



ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE PROTEINAS VEGETALES Y HARINAS DE MAÍZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2015/2016

**Alumna: Ángela Bravo Núñez
Tutor: Manuel Gómez Pallarés**

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

Índice

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivo y plan de trabajo	6
3. Materiales y métodos	6
3.1. Materiales.....	6
3.2. Métodos.....	7
3.2.1. Micro estructura de las proteínas.....	7
3.2.2. Propiedades de hidratación	7
3.2.3. Comportamiento viscoso.....	8
3.2.4. Propiedades viscoelásticas.....	9
3.2.5. Preparación de geles	9
3.2.6. Textura	10
3.2.7. Color.....	10
3.2.8. Análisis estadístico.....	10
4. Resultados y discusión	11
4.1. Micro estructura de las proteínas	11
4.2. Propiedades de hidratación.....	12
4.3. Comportamiento viscoso.....	14
4.4. Propiedades viscoelásticas	17
4.5. Textura y color.....	20
4.5.1. Color.....	20
4.5.2. Textura	21
5. Conclusiones	22
6. Agradecimientos	23
7. Bibliografía	23

Resumen

La incorporación de nuevos ingredientes a sistemas donde el componente principal es el almidón, modifica las propiedades del mismo. El objetivo de este estudio es investigar las interacciones de diferentes proteínas con dos harinas de maíz (nativa y extrusionada). Se observó que cada proteína interactúa de manera diferente con cada harina. Para las propiedades de hidratación, las mezclas con un comportamiento más similar a las harinas fueron las elaboradas con proteína de guisante, seguida de las elaboradas con proteínas de arroz, gluten hidrolizado y patata. Para el comportamiento viscoso las mezclas con proteína de guisante siguieron siendo las más parecidas a los controles, pero en este caso las mezclas con proteínas de arroz y patata presentaron un comportamiento similar, siendo la de gluten hidrolizado la más diferente. En las propiedades viscoelásticas las mezclas con proteína de patata no pudo medirse, posiblemente por la existencia de una carga positiva global en la proteína, y las demás siguieron la misma tendencia que en las pruebas anteriores. Para las medidas de color se observaron diferencias significativas entre las mezclas de todas las proteínas. Los resultados de textura indicaron que de entre todas las mezclas, fueron las elaboradas con proteína de patata las que dieron lugar a geles más duros, lo cual proporcionó información interesante sobre el comportamiento de las muestras en el tiempo.

Palabras clave: Harina, cereales, interacciones, almidón, proteínas.

Abstract

Incorporation of new ingredients into food systems where the main component is starch modifies the behavior of the system. The objective of this master thesis is to investigate interactions in-between different proteins and native/extruded corn flours. It was observed that each protein interacted in a different way with each flour. For hydration properties, mixtures with pea protein had the most similar behavior comparing with the controls, followed by mixtures with rice, hydrolyzed gluten and potato proteins. For pasting properties, mixtures containing pea protein remained being the ones with similar behavior with the controls, but in this case mixtures with rice and potato proteins performed in a similar way, being the ones with hydrolyzed gluten the most different ones. Viscoelastic response of mixtures with potato protein could not be measured, probably because an existing global positive charge; the other mixtures performed in a similar way than in the others tests. Significant differences were observed for color for all the mixtures. Texture results indicated that hardest gels were elaborated with mixtures containing potato protein, which gave valuable information about behavior of samples over time.

Key words: Flour, cereals, interactions, starch, proteins.

1. Introducción

El mercado global está creciendo de acuerdo con el avance de la industria alimentaria, que actualmente tiene un especial interés en los alimentos ricos en proteínas (Markets and Markets, 2015). Esta tendencia está justificada por el creciente interés de la sociedad en el consumo de niveles elevados de proteínas, sobre todo por el colectivo deportista. La importancia de las proteínas para los atletas viene de lejos, desde los deportistas de la Antigua Grecia hasta los atletas actuales, las proteínas han sido consideradas una de las claves para triunfar (Tipton & Wolfe, 2004). Son un componente esencial de una dieta sana y están en el foco de las investigaciones que buscan optimizar el consumo de proteínas para las diferentes etapas y estados de la vida (Arentson-Lantz y col., 2015). El requerimiento nutricional de proteína se define como la cantidad mínima necesaria que debemos ingerir para compensar todas las pérdidas de nitrógeno y mantener el equilibrio del mismo (Millward, 2001). La cantidad diaria recomendada de proteínas, definida como la cantidad mínima necesaria para cumplir con los requisitos nutricionales del 97-98% de la población, es de 0,83 kg/día para una persona adulta (FAO/WHO/UNU, 2007). Aunque la cantidad diaria recomendada de proteínas es probablemente suficiente para la mayoría de la población con hábitos sedentarios o baja actividad física, no lo es para las personas mayores que quieren tener una buena salud (Volpi y col., 2013). Entre un 10 y un 25% de adultos consumen menos proteínas que la cantidad diaria recomendada (Fulgoni, 2008). Algunos colectivos minoritarios, como lo son los celíacos, no siempre llegan a consumir la cantidad diaria recomendada de proteínas. Actualmente la calidad nutricional de productos de panificación libres de gluten tienen una muy baja contribución a la ingesta diaria recomendada de proteína, y una muy alta a la de grasa (Matos & Rosell 2011). Además, existen evidencias epidemiológicas indican que una ingesta mayor de proteínas a la cantidad diaria recomendada es beneficiosa para la población adulta (Houston y col., 2008; Bauer y col., 2013). Así, Bauer y col., (2013) demostraron que los adultos con un consumo proteico elevado (19% de la energía total) perdían menos masa muscular que aquellos con un aporte proteico menor (11% de la energía total). El nivel de actividad física puede tener un impacto significativo en la habilidad de los músculos de retener aminoácidos en personas mayores, y esto debería ser considerado para determinar la ingesta óptima de proteínas. El ejercicio mejora la habilidad de los músculos del esqueleto de sintetizar más proteínas contráctiles tanto en jóvenes como en adultos (Walker y col., 2011). La creciente evidencia de que la ingesta de niveles de proteína mayores a los recomendados pueden beneficiar a personas

mayores aún no ha sido considerada por los comités que deliberan las recomendaciones de ingesta diaria (Volpi y col., 2013). La distribución desigual de la ingesta de proteínas a lo largo del día puede reducir la efectividad del total de proteínas consumidas sobre la salud de los músculos. El cuerpo humano tiene una capacidad reducida de almacenar exceso de proteínas/ aminoácidos para un uso anabólico posterior. Por lo tanto, no existe beneficio alguno en consumir grandes cantidades de proteína en una sola comida (Paddon-Jones & Rasmussen 2009; Symons y col., 2009a, 2009b). En Estados Unidos, la población adulta consume el 50% de la proteína diaria durante la cena y tiene un consumo medio de 0,9 kg/ día (Rhodes y col., 2012). Recientemente Mamerow y col., (2014) alegaron que consumir una cantidad moderada de proteínas en cada comida a lo largo de un día estimula más efectivamente la síntesis de proteínas musculares que tomando en una sola ingesta la misma cantidad total de proteínas. Las recomendaciones de ingesta de proteínas deben complementarse con nuestro conocimiento sobre la capacidad de las proteínas de alcanzar los requerimientos de síntesis proteica de los humanos (Young & Borgonha 2000). Todas estas investigaciones remarcan la importancia de buscar estrategias que ayuden a cumplir las necesidades proteicas de la población.

Cada proteína tiene una estructura propia, factor que establece las propiedades fisicoquímicas de la proteína, incluyendo la carga superficial o la capacidad hidrofóbica, la estabilidad al calor y a los productos químicos, la flexibilidad molecular y el comportamiento disociativo (Culbertson, 2006). Pero las propiedades funcionales no son solo dependientes de las características intrínsecas de las proteínas, como pueden ser la secuencia de aminoácidos, el tamaño y la estructura molecular, etc, sino que también dependen de las condiciones a las que se expongan a lo largo de su vida útil, como el procesado, los tratamientos de conservación y los componentes del medio (agua, aceite, sales, hidratos de carbono, etc) en el cual se sitúen (Kristo y col., 2015). Muchas de las propiedades funcionales de las proteínas, como la solubilidad, capacidad de hinchamiento, retención de agua, viscosidad, gelificación, emulsión o espumado dependen de las interacciones agua-proteína (Damodaran, 2008). El fenómeno de hidratación se encuentra relacionado con el tipo y número de aminoácidos de su secuencia (los aminoácidos polares con carga neta tienen mayor poder de hidratación que los polares sin carga y éstos a su vez que los no polares). La capacidad de hidratación se mantiene incluso en medios donde los aminoácidos polares tienen menor capacidad, es decir, cuando coincide el pH del medio con el punto isoeléctrico proteico, pues los grupos no polares interactúan con el agua mediante un proceso llamado hidratación hidrofóbica

(Wijeratne., 2005). Las propiedades de hidratación se encuentran muy vinculadas a su vez, con la solubilidad (Were y col., 1997).

Una práctica muy común en la industria alimentaria es la incorporación de ingredientes proteicos en la formulación de los productos para mejorar las propiedades organolépticas y funcionales además de para aumentar su valor nutricional (Bonet y col., 2006, Storck y col., 2013). Un buen vehículo para incorporar una mayor cantidad de proteína a la dieta son los productos a base de cereales, ya que se encuentran en la base de la pirámide alimentaria. Para ello es necesario conocer bien las propiedades de uno de los componentes principales de todos ellos, como es el almidón. El almidón es un polímero biodegradable producido por muchas plantas con el objetivo de almacenar energía. En su estado natural se encuentra en forma de gránulos formados por dos macromoléculas, amilosa y amilopectina (Le Corre y col., 2010). Los gránulos tienen una compleja estructura jerárquica, que puede dividirse al menos en seis niveles de organización (Tran y col., 2011).

