,75 ^a
2-Octanona	2,18 ± 0,57 ^a	1,75 ± 0,97 ^a
7-Octen-2-ona	0,95 ± 0,57 ^a	0,80 ± 0,36 ^a
2-Nonanona	0,59 ± 0,23 ^a	0,28 ± 0,09 ^a
Acetoína	40,58 ± 4,38 ^a	36,15 ± 11,62 ^a
Otros		
2-Pentilfurano	26,05 ± 6,67 ^a	16,19 ± 6,09 ^a
Undecano	13,58 ± 4,70 ^a	11,75 ± 2,65 ^a
D-Limoneno	2,91 ± 2,10 ^a	2,27 ± 0,70 ^a
2-Heptenal	2,87 ± 0,81 ^a	2,33 ± 1,03 ^a

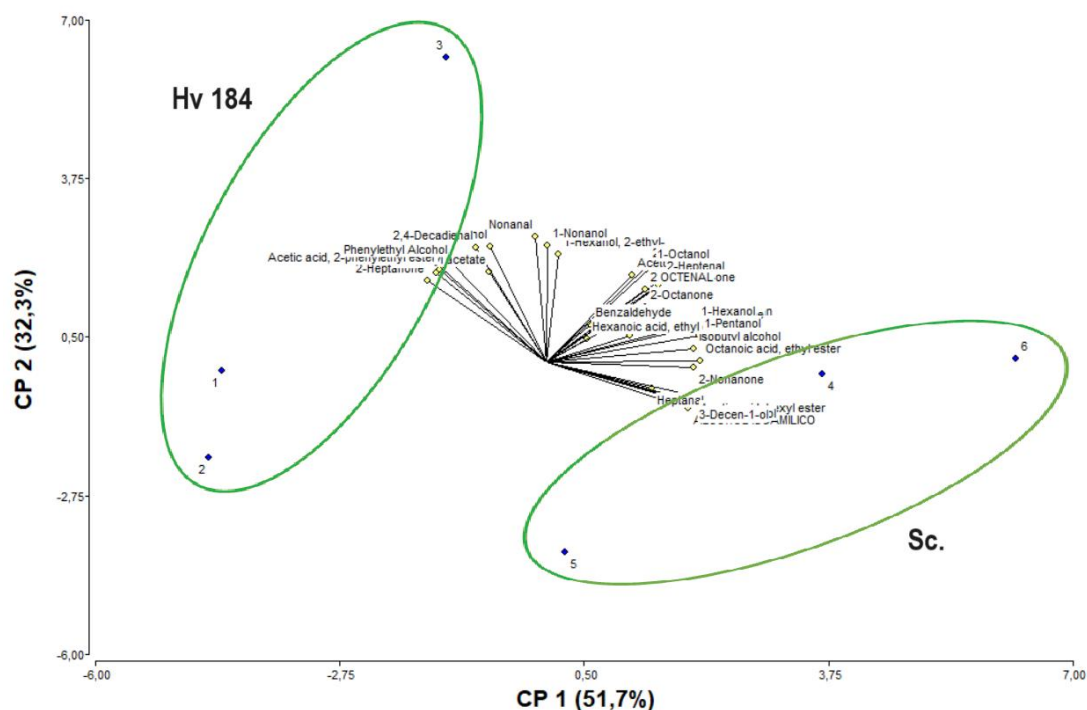


Figura 27 - análisis de componentes principales utilizando los aromas encontrados para las muestras de panes elaborados en Laboratorio de Cereales.

Pruebas sensoriales de los panes realizados

Los resultados del análisis descriptivo cualitativo se muestran en la tabla 11. Se puede apreciar que el único atributo en el cual se aprecian diferencias significativas entre las muestras es en la cantidad de alveolos grandes. Para el resto de los atributos no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Esto nos indica que, a nivel general, los panes elaborados con las cepas de *H. vineae* estuvieron a la altura de los panes elaborados por la cepa control.

La comparación pareada realizada con los panes estandarizados del INIA (tabla 12) arrojó una leve tendencia en las preferencias por la cepa *H. vineae* 12-184. De todos modos, dicha diferencia no es estadísticamente significativa. Uno de los aspectos a resaltar de este análisis es la ausencia de observaciones negativas con respecto a los panes elaborados con las cepas de Hv. Varios participantes dicen no encontrar grandes diferencias en los tres aspectos a analizar (aroma, gusto, aspecto).

La segunda comparación pareada realizada con los estudiantes de Sommelier de FQ (Tabla 13) nos muestra resultados similares a los del INIA. Esta vez hay una leve tendencia en favor de los panes elaborados por la cepa control de *S. cerevisiae*, pero dicha diferencia tampoco resultó estadísticamente significativa.

