



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA E INGENIERÍA
AGROALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

TESIS DOCTORAL:

**Interacciones proteína-almidón y su
aplicación en sistemas modelo**

Presentada por Ángela Bravo Núñez para optar al
grado de
Doctor/a con mención internacional por la
Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Manuel Gómez Pallarés

AGRADECIMIENTOS

Creo que es imposible escribir una tesis doctoral completamente solo. Aunque se me olviden algunos nombres, mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una forma o de otra me han ayudado.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi director, Manuel Gómez Pallarés, tanto por el apoyo como por las aportaciones fundamentales durante el desarrollo de esta tesis. También por toda la paciencia y dedicación, así como todas las oportunidades formativas fuera de la Universidad de Valladolid (estancias, congresos, etc) a lo largo de estos años.

Gracias a Lara Matia Merino, por darme la oportunidad de realizar una estancia en Massey University (Nueva Zelanda) y enseñarme tanto nuevas técnicas como otra forma de trabajar, que sin duda han tenido un impacto muy positivo en mi formación doctoral. Y como no, también gracias por todos tus buenos consejos (tanto profesionales como personales). Eres una profesional y una persona estupenda, y espero que no perdamos el contacto.

Gracias a toda la gente que el doctorado ha puesto en mi camino, especialmente a Montse Prieto y Marta Sahagún. Gracias por TODOS los momentos juntas. Por qué habéis sido para mí mucho más que las mejores compañeras que hubiera podido desear, y os habéis convertido en grandes amigas. Gracias por todo lo que me habéis ayudado tanto dentro como fuera de la universidad. Nuestro camino juntas no termina aquí. No me olvido del resto de mis compis de batallas. Laura Román, Blas Franco, Felipe Rocha, Mayara Belorio y el resto de estudiantes que han pasado por aquí, gracias por vuestra compañía en el laboratorio, los cafés, las comidas, esos ratitos de desconexión entre experimento y experimento que dan la vida y las escapadas fuera de la universidad. Nada hubiera sido igual sin vosotros.

Gracias a todas las personas que han contribuido de una forma u otra en los artículos que forman parte de esta tesis. Cristina Molina Rossell, Raquel Garzón, Paula Martínez, Thais Sander, Edy Alcalá, Andrés Bravo Núñez y (de nuevo) Manuel Gómez y Marta Sahagún.

Gracias a la Universidad de Valladolid por concederme un contrato predoctoral, así como ayudas de movilidad de estancia y de congreso. Gracias también a Celia Redondo y Rocío Barroso, por todo el apoyo administrativo y por hacerme los tramites un poquito más fáciles.

Thanks to all the amazing people I meet in New Zealand. A big big thank you to Heather and Alan McClean. For treating me so well, and being somehow my “kiwi parents”. You truly made me feel like in home the few months I lived with you. Also thanks to the amazing group of people I had the chance to meet there. To my lab mates Du Le, Marina, Feng Ming

and Haz, thanks for always helping me when I was a bit lost. To the rest of my friends there (Specially to Nico, David, Paul, Tin Yung, Laura, Kate, Seba, Florencia, Sebastian, Eli, Gonzalo, Sarah, Dong, Diana, Ray, Thibaut, Rayen and Coraline), because discovering the amazing landscapes of New Zealand, going to see a rugby game or just having a beer after a long day of work wouldn't had been the same without you. Special thanks to Laura Teuma and Rayen León, you are the example that when away from "home" we develop deep friendship bonds that are not easy to break. But above anyone I met in NZ, thanks to Paul Chambonniere. I really admire how passionate and constant you are with everything you do, and I am happy for being able to share life with you. Thanks for all your support and love in the final stage of my PhD. The best is yet to come.

Gracias a Elena Martín e Irene Gonzalez. Por ser y por estar siempre. Por reiros de la vida a mi lado y ponerme los pies en la tierra de vez en cuando. No tengo ninguna duda de que tengo las mejores amigas del mundo.

También gracias a Manuel Cabezudo, por aparecer en mi vida, aguantarme en momentos que ni yo me aguantaba, apoyarme, darme muy buenos consejos y hacerme reír. Si no hubiera sido por ti quizás no estaría escribiendo estas líneas.

Por último, pero no por ello menos importantes, gracias a mi familia. Especialmente a mis padres, Pilar Núñez y Felipe Bravo, y (de nuevo) a mi hermano Andrés Bravo. Esta tesis os la dedico a vosotros. Creo que no hubiera llegado hasta aquí sin vuestro apoyo incondicional a lo largo de estos años. Gracias por creer en mí, por estar a mi lado en los malos y los buenos momentos y por intentar entenderme siempre. Y también, gracias por leeros mi tesis y ejercer de revisores en la sombra. La familia no se elige, pero yo os elegiría a vosotros una y mil veces. Y por supuesto también gracias a Pancho, el hermano postizo de cuatro patas, por que tus ladridos, carreras y lametones son la mejor cura a todos los problemas. Os quiero mucho.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	5
Introducción	9
<u>Necesidades proteicas de la población</u>	11
<u>El almidón y su funcionalidad</u>	14
El almidón	14
Propiedades físico-químicas del almidón	15
<u>Proteínas y su funcionalidad</u>	21
Aspectos generales de las proteínas y clasificación	21
Propiedades nutricionales de las proteínas	23
Propiedades funcionales de las proteínas	24
Proteínas presentes en productos horneados a base de cereales	29
<u>Enriquecimiento proteico de productos horneados a base de cereales</u>	34
Efecto de diferentes proteínas sobre las propiedades del almidón	35
Panes sin gluten enriquecidos proteicamente	43
Bizcochos enriquecidos proteicamente	51
Galletas “Sugar-snap” enriquecidas proteicamente	55
<u>Bibliografía</u>	59
Objetivos y estructura	71
<u>Objetivos de la tesis doctoral</u>	73
Objetivo general	73
Objetivos específicos	73
<u>Estructura de la tesis doctoral</u>	74
Sección 1: Interacciones proteína almidón	74
Sección 2: Aplicación de las interacciones proteína-almidón en sistemas modelo	74
Sección 1: Interacciones proteína almidón	77
<u>Physicochemical properties of native and extruded maize flours in the presence of animal proteins</u>	79
<u>Assessing the influence of vegetal protein source on the physicochemical properties of maize flours</u>	107
<u>Evaluation of starch–protein interactions as a function of pH</u>	131

Sección 2: Aplicación de las interacciones proteína-almidón en sistemas modelo	151
<u>Assessing the importance of protein interactions and hydration level on protein-enriched gluten-free breads: a novel approach</u>	153
<u>Mixture design for the optimization of protein-enriched gluten-free layer cakes</u>	175
<u>Incorporation of gluten and hydrolysed gluten proteins has different effects on dough rheology and cookie characteristics</u>	201
Conclusiones	219
Conclusions	223

RESUMEN

La demanda de productos con un elevado contenido proteico está en auge, tanto por las necesidades específicas de algunos sectores de la población (personas mayores, atletas o mujeres embarazadas) como por el interés que despiertan en la población en general. En el campo de los productos a base de cereales, se han realizado estudios de las interacciones proteína-almidón, con el objetivo de entender el efecto de las proteínas sobre el comportamiento del almidón. Esto es importante porque el almidón es el componente mayoritario de los productos horneados a base de cereales y tiene un efecto importante en las cualidades de los mismos. Por otro lado, también existen estudios sobre enriquecimiento proteico de productos horneados a base de cereales. El problema que existe con la bibliografía actual es la gran variabilidad en cuanto a tipos de proteínas, porcentajes, formulaciones, condiciones experimentales, etc.; lo cual hace difícil hacer una comparativa y poder entender el efecto de cada proteína. Además, los porcentajes proteicos incluidos son en general bajos.