En los cereales y plantas mayores, los gránulos de almidón se forman en amiloplastos. La cantidad de almidón en los cereales varía, pero generalmente está entre un 60 y un 75% del peso del grano (Delcour & Hosney, 2010). En los cereales con gránulos de almidón simples, como el trigo o el maíz, cada amiloplasto contiene un gránulo (Delcour & Hosney, 2010).

Con el fin de modular la funcionalidad de almidones nativos diversas modificaciones químicas, enzimáticas y/o físicas son alternativas posibles (Chiu & Solarek, 2009). Las modificaciones físicas están ganando importancia por la ausencia de agentes químicos exógenos (Jacobs & Delcour, 1998). Entre dichas modificaciones físicas destaca el tratamiento de extrusión, ampliamente utilizado en la industria alimentaria. La extrusión consiste en un tratamiento físico en el cual un producto a base de almidón es sometido a una alta temperatura y esfuerzo mecánico con contenidos de humedad relativamente bajos durante un corto tiempo (Camire y col., 1990). Este tratamiento provoca cambios en el almidón más bruscos que los métodos de cocción tradicionales, dañando una mayor cantidad de gránulos de almidón y modificando el poder espesante en frío de los almidones (Wolf, 2010). El alcance de estos cambios depende de parámetros de extrusión tales como; la temperatura, la humedad al inicio del tratamiento y la velocidad del tornillo (Wen y col., 1990). Una mayor temperatura y contenido en humedad y una baja velocidad del tornillo producen un aumento de la temperatura de gelatinización y de la capacidad de hidratación, mientras que el pico de viscosidad y la

retrogradación disminuyen (Martínez y col., 2014b). De este modo, los tratamientos hidrotérmicos, como la extrusión, pueden generar almidones pregelatinizados (precocidos), que presentan un mayor hinchamiento de los gránulos, adquiriendo una mayor capacidad de absorber agua y de espesar en frío (Chiu & Solarek, 2009 y Doublier y col., 1986).

Entender las interacciones proteína-almidón en un alimento es muy importante para poder desarrollar productos con propiedades térmicas y reológicas estables (Jamilah y col., 2009). La comunidad científica es consciente de esta necesidad, y el efecto de la adicción de diferentes proteínas, mayoritariamente proteínas procedentes de la leche y leguminosas (proteína de soja y proteína de guisante), a productos de cereales ya ha sido estudiado por diversos autores en pasta (Padalino y col., 2013, Marti y col., 2014, Larrosa y col., 2016), otros productos extrusionados (Yu y col., 2012) , galletas (Nammakuna y col., 2015., Sarabhai y col., 2015, Mancebo y col., 2016), panes (Gallagher y col., 2003, Ribotta y col., 2004, Moore y col., 2006, Marco & Rosell., 2008b, Van Riemsdijk y col., 2011, Miñarro y col, 2012, Krupa-Kozak y col., 2013, Storck y col., 2013, Ziobro y col., 2013, Gani y col., 2015 y Ziobro y col., 2016) y bizcochos (Gallagher y col., 2005, Ronda y col., 2011, Gularte y col., 2012 y Matos y col., 2014); lo cual remarca el interés de investigar las interacciones entre diferentes harinas y proteínas.

Sin embargo, las interacciones harina/almidón-proteína fuera de productos no han sido tan estudiadas. Marco & Rosell (2008a) estudiaron las interacciones entre harinas de arroz y proteínas de soja y guisante; otros autores realizaron estudios similares con proteína de soja y almidón de mandioca (Chinma y col., 2013), proteína de cacahuete y almidón de guisante (Sun y col., 2014), proteína de arroz y almidón de arroz (Yi y col., 2014), proteína de soja texturizada y diferentes almidones (Zhang y col., 2016), proteínas lácteas y almidón de arroz modificado químicamente (Puerta-Gomez & Castell-Perez, 2016), proteína de soja y almidones nativos y modificados con posterior proceso de extrusión (Seker, 2005). Estas investigaciones se han centrado en una o dos proteínas, recurriendo casi siempre a las proteínas de soja o proteínas lácteas, lo cual deja una puerta abierta para la investigación de interacciones de almidón con nuevas proteínas, como lo son las proteínas de gluten hidrolizado, arroz, guisante y patata.

2. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo del proyecto es estudiar las interacciones de cuatro proteínas vegetales (gluten hidrolizado, arroz, guisante y patata) con harinas de maíz (nativa (HN) y extrusionada (HE)), por ser harinas procedentes de uno de los cereales más cultivados a nivel mundial además de ser un cereal sin gluten. Se pretende así entender las interacciones de las mismas con las harinas (nativa y extrusionada) y establecer una base científica desde la cual poder seguir desarrollando nuevos productos que satisfagan las necesidades y demandas del mercado.

Las muestras utilizadas se prepararon con dos tipos de harinas de maíz (nativa y extrusionada) en combinación con las cuatro fuentes proteicas en dos porcentajes, lo que nos da un total de 18 muestras contando los controles (harinas de maíz nativa y extrusionada). Los porcentajes de sustitución de harina por proteína fueron del 25% y 50%. De estas mezclas se realizaron ensayos de: propiedades de hidratación, comportamiento viscoso, comportamiento viscoelástico, textura y color.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Se utilizaron dos harinas de maíz, una nativa y otra extrusionada (ZOC 190), suministradas por Molendum Ingredients (Zamora, España) y cuatro proteínas de arroz, guisante, gluten de trigo hidrolizado y patata, cuyo origen junto con los datos analíticos proporcionados por los fabricantes puede consultarse en la tabla 1:

Tabla 1. Origen y datos técnicos de las proteínas utilizadas.

Fuente proteica	Proteína	% proteína	Proveedor
Arroz	Remypro N80+	79%	Remy Industries, Leuven-Wijgmaal, Bélgica
Guisante	Nutralys F85F	85%	Roquette, Lestrem, Francia
Gluten de trigo hidrolizado	Nutralys W	82%	Roquette, Lestrem, Francia
Patata	Solanic 306P	90%	Avebe, Veendam, Holanda

3.2. Métodos

3.2.1. Micro estructura de las proteínas

Se tomaron fotografías de de cada una de las proteínas mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM). Estas microfotografías fueron tomadas con el equipo Quanta 200FEI (Hillsboro, Oregón, EE.UU.). Las microfotografías fueron obtenidas en modo de detección de electrones secundarios, lo cual permite observar la morfología y el relieve de las superficies, a 1,5 KeV en modo alto vacío con un detector de electrones retrodispersados (BSED).

3.2.2. Propiedades de hidratación

La capacidad de retención de agua (WHC), definida como la cantidad de agua retenida por la muestra sin ser sometida a estrés, se evaluó siguiendo la metodología empleada por de la Hera y col., (2013) con algunas modificaciones. Se añadieron 100ml de agua destilada a 5 g (± 0.1 g) de cada una de las muestras y se dejaron reposar durante 20 horas. Después se retiró el exceso de agua y las muestras hidratadas se pesaron. Los valores finales se calcularon del siguiente modo:

$$WHC \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{\text{gramos de agua retenida}}{\text{gramos de muestra seca}}$$

El volumen de hinchamiento (SV), definido como el incremento de volumen de un peso de muestra conocido después de añadir agua se determinó siguiendo el mismo procedimiento que para la capacidad de retención de agua (WHC), y evaluando el incremento de volumen a las 20 horas. Los valores finales se calcularon del siguiente modo:

$$SV \left(\frac{ml}{g} \right) = \frac{\text{Volumen de la muestra hidratada}}{\text{gramos de muestra seca}}$$

La capacidad de fijación de agua (WBC), definida como la cantidad de agua retenida por la muestra después de una centrifugación, se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el método 56-30.01 (AACC, 2012) con modificaciones. Se usaron 1,25 g (± 0.1 g) de muestra y 25 ml de agua destilada. Las condiciones de centrifugación fueron 2000 x g durante 10 minutos. Los valores finales se expresaron del siguiente modo:

$$WBC \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{\text{gramos de agua retenida}}{\text{gramos de muestra seca}}$$

El índice de absorción de agua (WAI), el poder de hinchamiento (SP) y el índice de solubilidad en agua (WSI) de las diferentes mezclas se determinó siguiendo el método de Toyokawa et al. (1989), con las modificaciones llevadas a cabo por Rosell y col., (2011). La harina (50 ± 1 mg) se dispersó en 1,0 ml de agua destilada en un tubo Eppendorf con una varilla metálica y se calentó a 90 °C durante 10 minutos en un baño de agua. La pasta cocida se enfrió en un baño de agua con hielo durante 10 minutos y después se centrifugó a 3000 × g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó en un plato de evaporación y el residuo del tubo eppendorf se pesó (Wr). El peso de sólidos secos se recuperó por evaporación del sobrenadante a 105 °C (Ws). WAI, SP y WSI se calcularon del siguiente modo:

$$WAI \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{Wr}{Wi}$$

$$WSI \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{Ws}{Wi} * 100$$

$$SP \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{Wr}{(Wi - Ws)}$$

Donde Wi es el peso de la muestra en base seca (g).

Todas las pruebas de propiedades de hidratación se realizaron por duplicado.