Por último, el test triangular (Tabla 14), nos muestra que los participantes no pudieron diferenciar la muestra diferente de manera correcta. Esto sugiere que las diferencias entre las muestras no son lo suficientemente notables para la mayoría.

Análisis descriptivo cualitativo (QDA)

Tabla 11 - Resultados de análisis de la varianza para los resultados del análisis descriptivo cualitativo.

Atributos	Sc	Hv 12-184	Hv 12-196	p- valor
Color miga	2,93 ^a	3,83 ^a	4,14 ^a	0,3094
Cant. alveolos grandes	5,74 ^b	2,84 ^a	5,31 ^b	0,002
Sequedad visual	4,09 ^a	3,69 ^a	4,25 ^a	0,7786
Intensidad total de color	4,84 ^a	4,81 ^a	4,67 ^a	0,9792
Olor fresco	5,89 ^a	5,63 ^a	5,63 ^a	0,9419
Olor extraño	1,63 ^a	2,83 ^a	1,79 ^a	0,1379
Suavidad de la miga	5,71 ^a	5,79 ^a	4,02 ^a	0,1636
Humedad de la miga	4,53 ^a	5,29 ^a	3,89 ^a	0,1632
Adhesividad	3,90 ^a	4,48 ^a	3,49 ^a	0,3315
Sequedad bucal	3,80 ^a	4,13 ^a	4,84 ^a	0,4406

Intensidad total de sabor	5,17 ^a	4,49 ^a	4,58 ^a	0,6787
Sabor fresco	5,74 ^a	5,24 ^a	5,68 ^a	0,7764

Comparación pareada - INIA - 19/4/24

538 – 843 HV

522 – 882 SC

	Genero	Edad	Preferencia	Aspecto color	Aroma	Gusto
1	M	60	Hv	Hv	Hv	No dif mejor Hv
2	F	50	Hv	-	-	Hv
3	F	49	Hv	No dif	No dif	Hv
4	F	54	Hv	-	-	Hv
5	F	44	Hv	-	-	-
6	F	55	Hv	Poca dif	Poca dif	Poca dif
7	F	33	Hv	Sc + aireado	-	Sc + gusto lev
8	M	38	Hv	No dif	Sc + tostado	Hv
9	M	44	Hv	No dif	Hv	Hv
10	M	48	Hv	Hv	Hv	-
11	F	29	Sc	Sc	Sc	Sc + sabor
12	F	46	Sc	Sc + esponjoso	Sc + casero	Sc muy bueno
13	F	61	Sc	Sc + esponjoso	Sc	Sc
14	F	33	Sc	Sc + esponjoso	Hv no tiene aroma a pan	No dif
15	F	56	Sc	Sc más dorado y crocante	Similar. Prefiere Sc	Sc gustoso y agradable
16	F	39	Sc	Sc	Sc + suave	Sc mejor textura
17	F	50	Sc	Sc + flexible	Sc + rico	No dif
18	F	49	Sc	Sc esponjoso	Sc	Sc
19	F	25	Sc	Sc	Hv	Sc
20	M	60	Sc	Hv + aireado	-	No grandes dif Prefiere Hv
21	F	42	Sc	Sc + esponjosa	Hv	Sc + acido Hv neutro
22	M	39	Sc	Sc + claro	Sc mejor	-

23	M	62	Hv	-	Hv	Hv
24	F	22	Hv	Sc	Hv	Hv
25	F	38	Hv	No dif	-	HV
26	F	57	Hv	Hv	Sc	Hv + rica

Tabla 12 - Resultados del test de comparación pareada realizado en el INIA.

Total muestra	26	
Preferencia HV	14	
Preferencia SAC	12	
Aspecto	4 Hv	13 Sc
Aroma	7 Hv	8 Sc
Gusto	9 Hv	7 Sc

Comparación pareada - Sommelier FQ - 9/5/24

538 – 843 HV

522 – 882 SC

	Genero	Edad	Preferencia aroma	Preferencia gusto	Observaciones
1	F	44	Hv	Hv	
2	M	62	Hv	Hv	
3	F	22	Hv	Hv	
4	F	41	Hv	Hv	
5	M	25	Hv	Sc	Hv mejor aroma a pan
6	F	26	Hv	Sc	
7	M	35	Hv	Sc	
8	F	21	Hv	Sc	
9	F	34	Hv	Sc	
10	F	25	Sc	Hv	
11	M	23	Sc	Hv	
12	M	23	Sc	Hv	
13	M	20	Sc	Hv	
14	F	31	Sc	Hv	Vincula Hv con masa madre
15	M	65	Sc	Sc	Sc + "lácteo"
16	M	29	Sc	Sc	
17	M	26	Sc	Sc	
18	F	28	Sc	Sc	
19	F	58	Sc	Sc	
20	M	37	Sc	Sc	
21	M	38	Sc	Sc	
22	M	27	Sc	Sc	
23	M	56	Sc	Sc	
24	M	62	Sc	Sc	
25	F	52	Sc	Hv	

Tabla 13 - Resultados del test de comparación pareada realizado con grupo de Sommelier-FQ.