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de las interacciones de proteínas animales y vegetales con el almidón a altos niveles proteicos, y su aplicación en el desarrollo de productos horneados a base de cereales.

Se ha estudiado la influencia de cuatro proteínas animales (colágeno, leche, suero de leche y albúmina de huevo) y cuatro vegetales (guisante, arroz, gluten hidrolizado y patata) en el comportamiento de harina de maíz. Las proteínas de colágeno, leche, arroz y guisante incrementaron las propiedades de hidratación de la harina de maíz, mientras que las proteínas de albúmina de huevo, suero de leche, gluten hidrolizado y patata las disminuyeron. Respecto a la evolución de la viscosidad de la harina durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento, también se vio afectada por la presencia de las distintas proteínas. Así, las proteínas de colágeno, leche, suero de leche y las cuatro proteínas vegetales estudiadas decrecieron la viscosidad en todos los puntos de la curva, mientras que la presencia de proteína de albúmina de huevo la aumentó drásticamente. Además,

las temperaturas de gelatinización también se vieron incrementadas por la presencia proteica, de forma más evidente con la proteína de albúmina huevo. Cuando se evaluó el efecto del pH (4.5, 6.0, y 7.5), con mezclas de almidón de maíz con proteínas de guisante, arroz, albúmina de huevo y suero de leche, se observó que la capacidad de fijación de agua fue mayor a pHs cercanos a los puntos isoeléctricos de las proteínas, donde estas son menos solubles. Además, las mezclas a pHs ácidos dieron picos de viscosidad más bajos, menos en el caso de las mezclas con proteína de albúmina de huevo, donde el pico se vio incrementado. Respecto a la dureza, en general los geles con proteína presentaron durezas menores a los geles con solo almidón, sin haber diferencias significativas entre pHs.

En base a estos primeros resultados, se seleccionaron algunas de estas proteínas para realizar un enriquecimiento proteico de productos horneados a base de cereales (panes sin gluten, bizcochos sin gluten y galletas) mediante la sustitución de hasta un 45% de la harina/almidón por proteínas. Debido a que algunas proteínas presentaron efectos antagónicos sobre las propiedades del almidón, algunos enriquecimientos proteicos de productos (los de panes sin gluten y bizcochos sin gluten) también se realizaron con mezclas de las mismas, con la hipótesis de que el uso de mezclas podría resultar en productos finales con características más parecidas a las de los productos sin enriquecer.

En el enriquecimiento proteico de los panes sin gluten, se estudió el efecto de las proteínas de albúmina de huevo, guisante y mezclas de ambas proteínas al sustituir almidón por un 30% de proteína en las características de las masas y los productos finales. Además, se realizó un ajuste de la humedad de cada formulación, con el objetivo de obtener panes con un volumen específico similar al volumen del pan de molde disponible en el mercado ($5.5 \pm 0.5 \text{ cm}^3/\text{g}$). Los resultados mostraron que los niveles de hidratación necesarios para alcanzar dicho volumen se vieron incrementados al aumentar la proporción de proteína de guisante en las mezclas. Respecto a las propiedades viscoelásticas de las masas, con el ajuste de humedad optimizado en cada caso para conseguir volúmenes finales de $5.5 \pm 0.5 \text{ cm}^3/\text{g}$, todas las formulaciones con proteína

disminuyeron los valores del módulo elástico respecto al control; de una forma más marcada a medida que se aumentó la cantidad de albúmina de huevo. En la textura de los panes sin gluten se observó un comportamiento totalmente diferente, aumentando esta a medida que aumentaba la proporción de albúmina de huevo, y disminuyendo al aumentar la proporción de guisante. Sin embargo, el pan enriquecido a partes iguales con albúmina de huevo y guisante no presentó diferencias significativas con el control en términos de dureza. Por otra parte, en los panes enriquecidos exclusivamente con albúmina de huevo, se observó una estructura de la miga cerrada y uniforme, con pequeñas burbujas de aire distribuidas uniformemente. La presencia de proteína de guisante en la mezcla proteica incrementó el tamaño de dichas burbujas, presentando la estructura de miga más abierta los panes enriquecidos con albúmina de huevo y guisante a partes iguales. A partir de este punto, la estructura se volvió a cerrar progresivamente con el aumento de la proporción de proteína de guisante, aunque no se llegó a una estructura tan cerrada y uniforme como cuando solo estaba presente proteína de albúmina de huevo.

El enriquecimiento proteico de bizcochos se realizó sustituyendo un 45% de la harina con proteínas de guisante, suero de leche y albúmina de huevo, así como mezclas de las mismas. Un mayor contenido de proteína de guisante aumentó los valores de hidratación, así como la densidad y viscosidad, pero dio lugar a bizcochos con durezas menores que aquellos donde la proporción de suero de leche y/o albúmina de huevo en la mezcla proteica dominaba, siendo la dureza mayor al aumentar la proporción de albúmina de huevo. Además, el aumento de la proporción de esta proteína resultó en un aumento de la cohesividad. Por otra parte, el volumen específico aumentó a medida que se aumentó la proporción de proteína de suero de leche en la mezcla. Además de estas tendencias generales, se observaron interacciones, especialmente en la densidad, donde algunas mezclas proteicas dieron lugar a densidades mayores que aquellas observadas con cada proteína de manera individual (e.g. masa con mezclas proteicas con una proporción de albúmina de huevo del 60-80% resultaron en densidades más altas que masas

enriquecidas exclusivamente con dicha proteína). El análisis sensorial confirmó que la aceptabilidad de este tipo de bizcochos puede mejorarse aplicando mezclas de mayoritariamente suero y guisante.

El enriquecimiento proteico de galletas se realizó con proteínas de gluten y gluten hidrolizado, sustituyendo un 15, 30 o 45% de la harina. Se observó un incremento de las propiedades de hidratación al aumentar el contenido proteico. La viscoelasticidad de las masas también se vio afectada, dando lugar a masas más elásticas al incrementar el contenido proteico cuando la proteína no estaba hidrolizada, pero más viscosas cuando si lo estaba. Respecto a las características de las galletas, la presencia de la proteína sin hidrolizar resultó en galletas con un menor diámetro y una dureza mayor, mientras que la presencia de la proteína hidrolizada aumentó el diámetro, pero no modificó la dureza respecto al control. Las características sensoriales también se vieron afectas por la presencia proteica. Así, la proteína hidrolizada tuvo un efecto negativo en el sabor, llegando a empeorar la aceptabilidad general cuando el nivel de proteína fue del 45%, mientras que la proteína sin hidrolizar mejoró la percepción visual pero no modificó la aceptabilidad general respecto a la galleta control.

ABSTRACT

There is an increasing demand for high protein food products, both because of the special needs of some sectors of the populations (elderly people, athletes or pregnant women), and also because of the growing interest for this kind of products by the general population. In the area of cereal science, some research has been conducted regarding the interactions between proteins and starch, with the objective of understanding the effect that proteins have on the behaviour of starch. This is important because starch is the main component of cereal-based baked products, and therefore has an important effect on their characteristics. In addition, there are also some studies about protein-enrichment of these kind of products. Despite of this, the available research presents a high variability in terms of the used proteins, percentages, formulations, experimental conditions, etc. All this makes difficult the comparison of the results, and therefore the understanding the effect that each protein has both in the behaviour of starch and in the characteristics of the final products. On top of this, the used protein percentages are usually low.