3.2.3. Comportamiento viscoso

El comportamiento viscoso de todas las mezclas se determinaron utilizando un analizador de viscosidad (Modelo RVA-4C, Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia). El método seguido para el ensayo fue el método estándar 61.02.01 (AACC, 2012). Para ello se añadieron en recipientes de aluminio 3,5 g (±0,1 g) de muestra en 25 g (±0,1 g) de agua destilada, homogeneizando la mezcla con las palas de plástico durante 20 segundos antes de comenzar el experimento. La mezcla siguió un ciclo de calentamiento en el que se aumentó la temperatura a 50 °C para mantener esas condiciones durante 1 minuto, se calentó la muestra a una velocidad de 12 °C/min hasta 95 °C y se mantuvo esa temperatura durante 2 minutos y 30 segundos. Posteriormente se enfrió la muestra a una velocidad de 12 °C/min hasta 50 °C para mantener dicha temperatura durante 2 minutos. La velocidad de rotación de la pala se mantuvo a 160rpm durante todo el test menos durante los primeros 10 segundos, donde la velocidad fue de 960 rpm con el objetivo de homogeneizar la muestra. Las pruebas se realizaron por duplicado.

3.2.4. *Propiedades viscoelásticas*

Las propiedades viscoelásticas de las mezclas se determinaron utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Thermo Scientific Haake RheoStress1 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania) y un baño de agua Phoenix II P1-C25P (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania) para controlar la temperatura de análisis, fijada en 30°C para todos los análisis. Todas las pruebas fueron monitorizadas con el software RheoWin 4 Job Manager (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania) y los parámetros reológicos fueron analizados utilizando el software Rheowin 4 Data Manager (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania). Para todos los ensayos se utilizó una geometría de platos paralelos serrados de 60mm de diámetro (PP60 Ti) con una separación entre los platos de 1mm de distancia. La superficie de la muestra expuesta al aire entre los platos, una vez ajustado el espacio entre ellos, se cubrió con aceite de vaselina Panreac (Panreac Química SA, Castellar del Vallés, España) para prevenir la pérdida de humedad. El tiempo de reposo mínimo para permitir la estabilización de la estructura antes de iniciar los ensayos se estableció en 500 segundos para todos los análisis. La preparación de muestras para el análisis de las propiedades viscoelásticas se realizó utilizando el analizador de viscosidad (modelo RVA-4C, Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Australia), añadiendo a los recipientes 5,13 g de muestra y 23,37 g de agua destilada, con el objetivo de que todos los geles tuvieran una concentración del 18% (w/v) y una consistencia adecuada para el análisis de la viscoelasticidad. El método empleado es el mismo que para las propiedades de gelificación con la diferencia de que el enfriamiento final de la muestra se realizó a 30 °C en lugar de a 50 °C. En primer lugar se realizó un barrido de esfuerzos de 0,1 a 10 Pa a una frecuencia de 1 Hz para determinar la región viscoelástica lineal de todas las muestras. Posteriormente, se realizó un barrido de frecuencias de 0,1 a 15 Hz utilizando un valor de esfuerzo cortante comprendido en la región viscoelástica lineal, y previamente establecido en el barrido de esfuerzos. En este ensayo se obtuvieron los valores del módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdidas o viscoso (G'') y la $\tan(\delta)$ que se define como el cociente entre G'' y G' .

3.2.5. *Preparación de geles*

Los geles se hicieron utilizando vasos de precipitado de 1 L. Se dispersaron 108 g de muestra en 492 g de agua destilada. Las soluciones se calentaron hasta el punto de ebullición (95 °C) en una placa calefactora con una agitación constante con el objetivo de conseguir una hidratación suficiente y una muestra homogénea. Una vez alcanzada dicha

temperatura, las muestras se mantuvieron durante 15 minutos en la placa calefactora a 95 °C. Durante el calentamiento el vaso se cubrió con parafilm con el objetivo de evitar la pérdida de agua por evaporación. Este gel se utilizó para las pruebas de textura, color y sinéresis.

Para el análisis de textura y color se llenaron placas de vidrio de 100 mm de diámetro y 20 mm de altura con los geles aún calientes. Las placas se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 horas, se atemperaron durante 2 horas para luego proceder a su análisis. Los geles se elaboraron por duplicado.

3.2.6. *Textura*

Los análisis se realizaron utilizando un texturómetro TA.XT2i Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) equipado con un software Texture Expert versión 1 para Windows; para la calibración de la fuerza se utilizó una carga de 5 kg. A cada muestra se le aplicó un ciclo de compresión usando una sonda cilíndrica de 25 mm de diámetro (P25a) con una velocidad de penetración de 0,5 mm/s hasta penetrar la muestra 10 mm. La curva fuerza-tiempo obtenida se utilizó para calcular los valores de dureza (pico de fuerza observado durante el ciclo de compresión) y penetración de ruptura (distancia que penetra la sonda sin romper el gel).

3.2.7. *Color*

El color de los geles se obtuvo utilizando un espectrofotómetro Minolta CN-508i (Minolta, Co. LTD, Tokio, Japón). Antes de realizar las mediciones se calibró con un blanco ($L^* = 98,92$, $a^* = -0,11$ y $b^* = -0,30$). Los resultados se obtuvieron usando un iluminador estándar D65 y observador estándar 2° y se expresaron en el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$. En el sistema de color CIE $L^*a^*b^*$, el parámetro L^* (0-100) representa la luminosidad, mientras que a^* y b^* son las coordenadas cromáticas (-60, +60), donde $+a^*$ es la coordenada de color rojo, $-a^*$ la verde, $+b^*$ es la coordenada de color amarillo, y $-b^*$ es el azul.

3.2.8. *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se han tratado utilizando un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA simple) mediante el test LSD de Fisher ($p < 0,05$). Antes de realizar el ANOVA de los datos se ha verificado la normalidad de los mismos mediante el test de bondad de ajuste específico de la normalidad Shapiro-Wilks. Además, se han realizado

correlaciones de Pearson entre todas las variables estudiadas a través de un análisis multivariado para observar la existencia de posibles relaciones lineales entre ellas. Todos los análisis se han llevado a cabo usando el software Statgraphics Centurion XVII (StatPoint Technologies Inc, Warrenton, EEUU).

4. Resultados y discusión

4.1. Micro estructura de las proteínas

La configuración superficial es uno de los aspectos junto a tamaño y características físico-químicas que contribuyen al comportamiento funcional de una proteína (Damodaran, 2008). En la figura 1 se muestra la configuración estructural de la superficie de las proteínas utilizadas en este estudio.

Se puede observar que las proteínas de patata y gluten hidrolizado presentan una superficie porosa. Los poros en la proteína de patata parecen ser más grandes que en la de gluten, pero menos numerosos. Por otro lado, el resto de la superficie parece más uniforme para la proteína de gluten hidrolizado. Las proteínas de arroz y guisante no presentan poros en su superficie, pero son diferentes entre sí, teniendo la proteína de arroz una superficie mucho más irregular que la de guisante, cuyas partículas tienen forma de glóbulo.

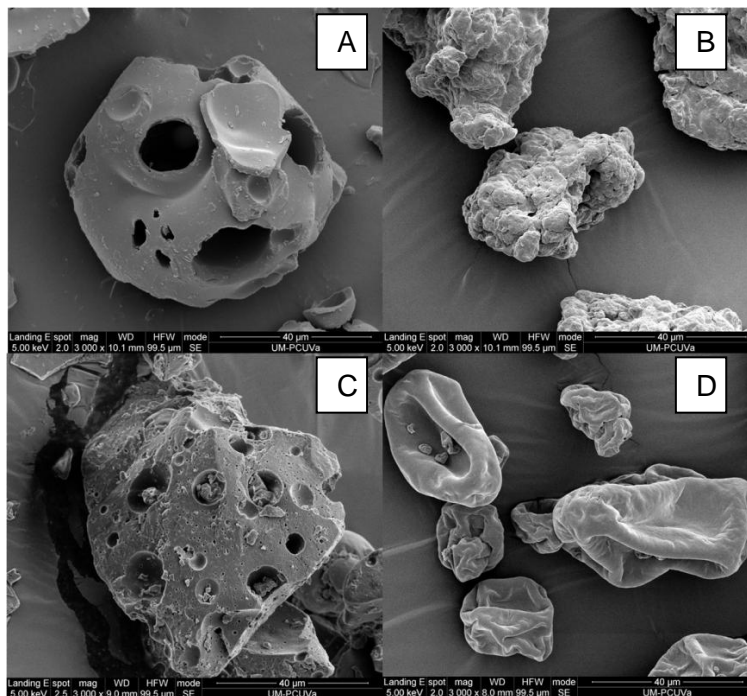


Figura 1. Microfotografías tomadas por el microscopio electrónico de barrido (x3000 aumentos) sobre los gránulos de proteína de (A) patata, (B) arroz, (C) gluten hidrolizado y (D) guisante.

4.2. Propiedades de hidratación

En la tabla 2 pueden consultarse los resultados obtenidos de los ensayos de hidratación. La capacidad de retención de agua de la harina extrusionada es mayor que la de la harina nativa. Esto coincide con los resultados obtenidos por Martínez y col., (2014a, 2014b) al estudiar los procesos de extrusión en harinas de arroz y trigo respectivamente. Esto puede explicarse por la ruptura de los granos de almidón tras su gelatinización, lo que genera una fase molecular desordenada con grupos hidroxilo con tendencia a unirse a moléculas de agua (Camire y col., 1990).