Total muestra	25	
Preferencia gusto	10 Hv	15 Sc
Preferencia aroma	9 Hv	16 Sc

Test triangular - Sommelier FQ - 13/6/24

Tabla 14 - Resultados del test triangular realizado con grupo Sommelier-FQ

Identifican en las 2 series	3
Identifican en 1 serie	2
Identifican incorrectamente la diferente	8
Total de la muestra	13

Conclusiones

Se pudieron seleccionar algunas cepas de la colección con mejor capacidad de leudado para estudiar su desempeño en panificación. Las cepas seleccionadas para su estudio mostraron un porcentaje de crecimiento aceptable comparado con la cepa control de Sc, y duplicó su capacidad de leudado con respecto a la cepa de vino Hv 02-05, actualmente comercial.

Los panes elaborados con las cepas seleccionadas mostraron un perfil aromático característico, resaltando la presencia de compuestos como el acetato de 2-feniletilo en los panes realizados con *H. vineae* 12-184. Dicho compuesto aporta características deseables al pan elaborado, logrando concentraciones significativas con respecto a su ausencia en los panes elaborados con *Saccharomyces*. Es de destacar la constatación de que dicho compuesto logra llegar al producto final, no perdiéndose durante el horneado.

Como era predecible, las masas frescas contienen mayor cantidad de aromas, y estos análisis permiten detectar los compuestos que disminuyen su concentración por el horneado. Este trabajo abre interrogantes como la perspectiva de alargar los tiempos de fermentación antes del horneado y como podrían cambiar sustancialmente las concentraciones de aromas en la masa fresca y luego del horneado.

Las pruebas sensoriales realizadas parecen indicar que no se encuentran diferencias significativas entre los panes elaborados por las cepas control y las cepas seleccionadas. Las cepas en estudio lograron estar a la par de los panes elaborados con cepas tradicionales de panificación, lo cual es un buen primer indicio. En ninguna de las pruebas se asociaron los panes elaborados con atributos negativos. Es más, buena parte de los participantes prefirieron el producto elaborado con las cepas seleccionadas.

Se necesitan más pruebas para ver el efecto de otros posibles ingredientes en la receta del pan y su efecto en el perfil aromático y la capacidad de leudado de las cepas estudiadas. También una posible cofermentación con *S. cerevisiae* podría resultar en mejores desempeños, tanto en leudado como en mejora de sabor y aroma del pan elaborado. Esta cofermentación es auspiciosa ya que ambas levaduras han demostrado poder trabajar en conjunto en medios como el mosto de vino (Medina et al., 2013) (Lleixà et al., 2016). Con este trabajo en conjunto se podría complementar el menor desempeño de *H. vineae* para leudar la masa, mientras que esta última haría sus aportes al sabor y aroma del producto final.

Bibliografía

- AACC International. (2000). *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists* (10th ed., Method 10-10B). St. Paul, MN: The Association.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71-83.
- Birch, A. N., Petersen, M. A., & Hansen, A. S. (2014). Aroma of wheat bread crumb. *Cereal Chemistry*, 91(2), 105-114.
- Calvert, M. D., Madden, A. A., Nichols, L. M., Haddad, N. M., Lahne, J., Dunn, R. R., & McKenney, E. A. (2021). A review of sourdough starters: Ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ*, 9, e11389.
- Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J., & Sicard, D. (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, 35(11), 591-603.
- Carrau, F., Dellacassa, E., Boido, E., Medina, K., Valera, M. J., Fariña, L., Pérez, G., Martin, V., Alvarez-Valin, F., & Balestrazzi, L. (2023). Biology and physiology of *Hanseniaspora vineae*: Metabolic diversity and increased flavour complexity for food fermentation. *FEMS Yeast Research*, 23, foad010.
- Carrau, F., & Henschke, P. A. (2021). *Hanseniaspora vineae* and the concept of friendly yeasts to increase autochthonous wine flavor diversity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 702093.
- De Luca, L., Aiello, A., Pizzolongo, F., Blaiotta, G., Aponte, M., & Romano, R. (2021). Volatile organic compounds in breads prepared with different sourdoughs. *Applied Sciences*, 11, 1330.
- Delcour, J. A., & Hoskeney, R. C. (2010). Yeast-leavened products. In AACC International Inc. (Ed.), *Principles of cereal science and technology* (3rd ed., pp. 151-177). Eagan, MN: AACC International.
- Joseph, R., & Bachhawat, A. K. (2014). Yeasts: Production and commercial uses. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology* (2nd ed., pp. 823-830). Academic Press.
- Lahue, C., Madden, A. A., Dunn, R. R., & Smukowski Heil, C. (2020). History and domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in bread baking. *Frontiers in Genetics*, 11, 584718.

- Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M. del C., Carrau, F., Beltrán, G., & Mas, A. (2016). Comparison of fermentation and wines produced by inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 338.
- Luiz, R. O., & Vanin, F. M. (2021). Effect of straight dough vs pre-fermented dough method on composite wheat breads characteristics. *Food Science and Technology*, 2061, 1–7.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142.
- Martín, V., Giorrello, F., Fariña, L., Minteguiaga, M., Salzman, V., Boido, E., Aguilar, P. S., Gaggero, C., Dellacassa, E., Mas, A., & Carrau, F. (2016). De novo synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4574–4583.
- Martín, V.; Valera, M.J.; Medina, K.; Boido, E.; Carrau, F (2018). Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines—A Review. *Fermentation*, 4, 76.
- Martín, V., Valera, M. J., Medina, K., Dellacassa, E., Schneider, R., Boido, E., & Carrau, F. (2022). Application of *Hanseniaspora vineae* to improve white wine quality. In A. Morata (Ed.), *White wine technology* (pp. 99–115). Academic Press.
- Martín, V. (2016). *Hanseniaspora vineae: Caracterización y su uso en la vinificación* (Tesis de doctorado). Universidad de la República y Universitat Rovira i Virgili, Facultad de Ciencias y Facultat de Enologia.
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141(3), 2513–2521.
- Pasteur, L. (1860). Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Annales de Chimie et de Physique*, 58, 323–426.
- Poinot, P., Grua-Priol, J., Arvisenet, G., Rannou, C., Semenou, M., Le Bail, A., & Prost, C. (2007). Optimisation of HS-SPME to study representativeness of partially baked bread odorant extracts. *Food Research International*, 40, 1170–1184.
- Reale, A., Di Renzo, T., Zotta, T., Preziuso, M., Boscaino, F., Ianniello, R., Storti, L. V., Tremonte, P., & Coppola, R. (2016). Effect of respirative cultures of *Lactobacillus casei* on model sourdough fermentation. *Food Science and Technology*, 73, 622–629.

- Roessler, E. B., Pangborn, R. M., Sidel, J. L., & Stone, H. (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. *Journal of Food Science*, 43, 940-947.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675.
- Sinkinson, C. (2017). Triangle test. In C. Sinkinson (Ed.), *Discrimination testing in sensory science* (pp. 153-170). Woodhead Publishing.
- Stone, H., Sidel, J. L., Oliver, S. L., Woolsey, A., & Singleton, R. C. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, 28(1), 24–33.
- Takaya, M., Ohwada, T., & Oda, Y. (2019). Characterization of the yeast *Hanseniaspora vineae* isolated from the wine grape 'Yamasachi' and its use for bread making. *Food Science and Technology Research*, 25(6), 835-842.
- Valera, M. J., Olivera, V., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2021). Wine aroma characterization of the two main fermentation yeast species of the apiculate genus *Hanseniaspora*. *Fermentation*, 7, 162.
- Valera, M. J., Olivera, V., Pérez, G., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2024). Impact of phenylalanine on *Hanseniaspora vineae* aroma metabolism during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 415.
- Yang, Q., & Ng, M. L. (2017). Paired comparison/directional difference test/2-alternative forced choice (2-AFC) test, simple difference test/same-different test. In Q. Yang & M. L. Ng (Eds.), *Discrimination testing in sensory science: A practical handbook* (pp. 109–134). Elsevier.
- Zotta, T., Di Renzo, T., Sorrentino, A., Reale, A., & Boscaino, F. (2022). Selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of leavened doughs. *Microorganisms*, 10(1849).