Thus doctoral thesis focus on the study of the interactions that take place between animal and vegetal proteins with starch at high protein levels, and their further application in the development of cereal-based baked products.

The effect of four animal (collagen, milk, whey and egg albumin) and four vegetal (pea, rice, hydrolysed gluten and potato) proteins on the behaviour of maize flour was studied. Collagen, milk, rice and pea proteins increased the hydration properties of the flour, while egg albumin, whey, hydrolysed gluten and potato proteins decreased them. The viscosity evolution of the flour during a heating and cooling cycle was also affected by the presence of the different proteins. Collagen, milk, whey and the four vegetal proteins decreased the viscosity along all the curve, while the presence of egg albumin increased it drastically. In addition, gelatinization temperatures were also increased by the presence of proteins, more evidently with the presence of egg white protein. When the effect of the pH (4.5, 6.0 and 7.5) was evaluated, on mixtures of maize starch and pea, rice, egg white or whey

proteins, it was observed that the water binding capacity was higher at the pHs close to the isoelectric point of the proteins, where they are less soluble. In addition, the mixtures at more acid pHs gave lower viscosity peaks, with the exception of the mixtures with egg albumin protein, where viscosity peak was increased. Regarding hardness, in general the gels where proteins were present showed lower hardness than those elaborated only with starch, and no significant differences were found between pHs.

On the basis of these first results, some of the used proteins were selected to perform a protein enrichment of cereal-based baked products (gluten-free breads, gluten-free cakes, and cookies), by the substitution of up to 45% of the starch/flour with proteins. Because some of the proteins showed antagonist effects on the starch/flour properties, some of the enrichments were made with protein mixtures (for gluten-free breads and gluten-free cakes), with the hypothesis that the usage of mixtures could result in final products with more similar characteristics to those of the unenriched products.

In the protein enrichment of gluten-free breads, the effect of egg albumin and pea proteins, and their mixtures, when substituting 30% of the starch by proteins was evaluated both on the batter and final product characteristics. In addition, a hydration adjustment was done for each formulation, with the objective of obtaining breads with a specific volume similar to the one of a commercial bread ($5.5 \pm 0.5 \text{ cm}^3/\text{g}$). Results showed that the needed hydration levels to achieve the target volume were increased when pea ratio of the mixtures was higher. Regarding the viscoelasticity of the doughs, with the hydration optimized in each formulation, all the formulations with protein decreased the elastic modulus respect the control, more evidently when increasing the quantity of egg albumin protein. For hardness a progressive increase was observed when increasing the egg albumin protein content, while it decreased when increasing the pea protein content of the protein mixture. The bread with the same level of these two proteins showed no significant differences with the control. Regarding the structure of the crumb, breads enriched with exclusively with egg albumin protein showed a close and uniform structure, with small bubbles uniformly distributed. The presence of pea protein increased the size of these bubbles, presenting the crumb a more open structure in the breads with the same

amount of the two used proteins. Further increase in pea protein resulted again in a progressive decrease on the bubbles size, although they structure of the crumb with only pea protein was not as close and uniform as the one of the breads enriched with only egg albumin protein.

The protein enrichment of gluten-free cakes was performed by substituting 45% of the flour by pea, whey or egg albumin proteins, as well as their mixtures. A mixture design approach was used to determine the interaction effects of the three proteins on gluten-free batter and cake physical characteristics. A higher pea protein ratio increased hydration values, as well as density and viscosity, but gave place to softer cakes than those where the ratio of whey and/or egg albumin ratio was higher, being the cakes harder when increasing egg albumin ratio. In addition, higher ratios of this protein also increased cohesiveness. For its part, specific volume increased when increasing the ratio of whey in the protein mixture. In addition to these general trends, interactions between proteins were found to occur for some of the measured characteristics, especially for batter density, where some of the batters with protein mixtures presented higher densities than batters with only one protein (e.g. batters with protein mixtures with an egg albumin protein ratio of 60-80% had higher densities than the batter enriched with only this protein). Sensory analysis confirmed that acceptability of these kind of cakes can be improved applying mixtures of mainly whey and pea proteins.

Protein enrichment of cookies was performed with gluten and hydrolysed-gluten proteins, substituting a 15, 30 or 45% of the flour. Hydration properties were boosted by the presence of proteins. Viscoelasticity of the doughs was also affected, being the doughs more elastic when incorporating gluten protein, but more viscous when the incorporating the hydrolysed protein. Regarding cookies characteristics, presence of gluten protein resulted in cookies with a smaller diameter and a higher hardness, while the hydrolysed protein increased the diameter without modifying hardness respect an unenriched cookie. Sensory attributes were also affected by the protein presence. The hydrolysed protein had a negative effect on the flavour, and acceptability was decreased at protein levels of 45%.

For its part, gluten protein improved the visual perception, but did not modified the acceptability respect the control cookie.

INTRODUCCIÓN

1. NECESIDADES PROTEICAS DE LA POBLACIÓN

Las proteínas son biopolímeros presentes de forma natural en los alimentos. Estos polímeros son degradados a aminoácidos en nuestro cuerpo, y posteriormente utilizados para sintetizar otras proteínas que nuestro cuerpo necesita, así como fuente de energía.

Según la autoridad europea de referencia en seguridad alimentaria, la ingesta diaria recomendada de proteínas para un adulto es de 0.83 g de proteína/kg de peso (European Food Safety Authority, 2017). Sin embargo, existen ciertos grupos de población con unas necesidades proteicas diferentes, como pueden ser los atletas, con unas necesidades de 1.2-2 g/kg/día (Thomas, Erdman, & Burke, 2016), personas mayores, con necesidades de al menos 1.2 g/kg/día (Nowson & O'Connell, 2015), o embarazadas, con unas necesidades de 1.2, 6.1 y 10.7 g/kg/día en el primer, segundo y tercer trimestre de embarazo respectivamente (World Health Organization, 2007). Para suplir estas necesidades proteicas, el consumo de suplementos es común entre atletas, pero el resto de los grupos con necesidades proteicas mayores no se sienten atraídos por estos productos, y prefieren consumir toda la proteína a través de alimentos tradicionales, como es el caso de personas mayores (Beelen et al., 2018).

Además de los ya citados grupos, existen colectivos que, si bien no presentan necesidades por encima de las recomendaciones generales, sufren deficiencias proteicas debido a las dietas que deben o deciden llevar. Entre estos colectivos destacan los enfermos de celiaquía, que deben consumir alimentos libres de gluten; que suelen presentar un perfil nutricional pobre y un menor contenido proteico en comparación con los mismos productos con gluten (Calvo-Lerma et al., 2019; Miranda, Lasa, Bustamante, Churruga, & Simon, 2014).

El interés de los productos ricos en proteínas ya ha sido señalado en algunos estudios de mercado (Karpaviciute, 2018). En dicho estudio, se muestra que los alimentos con etiquetas promocionando un mayor contenido proteico incrementaron sus ventas en distintos países, como por ejemplo Los Estados Unidos de América (con un incremento

del 157%) o Australia (con un incremento del 22.3%). Estos incrementos de ventas tan elevados evidencian que, si bien estos productos se diseñan con el objetivo de suplir las necesidades de grupos concretos, también despiertan el interés del resto de la población, lo que se traduce en mayores volúmenes de ventas. Para conseguir desarrollar con éxito productos con un mayor contenido proteico, es necesario tener un conocimiento científico y tecnológico del efecto que las proteínas tendrán sobre el comportamiento de los ingredientes normalmente presentes en los productos, para poder realizar un desarrollo eficiente, y así dar respuesta a estas necesidades. Entre los diferentes productos en los que se puede realizar un enriquecimiento proteico, destacan aquellos a base de cereales, por estar situados en la base de la pirámide alimentaria (Figura 1).