Tabla 2. Resultados de las propiedades de hidratación de las harinas de maíz nativas y extrusionadas y sus mezclas con proteínas vegetales

	WHC	SV	WBC	WAI	WSI	SP
HN	2,27c	0,30cd	1,72c	10,02h	1,59a	10,18efg
HN-Patata 25 %	1,65b	0,23a	1,14b	8,88fgh	12,46bcd	10,15defg
HN-Gluten 25%	2,18c	0,28bc	1,30b	8,28defg	9,10ab	9,10cde
HN-Arroz 25%	2,38c	0,32d	1,90cd	9,03fgh	1,41a	9,15cde
HN-Guisante 25%	4,16e	0,41e	2,75e	8,92fgh	7,17ab	9,61cdefg
HN-Patata 50%	1,02a	0,21a	0,44a	6,81abcd	30,09f	9,75defg
HN-Gluten 50%	2,13c	0,26b	1,09b	6,61abc	21,11de	8,38bc
HN-Arroz 50%	2,73d	0,32d	2,09d	7,61bcdef	1,30a	7,70ab
HN-Guisante 50%	5,73h	0,61h	3,57g	8,52efgh	12,83bcd	9,77defg
HE	7,80j	0,83j	4,70j	9,58gh	6,33ab	10,22efg
HE-Patata 25%	4,34ef	0,48f	3,76gh	7,98bcdefg	19,71cde	9,93defg
HE-Gluten 25%	5,89h	0,62h	4,25i	8,28defg	14,22bcd	9,66cdefg
HE-Arroz 25%	6,95i	0,73i	3,85h	8,06cdefg	8,68ab	8,83bcd
HE-Guisante 25%	7,80j	0,83j	5,31k	9,44gh	11,51bc	10,66fg
HE-Patata 50%	1,72b	0,52g	2,08d	5,92a	40,07g	9,86defg
HE-Gluten 50%	4,52f	0,46f	3,29f	6,93abcde	26,45ef	9,41cdef
HE-Arroz 50%	5,37g	0,60h	3,14f	6,38ab	6,27ab	6,80a
HE-Guisante 50%	7,86j	0,84j	5,13k	8,61fgh	20,16cde	10,77g

WHC (Capacidad de retención de agua). SV(Volumen de hinchamiento) WBC (Capacidad de fijación de agua)WAI (Índice de absorción de agua). WSI (Índice de solubilidad en agua). SP (Poder de hinchamiento). *Los valores con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).*

Respecto a la harina nativa se puede observar que mientras que las mezclas con proteína de guisante aumentan la capacidad de retención de agua, las de patata la disminuyen. Estos efectos son más acusados cuando el porcentaje de sustitución es mayor. Por otro lado las mezclas con proteína de arroz y gluten hidrolizado mantienen la misma capacidad de retención de agua, a excepción de la mezcla con harina de arroz al 50%, que es ligeramente mayor, lo cual indica que la interacción de la harina nativa con proteína de arroz mejora muy ligeramente la capacidad de retención de agua respecto al control. Para la harina extrusionada no se observa que ninguna de las proteínas mejore la capacidad de retención de las mezclas, y además las diferencias de las mezclas respecto

al control son menores que con la harina nativa. Esto se debe a que cuando sustituimos harina extrusionada por proteína estamos retirando almidón pregelatinizado, que tiene una capacidad de retención de agua muy elevada y puede enmascarar la capacidad de retención de agua de la proteína añadida. Por lo demás la tendencia observada en las mezclas con harina nativa es extrapolable, presentando las mezclas con proteína de guisante una capacidad de retención de agua igual a la harina y el resto de las mezclas una capacidad de retención de agua menor en el siguiente orden: mezclas de proteína con arroz, mezclas con proteína de gluten hidrolizado y mezclas con proteína de patata.

Los resultados obtenidos por las investigaciones llevadas a cabo para diferentes proteínas justifican que no todas las proteínas se comporten de la misma forma. Algunos autores han observado una correlación positiva entre diferentes niveles de proteínas y capacidad de retención de agua de mezclas de harinas con proteínas (Chinma y col., 2013) y diferente comportamiento entre distintas proteínas (Marco & Rosell 2008a). Sin embargo, no existe ninguna investigación que compare tantas proteínas con dos harinas con propiedades diferentes. El diferente comportamiento de estas proteínas puede tener una relación con la estructura de las mismas. Observando las imágenes ESEM del apartado anterior, se observa que las proteínas de guisante y arroz presentan una superficie más uniforme que las de gluten hidrolizado y patata, en las que se pueden observar poros en su superficie. De acuerdo con los resultados obtenidos, podríamos deducir que quizás una superficie porosa tienda a repeler las moléculas mientras que una superficie más uniforme favorecería su unión.

Tanto el poder de hinchamiento como la capacidad de fijación de agua de las mezclas parecen seguir la misma tendencia que la capacidad de retención de agua. De hecho, se observan correlaciones positivas en ambos casos ($r=0,947$ y $r=0,957$ respectivamente para $p<0,001$).

El índice de absorción de agua (WAI), al contrario que la capacidad de retención de agua (WHC), es igual para la harina nativa que para la harina extrusionada, lo cual puede deberse a que para la obtención de estos parámetros todas las muestras se someten a un proceso de cocción, y por tanto el almidón de la harina nativa también está gelatinizado. Hagenimana y col., (2006) observaron que este parámetro aumenta en paralelo al grado de extrusión, hasta un punto en el que disminuye, posiblemente por el aumento de la dextrinización del almidón (Mercier & Feillet, 1975; Owusu-Ansah y col., 1983).

Respecto a ambas harinas, las mezclas con proteína de guisante mantuvieron el índice de absorción de agua, mientras que el resto de las proteínas lo disminuyeron en sus respectivas mezclas al 50%. A niveles de sustitución del 25% solo la mezcla elaborada con proteína de gluten hidrolizado y harina nativa presentó diferencias significativas. Es evidente que la proteína de guisante es la que tiene un comportamiento más similar a las harinas, al no presentar sus mezclas diferencias significativas respecto a los controles.

El índice de solubilidad en agua (WSI) no es significativamente diferente entre la harina nativa y la harina extrusionada, pero si comparamos el conjunto de muestras que contienen harina nativa frente al que contienen harina extrusionada, si se pueden observar algunas diferencias, presentando valores de WSI más elevados las muestras elaboradas con harina extrusionada. De acuerdo con las investigaciones de Hagenimana y col., (2006), el índice de solubilidad en agua debería ser mayor para la harina extrusionada, ya que observaron que el índice de solubilización en agua está relacionado positivamente con el proceso de extrusión debido a la dextrinización del almidón.

En las mezclas elaboradas con ambas harinas solo se encontraron diferencias significativas para las mezclas con proteína de patata al 25% y para las mezclas de proteína de patata, gluten hidrolizado y guisante al 50%. En todos los casos se obtuvieron índices de solubilidad mayores. Podemos concluir que a excepción de la proteína de arroz, todas las demás proteínas presentan un índice de solubilidad mayor que las harinas, siendo la proteína de patata la más soluble de todas, al presentar diferencias significativas respecto a los dos controles a los dos niveles de sustitución.

El poder de hinchamiento (SP) no es significativamente diferente entre la harina nativa y la harina extrusionada. Respecto a la harina nativa, se encontraron diferencias significativas para las mezclas de proteína de gluten hidrolizado y arroz al porcentaje de sustitución del 50%. En el caso de la harina extrusionada estas diferencias se observaron para las mezclas con proteína de arroz a los dos porcentajes de sustitución. En base a esto se puede decir que la proteína de arroz tiene poder de hinchamiento menor que las harinas mientras que el resto de las proteínas lo tienen muy parecido.

4.3. Comportamiento viscoso

El comportamiento viscoso de las muestras se encuentra reflejado en las figura 2. En la figura 2(A) y 2(B) se observa que cuando las mezclas realizadas con harina nativa son sometidas a un calentamiento incrementan su viscosidad. Las mezclas realizadas con

harina extrusionada no necesitan de este calentamiento, ya que incrementan su viscosidad inmediatamente cuando entran en contacto con el agua. Esto es debido a que los gránulos de almidón se encuentran en un estado de pregelatinización (Wolf, 2010). La diferencia de viscosidades a lo largo de todo el ciclo de calentamiento-enfriamiento entre las dos harinas también es debido a la pregelatinización del almidón de la harina extrusionada, la cual también da lugar a una menor retrogradación (Hagenimana y col., 2006 y Sharma y col., 2013).

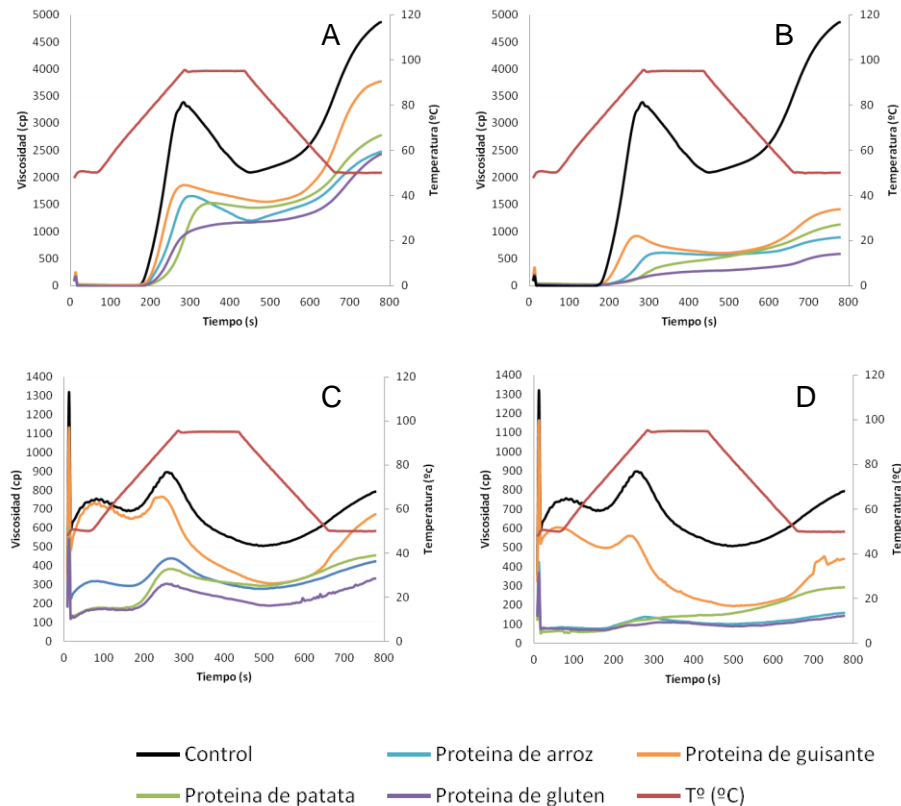


Figura 2. Comportamiento viscoso. (A) Harina nativa de maíz con sustitución del 25%. (B) Harina nativa de maíz con sustitución del 50%. (C) Harina extrusionada de maíz con sustitución del 25%. (D) Harina extrusionada de maíz con sustitución del 25%. Para el eje-y (izquierdo) ha de tenerse en cuenta la diferencia de rango entre las gráficas para harina nativa y las gráficas para harina extrusionada.