Anexo

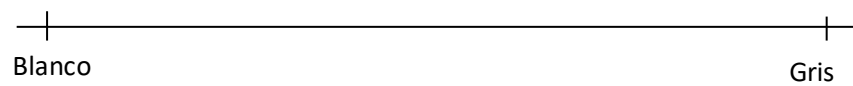
Anexo 1 - Boleta de evaluación pan – QDA

Nombre:

Fecha:

1. Apariencia de la rebanada

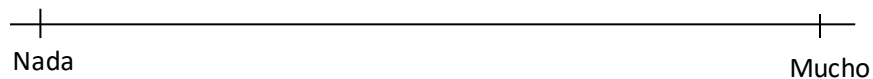
COLOR DE LA MIGA:



CANTIDAD DE ALVÉOLOS GRANDES:

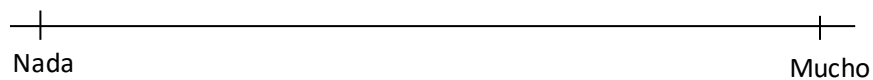


SEQUEDAD VISUAL:

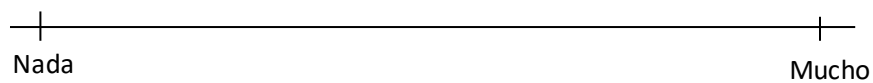


2. Olor

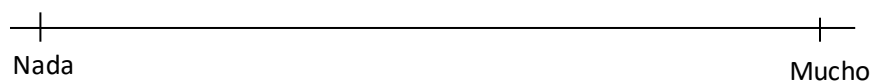
INTENSIDAD TOTAL DE COLOR:



OLOR FRESCO:



OLOR EXTRAÑO:



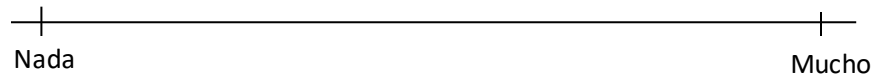
3. Textura manual

SUAVIDAD DE LA MIGA:

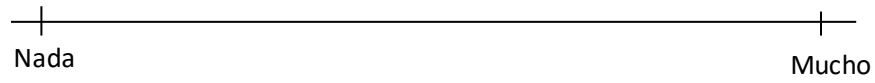


4. Textura bucal

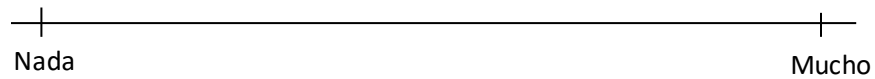
HUMEDAD



ADHESIVIDAD:

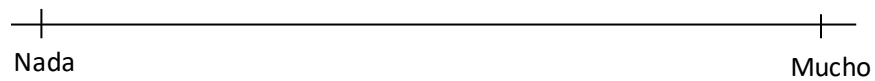


SEQUEDAD:

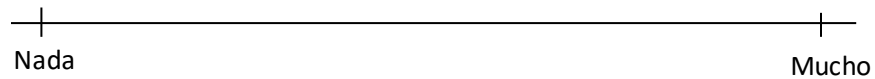


5. SABOR

INTENSIDAD TOTAL DE SABOR:



SABOR FRESCO:



Anexo 2 - Boleta evaluación pan - Comparación Pareada con Sommelier FQ

Nombre: _____

Fecha: __/__/__

Instrucciones:

- Usted recibirá dos muestras de panes.
 - Aprecie si se ven diferencias en textura y color.
 - Luego de probar la primera, aroma y boca, y antes de pasar a la segunda muestra, enjuáguese la boca con agua.
-
- Anote en la casilla correspondiente el código de la muestra que más **prefiere** por textura, aroma y gusto, es la No.....

Otras características que usted percibe en las diferencias entre las muestras:

Aspecto y Color:

.....

Aroma:

.....

Gusto:

.....

Gracias por su colaboración.

Anexo 3 - Método de elaboración de panes estandarizados – INIA

Tipo de Documento:	MÉTODO DE ENSAYO	
Código:	ME-LE-gr- 22	Versión N°: 01
Título:	Pan de Molde	

1. Alcance

Este método proporciona una prueba optimizada de horneado de pan para evaluar la calidad de la harina de trigo. El método se aplica para determinar el efecto del medio ambiente, la variedad, la proteína de la harina de trigo y otros componentes.

2. Tipo de ítem a ensayar (matriz)

Harina de Trigo

3. Parámetros y magnitudes a determinar

Volumen en [cm³](#)

4. Aparatos, equipos y requisitos técnicos**4.1. Equipos e Instrumental**

Probeta de 100ml.

Frascos plásticos, recipientes rotulados y moldes para hornear.

Tablas de cortar, cuchillo.

Jarra 2l.

Recipiente de acero inoxidable de 2 L.

Balanza de precisión de 0.01 g.

Amasadora 100-200g serie N° 45944 (National Manufacturing Division of TMCO 507 "J").

Cámara de fermentación modelo 505-SS-2/3. (National Manufacturing Division of TMCO 507 "J").

Rodillos para sobar y moldear ("Sheeter And 3 Roll Molder" de National Manufacturing Division of TMCO 507 "J"). Los rodillos para sobar deben tener topes a 11/32", 3/16" y 1/8". El moldeador debe tener los topes de la masa a 12cm de distancia.