Figura 1. Pirámide alimentaria (Freepick, 2019).

Declarar en productos a base de cereales un alto contenido proteico podría aumentar sus ventas hasta un 44% (Karpaviciute, 2018). De acuerdo con estas observaciones, un estudio reciente sobre consumo de alimentos ricos en proteínas (Banovic et al., 2018) muestra que los productos a base de cereales enriquecidos proteicamente, como panes, cereales de desayuno, bizcochos o galletas, están bien situados en el orden de preferencia de compra (Figura 2).

El componente principal de estos productos es el almidón, por lo cual cuando se realice un enriquecimiento proteico de estos alimentos, las interacciones entre las proteínas

exógenas y el almidón afectarán de manera directa a la calidad de los mismos. Por ello, es importante su estudio, teniendo como objetivo obtener unas buenas cualidades nutricionales, texturales y organolépticas de estos productos enriquecidos.

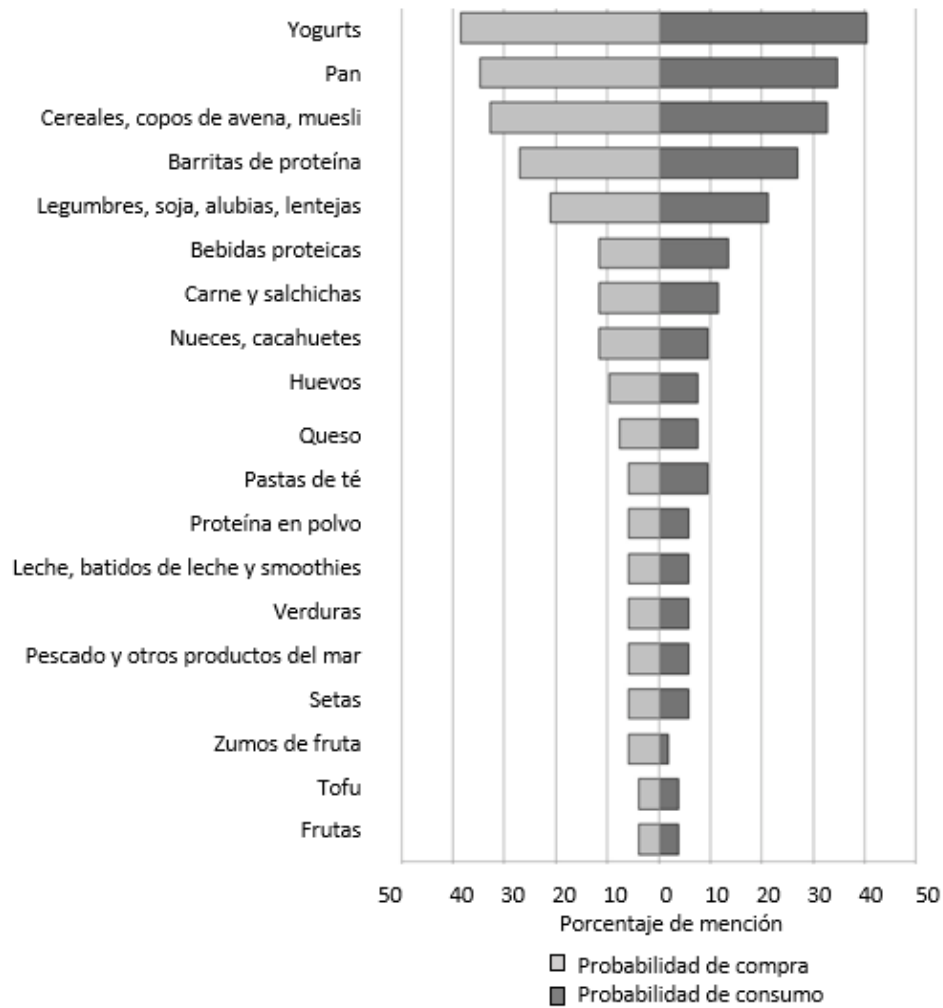


Figura 2. Preferencia de compra de alimentos enriquecidos proteicamente. Figura adaptada de Banovic et al. (2018).

2. EL ALMIDÓN Y SU FUNCIONALIDAD

2.1. El almidón

El almidón es el biopolímero de reserva presente en los granos vegetales, donde representa el 60-75% del peso de los mismos. El bloque de construcción del almidón son moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces α -1,4-glicosídicos. Al final de cada cadena de unidades de glucosa hay un grupo aldehído, que confiere un poder reductor a la molécula. En función de la estructura se diferencian dos polímeros de glucosa en el almidón:

- La amilosa. Presenta una estructura principalmente lineal, aunque puede presentar alguna ramificación (Hizukuri, Takeda, Yasuda, & Suzuki, 1981). Tanto la estructura principal como las ramificaciones están formadas por cadenas de cientos o incluso miles de unidades de glucosa. El grado de polimerización de la glucosa puede variar de 500 a 6000 residuos de glucosa (Le-Bail, Hesso, & Le-Bail, 2018).
- La amilopectina. Tiene una estructura mucho más ramificada, compuesta por pequeñas cadenas de glucosa interconectadas por enlaces α -1,6-glicosídicos. El grado de polimerización puede variar de 3×10^5 a 3×10^6 residuos de glucosa (Goesaert et al., 2005).

El ratio amilosa:amilopectina es diferente en función del origen botánico del almidón, pero suele estar comprendido entre un 25-28% de amilosa y un 72-75% de amilopectina (Colonna & Buléon, 1992), aunque existen excepciones (Bertoft, 2017). Así, existen almidones con un contenido de amilosa cercano al 0% (almidones *waxy*), y otros con un contenido aparente de amilosa del 50-80% (BeMiller, 2019).

Tanto las moléculas de amilosa como las de amilopectina se encuentran dentro del gránulo ordenadas de forma radial. En la Figura 3 se muestra la organización de estos polímeros en los gránulos de almidón. En el primer nivel se encontrarían las cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces α -1,4-glicosídicos. En el segundo nivel de

organización dichas cadenas están unidas por enlaces α -1,6-glicosídicos, dando lugar a las moléculas de amilosa y amilopectina arriba descritas. En el tercer nivel se observa como estas moléculas se organizan en el espacio en capas alternas, dando lugar a regiones cristalinas (formadas principalmente por amilopectina) y regiones amorfas (formadas principalmente por amilosa) (BeMiller, 2019). En el cuarto nivel se observa la organización de las regiones amorfas y cristalinas en forma de anillo. El quinto nivel corresponde a la estructura granular, y por último el sexto nivel sería el grano, donde el almidón coexiste con otros componentes del grano (Tran et al., 2011).