Respecto a los controles, todas las proteínas disminuyen la viscosidad de las mezclas durante el ciclo de calentamiento-enfriamiento, siendo esta disminución más notable con un 50% de sustitución. Goel y col., (1999) atribuyeron esta disminución en mezclas de almidón de maíz y caseína a que la cantidad de almidón disponible es menor. Sin embargo, no todas las proteínas disminuyen la viscosidad de la misma forma. Las proteínas pueden afectar el proceso de gelatinización de diferentes formas, dependiendo de su capacidad de retención de agua, su capacidad de interacción con las moléculas de almidón y su superficie (Ribotta & Rosell, 2010).

En presencia de harina nativa es la proteína de guisante la que menos disminuye el perfil de viscosidad, seguido por las proteínas de arroz y patata, y por último por la de gluten hidrolizado. En las mezclas de harina extrusionada se mantiene la misma tendencia, salvo a niveles de sustitución del 50%, donde la viscosidad de la mezcla de proteína de arroz se asemeja mucho a la mezcla de proteína de gluten hidrolizado, diferenciándose con una viscosidad ligeramente mayor en el pico de gelatinización. Las proteínas contienen muchos grupos hidrofílicos como $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ y $-SH$ en las cadenas laterales de alquilo, todos ellos capaces de formar enlaces con el almidón (Goel y col., 1999). Es posible que estas interacciones ocurran en las mezclas, en mayor o menor medida, dependiendo de la estructura de cada proteína. Por lo tanto, podemos decir que las diferencias de viscosidad entre las mezclas de cada proteína vienen definidas tanto por el almidón disponible como por las interacciones de cada proteína con el almidón, que dependerá de la complejidad estructural de cada una de ellas.

Con ambas harinas, las mezclas de proteína de arroz presentan un pico de viscosidad mayor que las mezclas de proteína de patata, pero la viscosidad final es más elevada para las mezclas de proteína de patata. El aumento de la viscosidad en el enfriamiento, normalmente atribuido a la cristalización de las cadenas de amilosa, puede estar afectado por la reorganización de las proteínas desnaturalizadas (Marco & Rosell, 2008c). Esta reorganización sería mayor para la proteína de patata, lo que justifica que la viscosidad final de sus mezclas supere a la de las mezclas de proteína de arroz.

Otro aspecto importante es la temperatura a la que ocurre la gelatinización. Todas las proteínas elevan la temperatura de gelatinización de las muestras, siendo la proteína de patata la que más influye, seguida de las proteínas de gluten, arroz y guisante. Se observa que dicha temperatura está inversamente correlacionada con la capacidad de retención de agua de las muestras, siendo las muestras con una capacidad de retención de agua más bajas las que presentan una temperatura de gelatinización más alta. Sun & Xiong (2014) observaron lo mismo para mezclas de proteína de cacahuete y almidón de guisante. Estas diferencias también pueden explicarse en base a la teoría de la doble capa eléctrica (Oosten, 1983). Según esta teoría, existe una doble capa eléctrica de cationes que rodea el almidón y excluye a los aniones, por lo tanto, los aniones no pueden penetrar y causar la gelatinización. Oosten, (1990) determinó que los aniones son los agentes gelatinizantes en estudios sobre el efecto de sales en la gelatinización del almidón. Las proteínas con una naturaleza anfotérica tendrán tanto cargas positivas como negativas. Las proteínas con una carga global positiva tendrán el efecto contrario a las

sales aniónicas, y por lo tanto dificultará la gelatinización del almidón. En base a esta teoría se podría deducir que la proteína de patata es la que tiene una carga positiva más pronunciada, seguida por la de gluten hidrolizado, arroz y guisante.

4.4. Propiedades viscoelásticas

El comportamiento viscoelástico de las muestras se encuentra reflejado en la figura 3. En el rango de frecuencias estudiado todas las muestras resultaron ser más elásticas que viscosas, con valores de G' mayores que los de G'' . Es importante señalar que el comportamiento viscoelástico de las mezclas de harina con proteína de patata no pudo medirse debido a una separación de fases en el RVA durante la elaboración de las muestras a esa concentración. Esto puede ser debido a que la carga positiva global de la proteína de patata repela gránulos de almidón, resultando en la separación de fases según la teoría de Oosten (1983), dando lugar a una mezcla no estable.

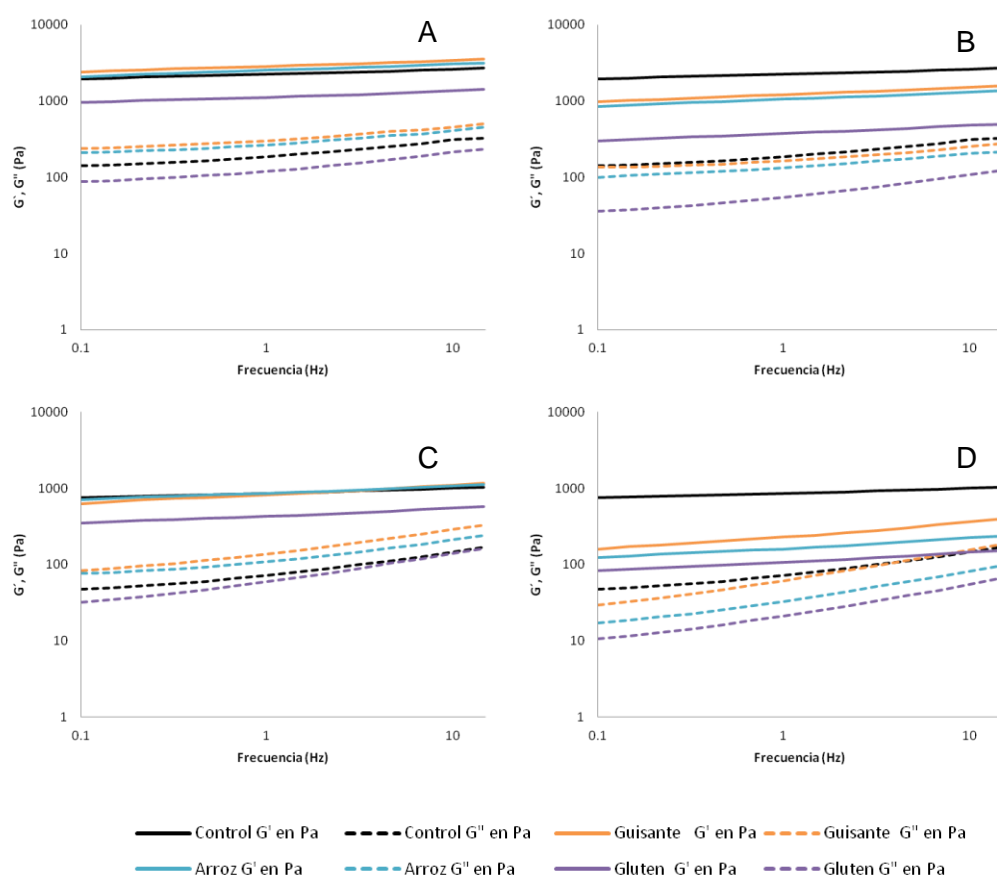


Figura 3. Barridos de frecuencia. (A) Harina nativa de maíz con sustitución del 25%. (B) Harina nativa de maíz con sustitución del 50%. (C) Harina extrusionada de maíz con sustitución del 25%. (D) Harina extrusionada de maíz con sustitución del 25%.

Para el resto de muestras podemos observar que el principal factor que afecta a los módulos elástico y viscoso es el tipo de harina, siendo las mezclas con harina extrusionada las que dieron valores de G' y G'' menores, y por tanto, indicando unas menores interacciones entre los componentes de dicha mezcla.