Horno Giratorio serie N° 4599 0701 modelo 26" (National Manufacturing Division of TMCO 507 "J").

Medidor volumen por desplazamiento de semillas.

4.2. Reactivos y soluciones

Azúcar Blanca refinada.

Levadura de cerveza fresca prensada.

Grasa comestible vacuna.

Agua destilada.

Sal fina.

4.3. Patrones y materiales de referencia requeridos

Porcentaje de humedad de la harina.

Tiempo óptimo de mezclado (mixograma).

Porcentaje de absorción de agua (calculado según "fórmula de absorción estimada en base a datos de mixograma; ver Anexo II).

Material de referencia interno.

Tabla de tiempos.

4.4. Condiciones Ambientales:

Temperatura ambiente 25°.

Temperatura de la masa durante el amasado 29°C ±0. 5°.

4.5. Ejecutor

Asistente de laboratorio o auxiliar de laboratorio

5. Descripción

5.1. Resumen

Se busca poder comparar distintas partidas de trigos o harinas en forma objetiva para poder predecir todos los aspectos que puedan afectar la actitud panadera.

5.2. Procedimiento

Se realizan las siguientes comprobaciones preliminares:

El agua destilada debe mantenerse en heladera para que la masa no supere los 29°.

Cámara de fermentación a 30°C±1° con humedad de más de 80%.

Horno Giratorio a 212°C con humedad de más de 90%.

Se enciende la cámara de fermentación, verificar que el recipiente se encuentre con agua desionizada y el equipo succione el agua necesaria para su funcionamiento.

Colocar un recipiente de acero inoxidable con agua dentro del horno.

El horno se enciende una hora antes de colocar el primer pan.

Se pesan 3.5g de levadura, 3.0g de grasa, 6.0g de azúcar y 1.5g sal.

Engrasar los recipientes, moldes y numerarlos.

Se pesa la cantidad de harina equivalente a 100g a 14% de humedad según la humedad de la muestra (ver Anexo I)

Se tiene un listado del agua a agregar y del tiempo de mezclado de cada muestra (ver Anexo II)

Anexo I

La cantidad de harina a pesar se puede calcular con la fórmula:

g harina a pesar = $8600 / (100 - \% \text{ humedad})$ o calcular según la siguiente tabla:

% humedad	g harina
8.0	93.5
8.1	93.6
8.2	93.7
8.3	93.8
8.4	93.9
8.5	94.0
8.6	94.1
8.7	94.2
8.8	94.3
8.9	94.4
9.0	94.5
9.1	94.6
9.2	94.7
9.3	94.8
9.4	94.9
9.5	95.0
9.6	95.1
9.7	95.2
9.8	95.3
9.9	95.4
10.0	95.6
10.1	95.7
10.2	95.8
10.3	95.9
10.4	96.0
10.5	96.1

% humedad	g harina
11.1	96.7
11.2	96.8
11.3	97.0
11.4	97.1
11.5	97.2
11.6	97.3
11.7	97.4
11.8	97.5
11.9	97.6
12.0	97.7
12.1	97.8
12.2	97.9
12.3	98.1
12.4	98.2
12.5	98.3
12.6	98.4
12.7	98.5
12.8	98.6
12.9	98.7
13.0	98.9
13.1	99.0
13.2	99.1
13.3	99.2
13.4	99.3
13.5	99.4
13.6	99.5

% humedad	g harina
14.2	100.2
14.3	100.4
14.4	100.5
14.5	100.6
14.6	100.7
14.7	100.8
14.8	100.9
14.9	101.1
15.0	101.2
15.1	101.3
15.2	101.4
15.3	101.5
15.4	101.7
15.5	101.8
15.6	101.9
15.7	102.0
15.8	102.1
15.9	102.3
16.0	102.4
16.1	102.5
16.2	102.6
16.3	102.7
16.4	102.9
16.5	103.0
16.6	103.1
16.7	103.2

10.6	96.2
10.7	96.3
10.8	96.4
10.9	96.5
11.0	96.6

13.7	99.7
13.8	99.8
13.9	99.9
14.0	100.0
14.1	100.1

16.8	103.4
16.9	103.5
17.0	103.6
17.1	103.7
17.2	103.9

Anexo II

La absorción de agua óptima se puede calcular con la fórmula:

$$\% \text{ abs. est.} = 165.356 + (h_{\text{max}} \times 1.97) - (t_{\text{mez}} \times 4.5232) + (0.2146 \times t_{\text{mez}} \times t_{\text{mez}}) - g \text{ HTg a pesar.}$$

Donde:

h_{max} = altura máxima de mixograma

t_{mez} = tiempo de mezclado de mixograma.

o utilizando la hoja de cálculo "Absorción estimada modificada.xls"

Se coloca la muestra en la amasadora, se agrega la cantidad de agua óptima.