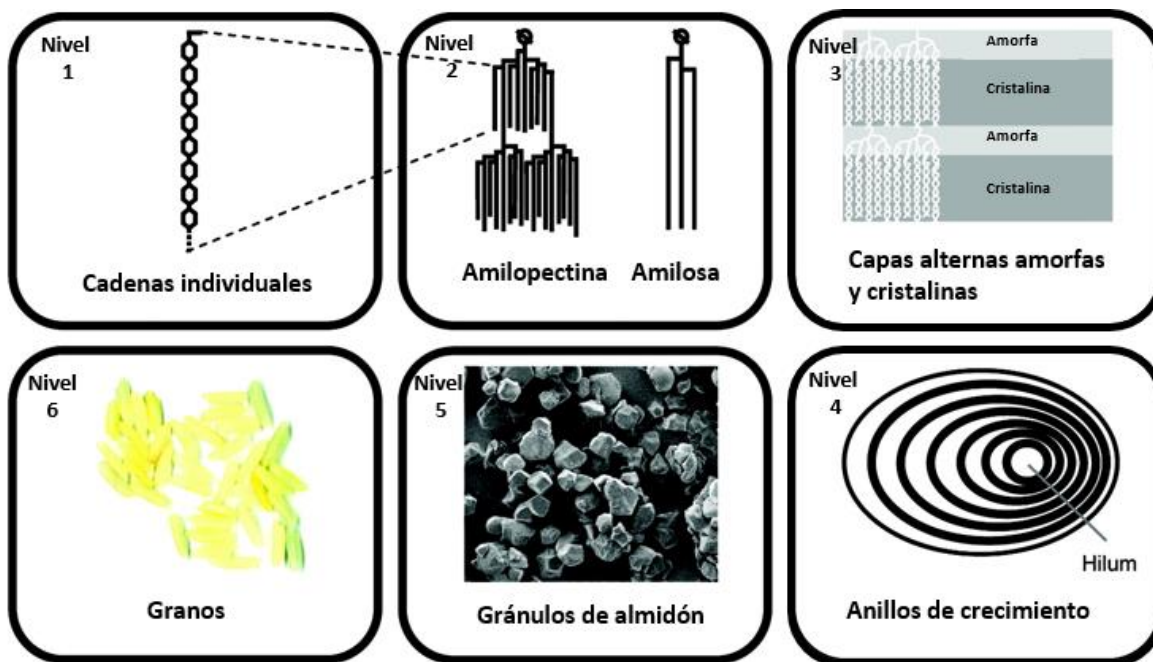


Figura 3. Los seis niveles de organización del almidón. Figura adaptada de Tran et al. (2011).

2.2. Propiedades físico-químicas del almidón

Las propiedades físico-químicas, y por tanto la funcionalidad del almidón, dependerán del ratio amilosa-amilopectina, peso molecular, estructura y tamaño de los gránulos, así como de otros componentes no almidonosos del grano (lípidos y proteínas) y otros

componentes ajenos al mismo que pudieran estar presentes (otros carbohidratos, proteínas, grasas, etc).

2.2.1. Solubilidad e hinchamiento en frío

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, pero pueden absorber agua de forma reversible (pueden hincharse ligeramente en presencia de agua para después volver a su tamaño original después de secarse). El grado de este hinchamiento de los gránulos dependerá de:

- El ratio de amilosa-amilopectina, porque una proporción de amilopectina elevada resultará en un hinchamiento mayor (Tester & Morrison, 1990), debido al empaquetado de las dobles hélices de esta molécula.
- El origen botánico del almidón, ya que los almidones de patata o tapioca se hinchan más rápido que almidones procedentes de cereales (maíz, cebada o trigo) (Vamadevan & Bertoft, 2015).
- La presencia de otros constituyentes del grano (proteínas y/o lípidos), restringen el hinchamiento de los gránulos (Debet & Gidley, 2006).
- Tamaño de partícula y porcentaje de almidón dañado, dado que a mayor tamaño de partícula y menor porcentaje de almidón dañado, más restrictivo y retardado será el hinchamiento (Roman, Gomez, Li, Hamaker, & Martinez, 2017; Tester & Morrison, 1994).

En solución acuosa, la cantidad de agua absorbida por los gránulos de almidón puede llegar a representar el 28-33% del peso del almidón húmedo (BeMiller, 2019). Esta capacidad de hinchamiento en frío se puede medir sin aplicación de fuerzas externas o con la aplicación de fuerzas externas. Así, podemos definir los conceptos de: a) Capacidad de retención de agua (WHC), que es la cantidad de agua retenida por un material sin aplicación de una fuerza externa; b) Capacidad de fijación de agua (WBC), que es la cantidad de agua que permanece unida al material hidratado tras la aplicación de una fuerza externa, como por ejemplo un proceso de centrifugación.

2.2.2. Gelatinización

En presencia de agua y calor, el almidón se comporta de manera diferente a la descrita en el apartado anterior. Así, un aumento progresivo de la temperatura en una mezcla de agua y almidón resultará en una pérdida del orden molecular (pérdida de la birrefringencia de los gránulos y fundición de las regiones cristalinas de amilopectina) debido al aumento de tensión dentro del gránulo, una mayor absorción de agua, un mayor hinchamiento de los gránulos y una solubilización progresiva principalmente de amilosa hasta la destrucción total de la estructura de los gránulos de almidón. A este proceso irreversible se le denomina gelatinización del almidón, y resultará en una dispersión con una viscosidad más elevada que la inicial. La Figura 4 muestra el hinchamiento y disrupción de los gránulos, así como su efecto en la viscosidad de la dispersión.

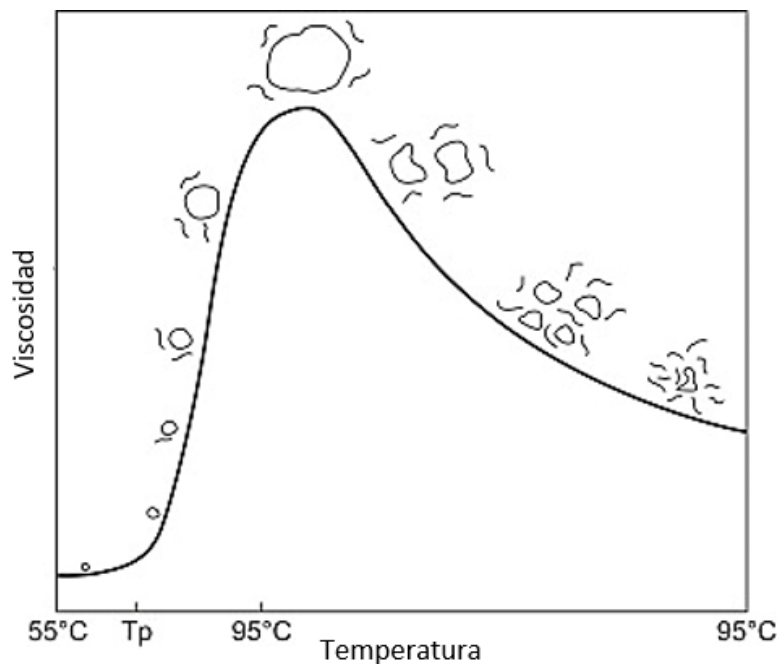


Figura 4. Hinchamiento y desintegración de un gránulo de almidón durante un proceso de calentamiento y la evolución de la viscosidad del medio. Figura adaptada de BeMiller (2019).

La evolución de la viscosidad de la dispersión durante este proceso dependerá de las propiedades intrínsecas del almidón, del dispersante y de la presencia o ausencia de otros polímeros. Los cambios en la viscosidad suelen determinarse haciendo uso de aparatos diseñados para medir dichos cambios durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento, siendo el más utilizado el “Rapid Visco Analyser” (RVA). Tener conocimiento de estas propiedades viscosas es importante para predecir si un almidón será de utilidad para una determinada aplicación. La Figura 5 muestra el típico comportamiento de un almidón sometido a un ciclo de calentamiento y enfriamiento.