Las mezclas con proteína de guisante son las que menos difieren del comportamiento de los controles, presentando los valores más elevados en comparación al resto de mezclas, lo que sugiere un mayor número de interacción entre los componentes de la proteína con las harinas. Las mezclas con proteína de arroz presentan un comportamiento similar a las de la proteína de guisante, si bien en todos los casos sus mezclas presentan valores de G' y G'' menores. Por último, las mezclas con proteína de gluten hidrolizado son las que más se diferencian de los controles, presentando valores de los módulos mucho menores que los controles y menores que las mezclas de las otras proteínas. Estos resultados estarían de acuerdo con la capacidad de retención de agua observada para las mezclas. De hecho, otros autores ya encontraron una correlación positiva de los módulos con la capacidad de retención de agua (Dogan y col., 2005). Por otro lado, Ribotta & Rosell, (2010) compararon harina de maíz con harina de maíz tratada con endopeptidasas, observando que proteínas de bajo peso molecular pueden modificar las interacciones entre partículas de la fase dispersa y disminuir su adhesión, así como las propiedades de la matriz amilosa-amilopectina. Así, se puede concluir que por los resultados obtenidos todo parece indicar que las proteínas de guisante y arroz utilizadas tendrían un peso molecular parecido entre sí (siendo el de la proteína de guisante un poco mayor), mientras que la proteína de gluten hidrolizado tiene un peso molecular mucho más bajo, lo que justificaría que se comporten de forma diferente respecto a los controles, y que den lugar a una menor o más débil interacción con las harinas, reduciendo el valor de los módulos.

En la figura 4 está representado el factor de pérdidas ($\tan \delta$), que relaciona los módulos G' y G'' . Es una medida que compara la cantidad de energía perdida frente a la cantidad de energía almacenada durante un ciclo de deformación, es decir, indica si son las propiedades elásticas o las viscosas las que predominan (Ma & Barbosa-Cánovas, 1995). Se puede observar que para la harina nativa presenta valores mayores de $\tan \delta$ que para la harina extrusionada, lo cual indica que en la harina extrusionada predomina más la componente elástica que en la nativa. Por otro lado, todas las mezclas presentan valores por encima de los controles, lo cual indica que todas las mezclas predomina más la componente viscosa que en los controles, dando lugar a una estructura menos rígida.

Para las mezclas elaboradas con harina nativa no existe diferencia de comportamiento en función de la proteína, pero si en función del porcentaje, predominando la componente viscosa para niveles de sustitución del 50%. Cuando la harina utilizada fue la extrusionada, además de observarse las mismas diferencias en cuanto al nivel de sustitución, se observaron diferencias en función de la proteína empleada, predominando la componente viscosa más en las mezclas con proteína de guisante, seguida de las mezclas con proteína de arroz y proteína de gluten hidrolizada.

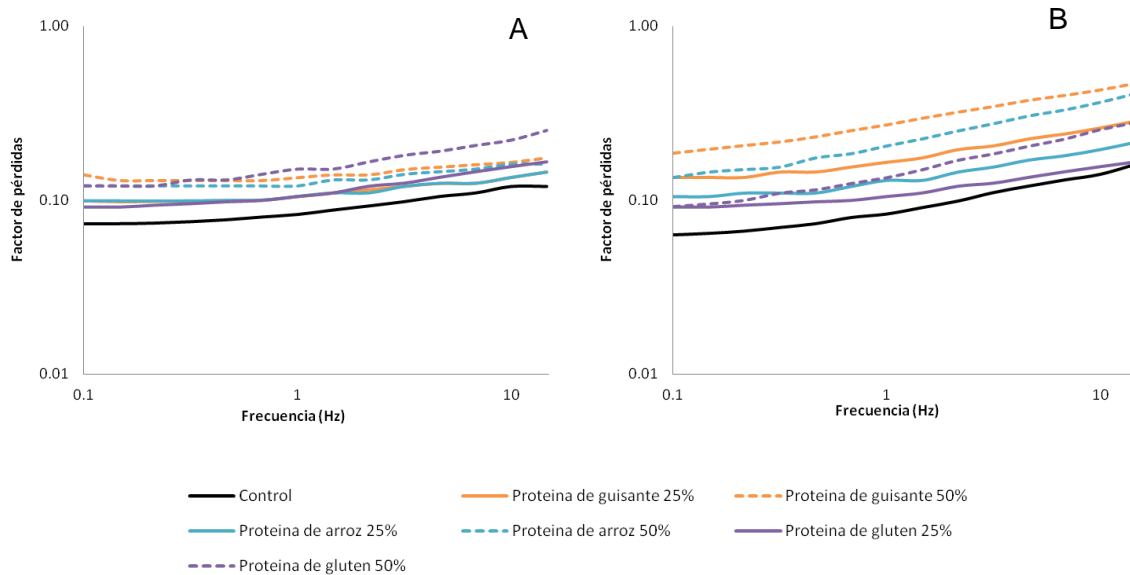


Figura 4. Factor de pérdidas de (A) mezclas con harina nativa y (B) mezclas con harina extrusionada.

Otro aspecto interesante a considerar es como evoluciona el factor de pérdidas respecto a la frecuencia. Podemos observar una dependencia mucho más acusada con la frecuencia de las muestras con harina extrusionada, que aumentan su componente viscosa respecto a la frecuencia, mientras que para las muestras con harina nativa este factor se mantiene más estable. Esta dependencia a la frecuencia indica un comportamiento más sólido a bajas frecuencias y más líquido a altas frecuencias para las mezclas con harina extrusionada, lo cual puede sugerir que el entrecruzamiento entre harina extrusionada-proteína es diferente al entrecruzamiento harina nativa-proteína. Las diferencias entre las mezclas vuelven a evidenciar que las propiedades de las mismas están definidas tanto por el tipo de harina como por la proteína utilizada, y que cada mezcla formará una estructura tridimensional diferente.

4.5. Textura y color

Los resultados de color y textura se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de textura y color de las harinas de maíz nativas y extrusionadas y sus mezclas con proteínas vegetales

	L*(Luminosidad)	a*	b*	Dureza (mN)	Penetración de ruptura (mm)
HN	74,24gh	-3,19a	26,2m	13926k	4,32de
HN-Patata 25%	63,52c	-2,29d	19,72hi	6984h	4,11bcde
HN-Gluten 25%	74,04gh	0,17g	24,26l	4282ef	3,61ab
HN-Arroz 25%	76,035ij	0,16g	17,39e	6245g	3,68abc
HN-Guisante 25%	68,85e	1,76i	20,47ij	6228g	4,31cde
HN-Patata 50%	56,30a	-2,88ab	15,30c	9556i	5,91gh
HN-Gluten 50%	70,31ef	0,72h	22,64k	594a	3,22a
HN-Arroz 50%	75,37hi	0,23g	17,59ef	3892de	3,60ab
HN-Guisante 50%	65,47d	3,62k	17,18e	2846c	3,71abcd
HE	77,33jk	-2,81b	22,05k	11954j	6,33hi
HE-Patata 25%	70,60f	-2,73bc	16,31d	7027h	6,74i
HE-Gluten 25%	72,97g	-1,24e	20,89j	4815f	5,27f
HE-Arroz 25%	76,76ijk	-0,34f	16,86de	10039i	5,57fg
HE-Guisante 25%	70,25ef	1,01h	18,41fg	4402ef	5,56fg
HE-Patata 50%	60,94b	-2,47cd	10,51a	6824gh	7,55j
HE-Gluten 50%	70,19ef	0,04g	19,05gh	539a	10k
HE-Arroz 50%	77,73k	0,35g	16,07cd	1472b	4,49e
HE-Guisante 50%	61,89b	3,14j	12,83b	3279cd	10k

Los valores con letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.5.1. Color

Respecto al color, los geles elaborados con harina nativa fueron más oscuros (valores de L* menores) que los elaborados con harina extrusionada, lo cual no coincide con las investigaciones de Martínez y col., (2014a, 2014b), pero esto puede deberse a que en sus investigaciones las harinas utilizadas fueron de arroz y trigo respectivamente y en nuestro caso se usan harinas de maíz amarillo.

A excepción de los geles con proteína de arroz, que no modificaron la luminosidad de los controles, la incorporación del resto de las proteínas resultó en una disminución de los valores de L*. Esta disminución fue más acusada para los niveles de sustitución del 50%. Las mezclas que más modificaron la luminosidad fueron las de patata, seguidas de las de guisante y por último las de gluten hidrolizado. La explicación a este hecho puede deberse al diferente color de las proteínas, que al mezclarse con las harinas da lugar a diferentes luminosidades. Bushuk y col., (1969) y Miskelly (1984) alegaron que este factor está muy asociado con el contenido proteico en harinas.

Para el parámetro a^* (eje verde-rojo) todos los valores se acotaron entre -3,19 y 3,62, siendo el gel con valores más negativos el elaborado solamente con harina nativa y el gel con valores más positivos el de harina nativa con un 50% de proteína de guisante. Respecto a los controles, todos los geles presentaron valores más positivos. Los geles elaborados con harina nativa presentaron valores más negativos que los elaborados con harina extrusionada. Las mezclas menos que modificaron este parámetro respecto al control fueron las mezclas de proteína de patata, seguida por las de proteínas de arroz y gluten hidrolizado, y por último la de guisante.

Para el parámetro b^* (eje azul-amarillo) todos los valores se acotaron entre 10,51 y 26,20, siendo el gel con valores más negativos el de harina extrusionada con un 50% de proteína de patata y el gel con valores más positivos el de harina nativa. Respecto a los controles, todos los geles presentaron una tendencia hacia valores más negativos. Los geles elaborados con harina nativa dieron valores más positivos que los elaborados con harina extrusionada. Las mezclas que menos modificaron este parámetro respecto al control fueron en todos los casos las realizadas con proteína de gluten hidrolizado, seguida por las mezclas de proteína de arroz, guisante y por último la de patata. Los valores obtenidos para la proteína de arroz a las sustituciones del 25% y el 50% indican que si bien a valores de sustitución reducidos los geles tienden hacia valores más negativos, los niveles de sustitución del 50% no incrementan este aspecto.