Se mezcla el tiempo obtenido en el mixograma.

Se saca la masa procurando no romperla y se forma un bollo, se coloca en un recipiente rotulado y engrasado, se lleva a cámara de fermentación durante 25m. Se anotan los tiempos de ingreso de cada muestra en la cámara para poder llevar un control de los tiempos de leudado y cocinado, tomando como referencia una tabla de tiempos.

Pan #	Mezcla	1°punch	2°punch	Molde	Entra h.	Sale h.
1*	9:30	9:55	10:40	11:35	12:30	12:50
2	9:35	10:00	10:45	11:40	12:35	12:55
3	9:40	10:05	10:50	11:45	12:40	13:00
4	9:45	10:10	10:55	11:50	12:45	13:05
5	9:50	10:15	11:00	11:55	12:50	13:10
6	9:55	10:20	11:05	12:00	12:55	13:15
7	10:30	10:55	11:40	12:35	13:30	13:50
8	10:35	11:00	11:45	12:40	13:35	13:55
9*	10:40	11:05	11:50	12:45	13:40	14:00
10	10:45	11:10	11:55	12:50	13:45	14:05
11	10:50	11:15	12:00	12:55	13:50	14:10
12	11:30	11:55	12:40	13:35	14:30	14:50
13	11:35	12:00	12:45	13:40	14:35	14:55
14	12:35	13:00	13:45	14:40	15:35	15:55
15	12:40	13:05	13:50	14:45	15:40	16:00
16	12:45	13:10	13:55	14:50	15:45	16:05

Primer punch: se pasa la masa 3 veces entre los rodillos sobadores a máxima distancia ente sí (11/32), y se lleva nuevamente a cámara de fermentación durante 45m.

Segundo punch: se realiza el segundo punch, de la misma forma que el primero, y se lleva nuevamente a cámara de fermentación durante 55m.

Moldeado: se pasa la masa en tres instancias entre los rodillos sobadores disminuyendo progresivamente la distancia entre ambos: 11/32", 3/16" y 1/8".

Luego se forma el rollo en los rodillos de moldear durante 15s con la presión ejercida por el peso del rodillo superior. Se coloca la pieza de pan en el molde, con precaución de que los extremos y la unión queden en contacto con la parte inferior del molde.

Se lleva a cámara de fermentación durante 55m, pasado ese tiempo se lleva a horno durante 20 minutos.

Culminado el tiempo de horneado se deja enfriar al menos 30m a temperatura ambiente.

Se mide el volumen.

5.3. Cálculo e interpretación de los resultados

5.4. Interferencias posibles

5.5. Seguridad y manejo de residuos

6. Criterios de aceptación/rechazo

Las muestras se repiten uno o varios días posteriores.

7. Registros

Rg-LE-gr-49

8. Métodos de análisis y presentación. Referencia bibliográfica

AACC Metodo 10-10B Modificada

9. Incertidumbre

Sin determinar.

10. Anexos

Anexo I

Anexo II

Tabla de tiempos como referencia

11. Lista de distribución

PCD laboratorio calidad de granos.

12. Control de cambios

Versión	Numeral / Párrafo	Código / Tipo de Modificación

Elaborado por: PG	INIA LE	Firma:	Fecha: 10/07/2019
Aprobado por:	INIA LE	Firma:	Fecha:

Anexo 4 - Boleta evaluación pan - Comparación Pareada INIA

Nombre: _____

Fecha: __/__/__

Instrucciones:

- Usted recibirá dos muestras de panes.
 - Aprecie si se ven diferencias en textura y color.
 - Luego de probar la primera, aroma y boca, y antes de pasar a la segunda muestra, enjuáguese la boca con agua.
-
- Anote en la casilla correspondiente el código de la muestra que más **prefiere** por textura, aroma y gusto, es la No.....

Otras características que usted percibe en las diferencias entre las muestras:

Aspecto y Color:

.....

Aroma:

.....

Gusto:

.....

Gracias por su colaboración.