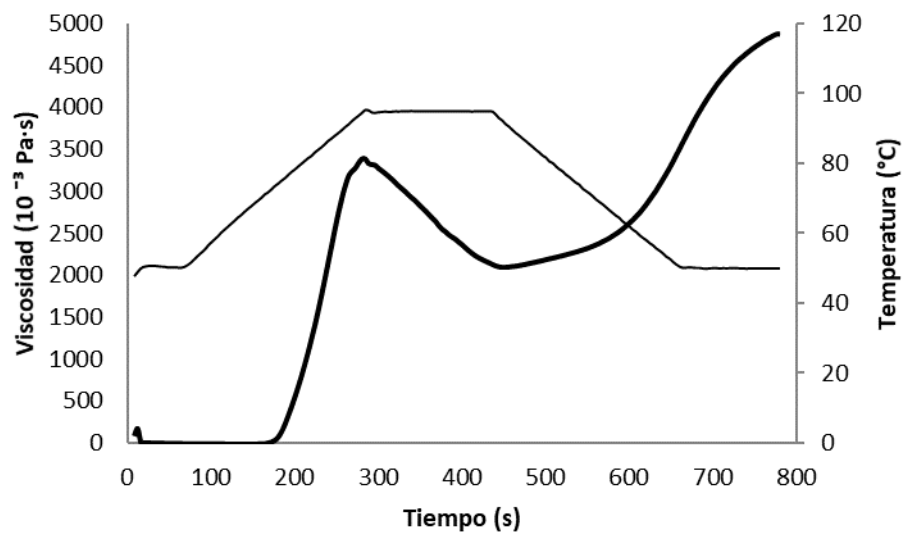


Figura 5. Perfil de viscosidad de una harina nativa durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento. La línea gruesa corresponde a la evolución de la viscosidad. La línea fina corresponde al perfil de temperaturas aplicado (Crosbie & Ross, 2007).

De este perfil de viscosidad podemos sacar diferentes parámetros, descritos por Crosbie & Ross (2007) en “The RVA Handbook”, enumerados a continuación:

- Pasting temperature: temperatura a la que el almidón empieza a aumentar la viscosidad de la dispersión (justo después de que ocurra la gelatinización).
- Peak viscosity: viscosidad máxima alcanzada durante la etapa de calentamiento (hinchamiento máximo de los gránulos de almidón).

- Peak temperature: temperatura a la que se alcanza la máxima viscosidad durante la etapa de calentamiento.
- Holding strength.: viscosidad más baja que alcanza la dispersión una vez pasado el pico de viscosidad.
- Breakdown: diferencia entre la viscosidad máxima alcanzada y la viscosidad mínima pasado el pico de viscosidad. Indica la estabilidad de la pasta durante el calentamiento.
- Total Setback: diferencia entre la viscosidad final y la viscosidad mínima pasado el pico de viscosidad. Mide la retrogradación y sinéresis del almidón durante la etapa de enfriamiento.
- Final Viscosity: viscosidad final de la mezcla agua-almidón.

Por otra parte, las temperaturas de inicio y fin de la gelatinización suelen determinarse haciendo uso de la calorimetría diferencial de barrido (Figura 6).

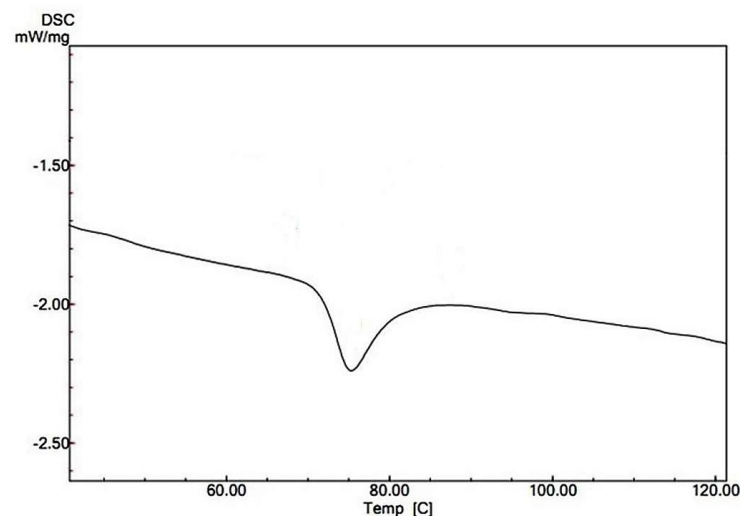


Figura 6. Curva de calorimetría diferencial de barrido de un almidón (Fontes, Cavalcanti, Candeia, & Almeida, 2017).

Esta técnica es capaz de darnos las temperaturas de la gelatinización (temperaturas de inicio, fundición y fin) de una manera muy exacta, así como la entalpia de la reacción

endotérmica que tiene lugar, debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno en el almidón.

2.2.3. Retrogradación

La retrogradación del almidón es un proceso físico por el cual las moléculas de almidón se reasocian mediante enlaces de hidrógeno (Hoover, 1995). Este proceso ocurre durante el enfriamiento y almacenamiento de las mezclas agua-almidón después de la gelatinización de este último. Este proceso está influido por las proporciones de amilosa y amilopectina del almidón (BeMiller, 2019), dado que la amilosa recristaliza más rápidamente que la amilopectina.

La retrogradación de la amilosa determina la dureza inicial de un gel a base de almidón. Por otra parte, la retrogradación de la amilopectina es mucho más lenta. Así, los almidones con mayor contenido en amilosa formarán rápidamente geles firmes (Ishiguro, Noda, Kitahara, & Yamakawa, 2000), elásticos y que presentan una oposición a la deformación (Miles, Morris, Orford, & Stephen, 1985; M. C. Tang & Copeland, 2007). Los almidones *waxy* (bajo contenido en amilosa) formarán geles más fluidos, sin una estructura tridimensional tan definida, y con una pegajosidad y adhesividad mayor (M. C. Tang & Copeland, 2007).

Todas las propiedades funcionales del almidón antes descritas afectan a las propiedades de las matrices alimentarias donde el almidón esté presente, en mayor grado cuando sea uno de los componentes mayoritarios, como es el caso de los productos horneados a base de cereales. En este tipo de productos influirán por ejemplo en la viscosidad de las masas, o en la textura y consistencia de los productos finales. Por ello, en cualquier proceso de reformulación de una matriz alimentaria que contenga almidón, el efecto de los ingredientes a añadir en las propiedades de la misma debe ser siempre considerado.

3. PROTEÍNAS Y SU FUNCIONALIDAD

3.1. Aspectos generales de las proteínas y clasificación

3.1.1. Aspectos generales de las proteínas

Las proteínas son biomoléculas formadas por una o varias cadenas de aminoácidos. Estos son compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno que contienen, como su nombre indica, un grupo amino y un grupo carboxilo (ácido). Existen un total de veinte aminoácidos diferentes. Su unión ordenada, mediante enlaces que se establecen entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, dan lugar al esqueleto proteico, que puede llegar a tener centenares de aminoácidos (López Fandiño, 2014). Este esqueleto proteico se organizará tridimensionalmente, y en total se distinguen cuatro niveles de organización en el espacio: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Figura 7).