4.5.2. *Textura*

Respecto a los controles, todas las mezclas presentan una dureza significativamente diferente a ambas harinas. En vista de los resultados obtenidos en las pruebas de viscosidad, cabe esperar que sean los geles elaborados con proteína de guisante los que tengan una dureza más parecida a los geles control. Sin embargo, en general es la proteína de patata la que menos reduce la dureza de los geles con respecto a los controles. La retrogradación del almidón está influenciada en un principio por la cristalización de las cadenas de amilosa. Esta cristalización puede estar afectada por la reorganización de las proteínas desnaturalizadas (Marco & Rosell, 2008c). Más adelante, es la reorganización de la amilopectina la que más influencia la retrogradación. Es posible que diferentes proteínas afecten de diferente forma la reorganización de la amilopectina. En nuestro caso, son los geles con proteína de patata los que más se endurecen, lo cual parece indicar que esta proteína tiene un efecto endurecedor sobre las cadenas de amilopectina. Los geles que contienen proteína de gluten hidrolizado son los que menor

dureza presentan. Mientras que los geles que contienen proteínas de arroz y guisante dan valores intermedios sin seguir una tendencia generalizable. Para los geles de estas dos proteínas cuando la harina utilizada es la nativa, a niveles de sustitución del 25% no hay diferencias significativas entre estas dos proteínas, mientras que a niveles de sustitución del 50% la proteína de arroz da geles significativamente más duros. Cuando la harina utilizada es la extrusionada, a niveles de sustitución del 25% la proteína de arroz da geles significativamente más duros, pero a niveles de sustitución del 50% ocurre lo contrario. Esto nos indica que la organización del gel con proteínas de arroz y guisante está muy influenciada por el tipo de harina utilizada, mientras que los geles con proteínas de patata y gluten hidrolizado tienen un comportamiento más dependiente de las proteínas.

La penetración de ruptura es un buen indicador de la firmeza de los geles. Este parámetro está correlacionado con la capacidad de retención de agua ($r=0,3773$ y $p<0,05$), lo cual parece indicar que aquellas mezclas que son capaces de retener más agua son capaces de resistir durante más tiempo una fuerza de compresión sin romperse. Esta relación se cumple para los geles elaborados con las proteínas de guisante, arroz y gluten hidrolizado. Sin embargo, los geles elaborados con proteína de patata son los que presentan valores de penetración de ruptura más altos, mientras que sus mezclas son las que menos capacidad de retención de agua presentaban. Esto parece indicar que más que la capacidad de retención de agua, es la influencia de cada proteína sobre retrogradación del almidón el factor dominante.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en función del tipo de harina y proteína se obtienen mezclas con unas propiedades totalmente diferentes.

Las diferencias de comportamiento entre ambas harinas se deben a que una está extrusionada, y por lo tanto gelifica en frío, y la otra no. Por otro lado, las diferencias entre las proteínas están muy relacionadas con la estructura de estas y la forma en la que interaccionan con el medio. Las mezclas con las proteínas de guisante y arroz son las que presentan un comportamiento más similar a los controles, de tal forma que esto facilita su aplicación en panes, galletas y bizcochos. A niveles de sustitución elevados las mezclas elaboradas con estas proteínas dan geles poco duros. Por ello, estas proteínas no son recomendables para su aplicación en sucedáneos de queso y yogurt por el alto contenido en agua de estos. Por otro lado, las mezclas realizadas con las proteínas de gluten hidrolizado y patata son las que presentan un comportamiento más diferente a las

harinas, lo cual puede dificultar su aplicación en productos de panificación tradicionales, pero a su vez abre las puertas a su incorporación a otros productos que contengan cereales, como sucedáneos de mayonesas, yogures, quesos, etc, al tener estos una consistencia diferente a los productos de panificación tradicionales.

En términos generales se puede concluir que cada proteína tiene unas características intrínsecas que la diferencian de las demás, dejando la puerta abierta tanto a futuras investigaciones con otras proteínas como la aplicación de las mismas en productos.

6. Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi tutor, Manuel Gómez Pallarés, y al personal del Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia, especialmente a Laura Román Rivas, el apoyo recibido para la elaboración del presente estudio. Por otro lado, agradecer a Molendum Ingredients y a los proveedores de las proteínas por el suministro de las materias primas.

7. Bibliografía

- AACC International. Approved methods of Analysis. 11th edition. Method 61-02.01. Pasting properties. Approved 2012, Method 56-30.01. Water binding capacity. Approved 2012. AACC International. St. Paul (Minnesota, United States)
- Arentson-Lantz, E., Clairmont, S., Paddon-Jones, D., Tremblay, A., & Elango, R. (2015). Protein: A nutrient in focus 1. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(8), 755-761.
- Bauer, J., Biolo, G., Cederholm, T., Cesari, M., Cruz-Jentoft, A. J., Morley, J. E. & Visvanathan, R. (2013). Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(8), 542-559.
- Bonet, A., Blaszczyk, W., & Rosell, C. M. (2006). Formation of homopolymers and heteropolymers between wheat flour and several protein sources by transglutaminase-catalyzed cross-linking. *Cereal Chemistry* 83(6), 655-662.
- Bushuk, W., Briggs, K. G., & Shebeski, L. H. (1969). Protein quantity and quality as factors in the evaluation of bread wheats. *Canadian Journal of Plant Science*, 49(2), 113-122.
- Camire, M. E., Camire, A., & Krumhar, K. (1990). Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(1), 35-57.

- Chinma, C. E., Ariahu, C. C., & Abu, J. O. (2013). Chemical composition, functional and pasting properties of cassava starch and soy protein concentrate blends. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1179-1185.
- Chiu, C. W., & Solarek, D. (2009). Modification of starches. *Starch: Chemistry and Technology*, 3, 629-655.
- Culbertson, J. (2006). Food Protein Functionality, Handbook of food science, Technology, and Engineering volume 1. CRC Press. Boca Ratón (Florida, United States).
- Damodaran, S. (2008). Amino acids, Peptides and Proteins, Fennema's Food Chemistry, 4th edition. CRC Press. Boca Ratón (Florida, United States).
- De la Hera, E., Gomez, M., & Rosell, C. M. (2013). Particle size distribution of rice flour affecting the starch enzymatic hydrolysis and hydration properties. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 421-427.
- Delcour, J., & Hosney, R. C. (2010). Principles of cereal science and technology. Third edition. AACC International. St. Paul, (Minnesota, United States).
- Dogan, S. F., Sahin, S., & Sumnu, G. (2005). Effects of soy and rice flour addition on batter rheology and quality of deep-fat fried chicken nuggets. *Journal of Food Engineering*, 71, 127-132.
- Doublier, J. L., Colonna, P., & Mercier, C. (1986). Extrusion cooking and drum drying of wheat starch. II. Rheological characterization of starch pastes. *Cereal Chemistry*, 63(3), 240-246.
- FAO/WHO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. (WHO Technical Report Series, No. 935) (Genova, Switzerland)
- Fulgoni, V. L. (2008). Current protein intake in America: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003–2004. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1554S-1557S.
- Gallagher, E., Kunkel, A., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2003). The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 218(1), 44-48.
- Gallagher, E., Kenny, S., & Arendt, E. K. (2005). Impact of dairy protein powders on biscuit quality. *European Food Research and Technology*, 221(3-4), 237-243.
- Gani, A., Broadway, A. A., Masoodi, F. A., Wani, A. A., Maqsood, S., Ashwar, B.A & Gani, A. (2015). Enzymatic hydrolysis of whey and casein protein-effect on functional, rheological,

- textural and sensory properties of breads. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7697-7709.
- Goel, P. K., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1999). Studies on interactions of corn starch with casein and casein hydrolysates. *Food Chemistry*, 64(3), 383-389.
- Gularte, M. A., Gómez, M., & Rosell, C. M. (2012). Impact of legume flours on quality and in vitro digestibility of starch and protein from gluten-free cakes. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 3142-3150.
- Hagenimana, A., Ding, X., & Fang, T. (2006). Evaluation of rice flour modified by extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 43(1), 38-46.
- Houston, D. K., Nicklas, B. J., Ding, J., Harris, T. B., Tylavsky, F. A., Newman, A. B. & Kritchevsky, S. B. (2008). Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(1), 150-155.
- Jacobs, H., & Delcour, J. A. (1998). Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2895-2905.
- Jamilah, B., Mohamed, A., Abbas, K. A., Rahman, R. A., Karim, R., & Hashim, D. M. (2009). Protein-starch interaction and their effect on thermal and rheological characteristics of a food system: A review. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(2), 169-174.
- Kohajdová, Z., Karovičová, J., & Magala, M. (2013). Rheological and qualitative characteristics of pea flour incorporated cracker biscuits. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 5(1), 11-17.
- Kristo E., Corredig M. (2015). *Functional Properties of Food Proteins, Applied Food Protein Chemistry*. John Wiley & Sons. Wiley Blackwell (Michigan, United States).
- Krupa-Kozak, U., Bączek, N., & Rosell, C. M. (2013). Application of dairy proteins as technological and nutritional improvers of calcium-supplemented gluten-free bread. *Nutrients*, 5(11), 4503-4520.
- Larrosa, V., Lorenzo, G., Zaritzky, N., & Califano, A. (2016). Improvement of the texture and quality of cooked gluten-free pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 70, 96-103.
- Le Corre, D., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Starch nanoparticles: a review. *Biomacromolecules*, 11(5), 1139-1153.
- Ma, L., & Barbosa-Canovas, G.V. (1995b) Rheological characterization of mayonnaise. Part II: Flow and viscoelastic properties at different oil and xanthan gum concentrations. *Journal of Food Engineering*, 25, 409-425.