Anexo 5 - Tablas para establecer diferencia significativa en comparación pareada y test triangular

Table 1—Minimum numbers of correct judgments to establish significance at various probability levels for paired-difference and duo-trio tests (one-tailed, $p = \frac{1}{2}$)^a

No. of trials (n)	Probability levels						
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001
7	7	7	7	7	7		
8	7	7	8	8	8	8	
9	8	8	8	8	9	9	
10	9	9	9	9	10	10	10
11	9	9	10	10	10	11	11
12	10	10	10	10	11	11	12
13	10	11	11	11	12	12	13
14	11	11	11	12	12	13	13
15	12	12	12	12	13	13	14
16	12	12	13	13	14	14	15
17	13	13	13	14	14	15	16
18	13	14	14	14	15	15	16
19	14	14	15	15	15	16	17
20	15	15	15	16	16	17	18
21	15	15	16	16	17	17	18
22	16	16	16	17	17	18	19
23	16	17	17	17	18	19	20
24	17	17	18	18	19	19	20
25	18	18	18	19	19	20	21
26	18	18	19	19	20	20	22
27	19	19	19	20	20	21	22
28	19	20	20	20	21	22	23
29	20	20	21	21	22	22	24
30	20	21	21	22	22	23	24
31	21	21	22	22	23	24	25
32	22	22	22	23	24	24	26
33	22	23	23	23	24	25	26
34	23	23	23	24	25	25	27
35	23	24	24	25	25	26	27
36	24	24	25	25	26	27	28
37	24	25	25	26	26	27	29
38	25	25	26	26	27	28	29
39	26	26	26	27	28	28	30
40	26	27	27	27	28	29	30
41	27	27	27	28	29	30	31
42	27	28	28	29	29	30	32
43	28	28	29	29	30	31	32
44	28	29	29	30	31	31	33
45	29	29	30	30	31	32	34
46	30	30	30	31	32	33	34
47	30	30	31	31	32	33	35
48	31	31	31	32	33	34	36
49	31	32	32	33	34	34	36
50	32	32	33	33	34	35	37
60	37	38	38	39	40	41	43
70	43	43	44	45	46	47	49
80	48	49	49	50	51	52	55
90	54	54	55	56	57	58	61
100	59	60	60	61	63	64	66

Table 2—Minimum numbers of correct judgments to establish significance at various probability levels for the triangle test (one-tailed, $p = 1/3$)^a

No. of trials (n)	Probability levels						
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.005	0.001
5	4	5	5	5	5	5	
6	5	5	5	5	6	6	
7	5	6	6	6	6	7	7
8	6	6	6	6	7	7	8
9	6	7	7	7	7	8	8
10	7	7	7	7	8	8	9
11	7	7	8	8	8	9	10
12	8	8	8	8	9	9	10
13	8	8	9	9	9	10	11
14	9	9	9	9	10	10	11
15	9	9	10	10	10	11	12
16	9	10	10	10	11	11	12
17	10	10	10	11	11	12	13
18	10	11	11	11	12	12	13
19	11	11	11	12	12	13	14
20	11	11	12	12	13	13	14
21	12	12	12	13	13	14	15
22	12	12	13	13	14	14	15
23	12	13	13	13	14	15	16
24	13	13	13	14	15	15	16
25	13	14	14	14	15	16	17
26	14	14	14	15	15	16	17
27	14	14	15	15	16	17	18
28	15	15	15	16	16	17	18
29	15	15	16	16	17	17	19
30	15	16	16	16	17	18	19
31	16	16	16	17	18	18	20
32	16	16	17	17	18	19	20
33	17	17	17	18	18	19	21
34	17	17	18	18	19	20	21
35	17	18	18	19	19	20	22
36	18	18	18	19	20	20	22
37	18	18	19	19	20	21	22
38	19	19	19	20	21	21	23
39	19	19	20	20	21	22	23
40	19	20	20	21	21	22	24
41	20	20	20	21	22	23	24
42	20	20	21	21	22	23	25
43	20	21	21	22	23	24	25
44	21	21	22	22	23	24	26
45	21	22	22	23	24	24	26
46	22	22	22	23	24	25	27
47	22	22	23	23	24	25	27
48	22	23	23	24	25	26	27
49	23	23	24	24	25	26	28
50	23	24	24	25	26	26	28
60	27	27	28	29	30	31	33
70	31	31	32	33	34	35	37
80	35	35	36	36	38	39	41
90	38	39	40	40	42	43	45
100	42	43	43	44	45	47	49

^a Values (X) not appearing in table may be derived from:

$$X = 0.4714 z \sqrt{n} + [(2n + 3)/6]. \text{ See text.}$$

Anexo 6 – Boleta evaluación pan – Prueba triangular

Prueba Triangular

Nombre:.....

Fecha:...../..... /.....

Instrucciones:

- Usted recibirá dos grupos de tres muestras cada uno.
- Dos de estas muestras son idénticas y la otra es diferente.
- Por favor circule el número de la muestra diferente.
- Sobre la línea de puntos aclare por qué le pareció diferente.

456 289 742

171 635 483

Gracias por su colaboración.