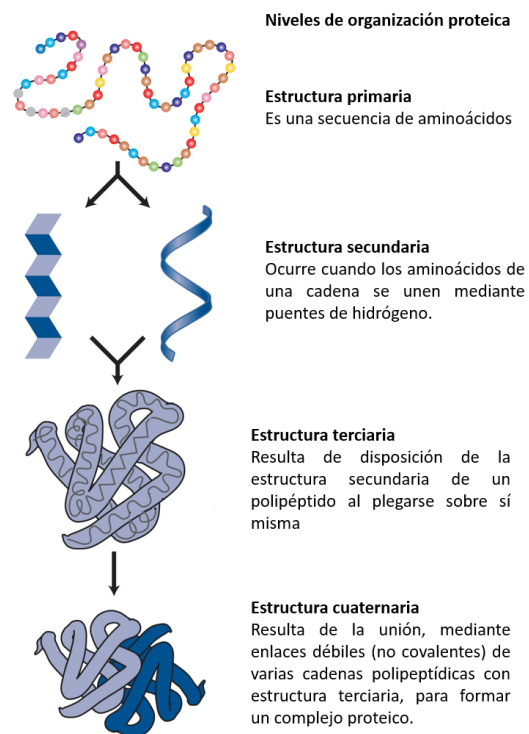


Figura 7. Los niveles de organización proteicos. Figura adaptada del United States of America National Human Genome Research Institute (2019)

La funcionalidad de las proteínas dependerá de los aminoácidos presentes en la misma, su secuencia y su organización tridimensional (Branden & Tooze, 1999).

3.1.2. Clasificación de las proteínas

La primera clasificación sistemática de proteínas, de principios del siglo XX, fue realizada por Thomas B. Osborne para proteínas vegetales (Osborne, 1908). En este estudio se identificaron las siguientes fracciones proteicas en base a la solubilidad de las mismas:

- Globulinas. Solubles en sales neutras (e.g. 0.1 M NaCl), insolubles en agua.
- Prolaminas. Solubles en soluciones acuosas al 70-80 % de alcohol, insolubles en agua.
- Gluteninas. Solubles en soluciones alcalinas diluidas (e.g. 0.1 M NaOH), insolubles en agua.
- Albúminas. Solubles en agua.

La clasificación de Thomas B. Osborne sigue en uso, pero a medida que los métodos de fraccionamiento y clasificación de proteínas han ido mejorando, se ha demostrado que cada una de estas fracciones contiene una compleja mezcla de proteínas, y que existe un solapamiento entre las fracciones (Shewry & Tatham, 1990). Sin embargo, además de en base a su solubilidad, las proteínas pueden clasificarse siguiendo otros criterios, como por ejemplo en base a su forma tridimensional o su función biológica. Esta última no es de interés en la presente tesis, por lo que nos centraremos en la clasificación de las proteínas según su forma tridimensional, donde se pueden distinguir dos grandes grupos: proteínas fibrilares y proteínas globulares (Schwenke, 1998).

- Proteínas fibrilares. Las proteínas fibrilares tienen una secuencia repetitiva, lo que hace que sean capaces de formar largas cadenas flexibles o de organizarse en forma de hélice por la interacción entre los segmentos estructurales que se repiten (Taylor, May, Brown, & Aszódi, 2001).
- Proteínas globulares. Estas proteínas tienen una estructura compacta, en forma de “esferas”, proveniente de una secuencia no repetitiva (Taylor et al., 2001).

Las proteínas fibrilares, como las de colágeno, son insolubles en agua (Schwenke, 1998), mientras que las globulares, como las de albúmina de huevo, son solubles en agua (Schwenke, 1998). La Figura 8 muestra unas imágenes tomadas con un microscopio electrónico de barrido ambiental de aislados proteicos de cada uno de estos grupos, proteínas de colágeno (fibrilares) y de albúmina de huevo (globulares).

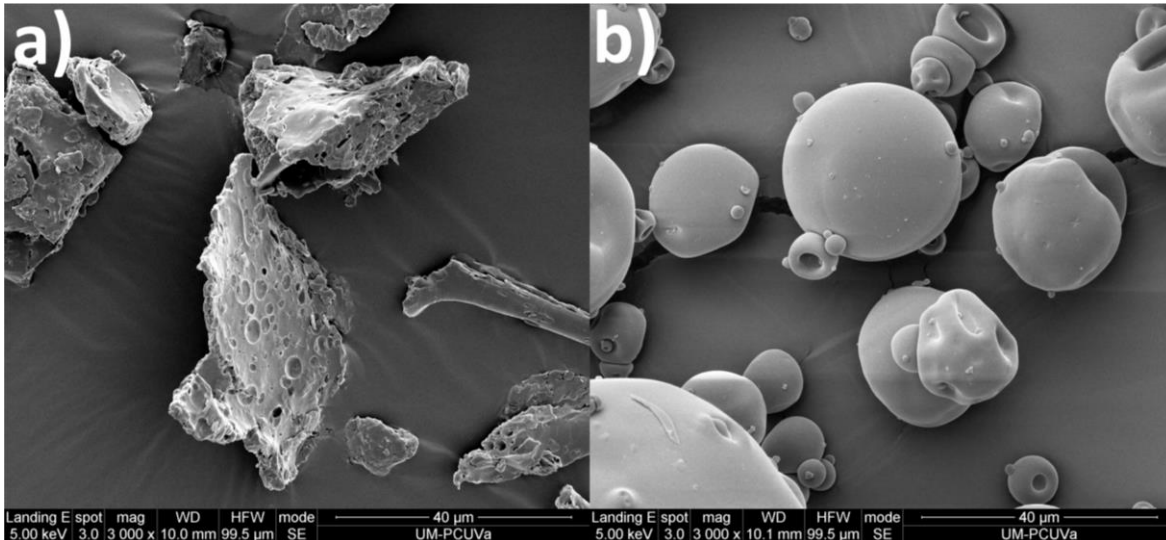


Figura 8. Fotomicrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido ambiental (x 3000 aumentos) de aislados proteicos de proteínas a) fibrilares (colágeno) y b) globulares (albúmina de huevo).

3.2. Propiedades nutricionales de las proteínas en los alimentos

Las proteínas difieren en su valor nutritivo, que depende de su contenido en aminoácidos esenciales, así como de su digestibilidad. Una proteína se considera de alta calidad cuando contiene todos los aminoácidos esenciales en proporciones más elevadas que las riquezas de referencia según FAO/OMS/UNU (1985) y una buena digestibilidad, es decir, que sea comparable a la de las proteínas de clara de huevo o leche. Los aminoácidos esenciales cuyas concentraciones en las proteínas se sitúan a niveles inferiores de la proteína de referencia se conocen como aminoácidos limitantes, que suelen ser lisina, triptófano y los aminoácidos sulfurados, como la metionina. Como norma general, las proteínas animales son de mejor “calidad” que las de origen vegetal, por contener a

niveles adecuados todos los aminoácidos esenciales. Esto no quiere decir que debemos olvidarnos de las proteínas vegetales en el desarrollo de matrices alimentarias, ya que existe una creciente demanda de productos vegetarianos o veganos por parte de la población. Las proteínas provenientes de cereales y leguminosas suelen ser deficientes en al menos uno de los aminoácidos esenciales. Así, las proteínas de cereales como arroz, trigo, cebada o maíz son deficientes en lisina, pero ricas en metionina. Justo al contrario que las proteínas de leguminosas o algunas semillas oleaginosas (como por ejemplo el lino), que son pobres en metionina, pero presentan un contenido adecuado de lisina. También hay algunas semillas oleaginosas, como es el caso específico del cacahuete, que son deficientes en estos dos aminoácidos (Eggum & Beames, 1983). El consumo excesivo de un determinado aminoácido puede resultar en un aumento de las necesidades de los aminoácidos esenciales, e incluso llegar a ser tóxico (Damodaran, 2007). En el caso de los aminoácidos esenciales, su consumo en exceso puede inhibir el crecimiento, así como favorecer condiciones patológicas. Aunque el contenido en aminoácidos es importante de cara a considerar una proteína de mejor o peor calidad, no hay que perder de vista que la calidad también depende de la extensión en que estos aminoácidos sean utilizados dentro del organismo (Damodaran, 2007). Esto nos lleva al concepto de digestibilidad, que se relaciona con la proporción de nitrógeno absorbido tras su ingestión. Cuanto mayor sea esta proporción, mayor será la digestibilidad de una proteína.