- Mancebo, C. M., Rodríguez, P., & Gómez, M. (2016). Assessing rice flour-starch-protein mixtures to produce gluten free sugar-snap cookies. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 127-132.
- Mancebo, C. M., Picón, J., & Gómez, M. (2015). Effect of flour properties on the quality characteristics of gluten free sugar-snap cookies. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 264-269.
- Mamerow, M. M., Mettler, J. A., English, K. L., Casperson, S. L., Arentson-Lantz, E., Sheffield-Moore, M. & Paddon-Jones, D. (2014). Dietary protein distribution positively influences 24-h muscle protein synthesis in healthy adults. *The Journal of Nutrition*, 144(6), 876-880.
- Marco, C., & Rosell, C. M. (2008a). Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 132-139.
- Marco, C., & Rosell, C. M. (2008b). Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1205-1213.
- Markets & Markets (2015). <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/protein-ingredients-market-114688236.html> (Consultada el 6/06/2016)
- Marti, A., Barbiroli, A., Marengo, M., Fongaro, L., Iametti, S., & Pagani, M. A. (2014). Structuring and texturing gluten-free pasta: egg albumen or whey proteins?. *European Food Research and Technology*, 238(2), 217-224.
- Martínez, M. M., Calviño, A., Rosell, C. M., & Gómez, M. (2014a). Effect of different extrusion treatments and particle size distribution on the physicochemical properties of rice flour. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2657-2665.
- Martínez, M. M., Rosell, C. M., & Gómez, M. (2014b). Modification of wheat flour functionality and digestibility through different extrusion conditions. *Journal of Food Engineering*, 143, 74-79.
- Matos, M. E., & Rosell, C. M. (2011). Chemical composition and starch digestibility of different gluten-free breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(3), 224-230.
- Matos, M. E., Sanz, T., & Rosell, C. M. (2014). Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. *Food Hydrocolloids*, 35, 150-158.
- Mercier, C., & Feillet, P. (1975). Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products (Wheat, rice, corn). *Cereal Chemistry*. 52, 283-297.
- Millward, D. J. (2001). Protein and amino acid requirements of adults: current controversies. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 26(S1), S130-S140.

- Miñarro, B., Albanell, E., Aguilar, N., Guamis, B., & Capellas, M. (2012). Effect of legume flours on baking characteristics of gluten-free bread. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 476-481.
- Miskelly, D. M. (1984). Flour components affecting paste and noodle color. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(4), 463-471.
- Moore, M. M., Heinbockel, M., Dockery, P., Ulmer, H. M., & Arendt, E. K. (2006). Network formation in gluten-free bread with application of transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 83(1), 28-36.
- Nammakuna, N., Barringer, S. A., & Ratanatriwong, P. (2015). The effects of protein isolates and hydrocolloids complexes on dough rheology, physicochemical properties and qualities of gluten-free crackers. *Food Science & Nutrition*. 4 (2), 143-155.
- Oosten, B. J. (1983). Explanations for Phenomena Arising from Starch-Electrolytes Interactions. *Starch-Stärke*, 35(5), 166-169.
- Oosten, B. J. (1990). Interactions between starch and electrolytes. *Starch-Stärke*, 42(9), 327-330.
- Owusu-Ansah, J., Van de Voort, F. R., & Stanley, D. W. (1983). Physicochemical changes in corn starch as a function of extrusion variables. *Cereal Chemistry*, 60(4), 319-324.
- Padalino, L., Mastromatteo, M., Vita, P., Ficco, M., Bianca, D., & Del Nobile, M. A. (2013). Effects of hydrocolloids on chemical properties and cooking quality of gluten-free spaghetti. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(5), 972-983.
- Paddon-Jones, D., & Rasmussen, B. B. (2009). Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia: protein, amino acid metabolism and therapy. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12(1), 86.
- Puerta-Gomez, A. F., & Castell-Perez, M. E. (2016). Studies on self-assembly interactions of proteins and octenyl succinic anhydrate (OSA)-modified depolymerized waxy rice starch using rheological principles. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(27).
- Rhodes, D., Clemens, J., Goldman, J., Lacombe, R., & Moshfegh, A. (2012). 2009-2010 What We Eat In America, NHANES Tables 1-36. *Worldwide Web Site: Food Surveys Research Group*.
- Ribotta, P. D., Ausar, S. F., Morcillo, M. H., Pérez, G. T., Beltramo, D. M., & León, A. E. (2004). Production of gluten-free bread using soybean flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1969-1974.
- Ribotta, P. D., & Rosell, C. M. (2010). Effects of enzymatic modification of soybean protein on the pasting and rheological profile of starch-protein systems. *Starch-Stärke*, 62(7), 373-383.

- Ronda, F., Oliete, B., Gómez, M., Caballero, P. A., & Pando, V. (2011). Rheological study of layer cake batters made with soybean protein isolate and different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 272-277.
- Sarabhai, S., Indrani, D., Vijaykrishnaraj, M., Kumar, V. A., & Prabhasankar, P. (2015). Effect of protein concentrates, emulsifiers on textural and sensory characteristics of gluten free cookies and its immunochemical validation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3763-3772.
- Segura, M. E. M., & Rosell, C. M. (2011). Chemical composition and starch digestibility of different gluten-free breads. *Plant Foods for Human Nutrition*. 66(3), 224-230.
- Seker, M. (2005). Selected properties of native or modified maize starch/soy protein mixtures extruded at varying screw speed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7), 1161-1165.
- Sharma, P., Singh, V., & Subramanian, R. (2013). Pasting, swelling, and solubility characteristics of rice batter prepared from different wet grinding systems. *Starch-Stärke*, 65(5-6), 374-381.
- Storck, C. R., da Rosa Zavareze, E., Gularte, M. A., Elias, M. C., Rosell, C. M., & Dias, A. R. G. (2013). Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 346-354.
- Sun, Q., & Xiong, C. S. L. (2014). Functional and pasting properties of pea starch and peanut protein isolate blends. *Carbohydrate polymers*, 101, 1134-1139.
- Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Chinkes, D. L., Ferrando, A. A., & Paddon-Jones, D. (2009a). Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity. *Journal of Applied Physiology*, 107(1), 34-38.
- Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Wolfe, R. R., & Paddon-Jones, D. (2009b). A moderate serving of high-quality protein maximally stimulates skeletal muscle protein synthesis in young and elderly subjects. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(9), 1582-1586.
- Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (2004). Protein and amino acids for athletes. *Journal of Sports Sciences*, 22(1), 65-79.
- Tömösközi, S., Lásztity, R., Haraszi, R. and Baticz, O. (2001), Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung*, 45, 399-401.

- Tran, T. T., Shelat, K. J., Tang, D., Li, E., Gilbert, R. G., & Hasjim, J. (2011). Milling of rice grains. The degradation on three structural levels of starch in rice flour can be independently controlled during grinding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3964-3973.
- Van Koningsveld, G. A., Walstra, P., Voragen, A. G., Kuijpers, I. J., Van Boekel, M. A., & Gruppen, H. (2006). Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(17), 6419-6427.
- Van Riemsdijk, L. E., Van der Goot, A. J., & Hamer, R. J. (2011). The use of whey protein particles in gluten-free bread production, the effect of particle stability. *Food Hydrocolloids*, *25*(7), 1744-1750.
- Volpi, E., Campbell, W. W., Dwyer, J. T., Johnson, M. A., Jensen, G. L., Morley, J. E., & Wolfe, R. R. (2013). Is the optimal level of protein intake for older adults greater than the recommended dietary allowance?. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *68*(6), 677-681.
- Walker, D. K., Dickinson, J. M., Timmerman, K. L., Drummond, M. J., Reidy, P. T., Fry, C. S. & Rasmussen, B. B. (2011). Exercise, amino acids and aging in the control of human muscle protein synthesis. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *43*(12), 2249.
- Wang, J. S., Zhao, M. M., Yang, X. Q., Jiang, Y. M., & Chun, C. (2007). Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. *Food Hydrocolloids*, *21*(2), 174-179.
- Wen, L. F., Rodis, P., & Wasserman, B. P. (1990). Starch fragmentation and protein insolubilization during twin-screw extrusion of corn meal. *Cereal Chemistry*, *67*(3), 268-275.
- Were, L., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*, *62*(4), 821-824.
- Wijeratne, W. B. (2005). Propiedades funcionales de las proteínas de soya en un sistema de alimentos. *Industria Alimentaria (México)*, *27*(6), 10-18.
- Wolf, B. (2010). Polysaccharide functionality through extrusion processing. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *15*(1), 50-54.
- Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *18*(6), 969-976.
- Yi, C., Gao, W., Zhong, C., & He, Y. (2014). Effect of alkaline-soluble proteins on pasting properties of nonwaxy rice flour. *Cereal Chemistry*, *91*(5), 502-507.

- Young, V. R., & Borgonha, S. (2000). Nitrogen and amino acid requirements: the Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern. *The Journal of Nutrition*, 130(7), 1841S-1849S.
- Yu, L., Ramaswamy, H. S., & Boye, J. (2013). Protein rich extruded products prepared from soy protein isolate-corn flour blends. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 279-289.
- Zhang, W., Li, S., Zhang, B., Drago, S. R., & Zhang, J. (2016). Relationships between the gelatinization of starches and the textural properties of extruded texturized soybean protein-starch systems. *Journal of Food Engineering*, 174, 29-36.
- Ziobro, R., Witczak, T., Juszczak, L., & Korus, J. (2013). Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 213-220.
- Ziobro, R., Juszczak, L., Witczak, M., & Korus, J. (2016). Non-gluten proteins as structure forming agents in gluten free bread. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 571-580.