3.3. Propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos

Los atributos físicos de un alimento son consecuencia del efecto neto de las interacciones entre los diversos componentes mayoritarios y minoritarios del alimento. Las propiedades funcionales de las proteínas se refieren a las propiedades fisicoquímicas de las mismas que tendrán un efecto sobre el comportamiento de las matrices alimentarias durante su preparación, procesado, almacenamiento y consumo, contribuyendo a la calidad y aceptabilidad de las mismas (Kinsella & Melachouris, 1976).

Debido a la heterogeneidad de las proteínas, y su posible interacción con otros ingredientes, la funcionalidad de cada proteína está muy ligada a su estructura y origen,

así como a las condiciones del medio en el que se encuentre. Las propiedades funcionales de las proteínas más importantes en productos horneados a base de cereales son las de: solubilidad, fijación de agua y capacidad espesante, emulsionantes, espumantes y gelificantes.

3.3.1. Solubilidad

La solubilidad de las proteínas se define como la proporción de nitrógeno en una proteína que está en el estado soluble bajo determinadas condiciones, o lo que es lo mismo, el porcentaje de proteína que se disuelve en un determinado disolvente. Esta propiedad está influenciada por la composición y secuencia de la cadena de aminoácidos, así como el peso molecular, conformación y contenido de grupos polares y apolares en los aminoácidos. Además, también tendrán una influencia los siguientes factores externos:

- pH del medio. Es el factor más determinante. El grado de solubilidad de una proteína en un medio acuoso es el resultado de las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas entre las moléculas de proteínas. La solubilidad aumenta si la repulsión electroestática entre moléculas es mayor que las interacciones hidrofóbicas (Kinsella & Melachouris, 1976). En su punto isoeléctrico (pI), las proteínas tienen una carga neta de cero, por lo que las fuerzas atractivas dominan, y las moléculas tienden a asociarse, resultando en insolubilidad. Por tanto, para ser soluble, una proteína debe poder interactuar con el medio lo máximo posible.
- Calor. El cambio de la solubilidad de una proteína durante un proceso de calentamiento está relacionado con un cambio en la conformación de la misma en el tiempo. La estructura molecular de la mayoría de las proteínas es susceptible al cambio al modificar su temperatura. Así, la solubilidad de la mayoría suele aumentar al incrementar la temperatura del medio de 0 a 40-50 °C. A temperaturas más elevadas las proteínas tienen a decrecer su solubilidad de manera permanente con respecto a la solubilidad de la proteína nativa.

- Condiciones de procesado. La solubilidad de las proteínas presentes en una matriz alimentaria dependerá del estado de las proteínas en la misma, que estará afectada positiva o negativamente por las condiciones de procesado (e.g. trabajo mecánico o secado).

3.3.2. Fijación de agua y capacidad espesante

La capacidad de fijación de agua puede definirse como la habilidad de una proteína de retener agua (propia o añadida), o lo que es lo mismo, la capacidad de evitar la pérdida de agua retenida por la estructura tridimensional de una determinada proteína (Hermansson, 1986). Esto depende del número de moléculas de agua que cada molécula puede fijar, lo que de nuevo está relacionado con la composición y conformación de las moléculas proteicas. La fijación de agua ocurre gracias al carácter dipolar del agua, por lo que cuanto mayor es el número de aminoácidos con carga dentro de la molécula de proteína, mayor la tendencia a fijar agua (Kuntz, 1971). De la capacidad de fijar agua dependerá la viscosidad de las soluciones proteicas (a mayor fijación mayor capacidad espesante y mayor viscosidad). Al igual que ocurriría con la solubilidad, hay otros factores que influirán en la capacidad de fijación de agua y la capacidad espesante de una determinada proteína:

- Concentración proteica. La capacidad de fijación de una solución con proteína aumenta con su concentración.
- pH del medio. La capacidad de fijación de agua de una proteína se ve reducida al máximo cerca del punto isoeléctrico de la proteína, donde la carga neta de la misma es cero y las interacciones proteína-proteína son más fuertes. La capacidad de fijación de agua se ve aumentada a pHs donde las proteínas tienen un carácter más polar.
- Fuerza iónica. La adicción de sal influye en la capacidad de fijación de agua de las proteínas por afectar a las interacciones electroestáticas. A concentraciones de sal mayores a 0,2 M hay un descenso en la capacidad de fijación de agua por una competición entre las proteínas y los iones por el agua.

- Calor. La fijación de agua decrece al aumentar la temperatura, por la disminución del número de enlaces hidrógeno con el agua. Sin embargo, esto depende de cada proteína, así, cuando se calientan proteínas de estructura muy compacta, el calor puede producir una disociación y desdoblamiento de las moléculas, lo cual favorece la llegada a la superficie de enlaces peptídicos y cadenas laterales polares antes inactivos, que mejoran la fijación de agua (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1989b).

3.3.3. Propiedades emulsionantes y espumantes

Una emulsión es una dispersión de dos líquidos no miscibles, donde uno de ellos se encuentra disperso en forma de gotas de pequeño tamaño (0,1–100 μm) en el otro gracias a la acción de moléculas con capacidad emulsionante, que evita la separación de fases (Dickinson, 1992). Por su parte, una espuma se puede definir como un sistema compuesto por burbujas de aire dispersas en una fase continua (líquida o semi-sólida) que contiene un surfactante soluble (Cheftel et al., 1989b). Por tanto, las propiedades emulsionantes/espumantes de las proteínas se definen como la capacidad de las mismas de estabilizar la fase dispersa en la continua, así como su capacidad para mantener dichas emulsiones/espumas estables en el tiempo. Estas capacidades están relacionadas con los componentes hidrofóbicos e hidrofílicos de las mismas, que determinarán su integración en la interfase para disminuir la tensión superficial entre fases (A. Bos & van Vliet, 2001). En la mayoría de los casos, existe una correlación positiva entre la solubilidad de una proteína y su capacidad emulsionante/espumante. Al igual que ocurre con el resto de funcionalidades, existen otros factores que influirán en estas propiedades de una determinada proteína:

- Concentración proteica. La estabilidad de estos sistemas está ligada al contenido proteico en la misma. A muy bajas concentraciones, la interfase puede tener una fuerza limitada, desestabilizándose con rapidez.
- pH del medio. El pH influye de manera indirecta estas funcionalidades de las proteínas, afectando a su solubilidad, conformación y propiedades de la superficie proteica (Halling, 1981).

- Fuerza iónica. La adición de sal puede reducir las interacciones electroestáticas dentro de la proteína, y favorecer su difusión y desdoblamiento en la interfase; aunque también puede reducir la repulsión electroestática entre las proteínas recubriendo la fase dispersa, y por tanto reducir la estabilidad del sistema (Stone & Campbell, 1980).
- Calor. El calor es clave en la formación de emulsiones, ya que incrementa la adsorción de las proteínas en la interfase, por disminuir la tensión superficial de las fases (Dickinson, 1992; Purdon, Tinker, & Neumann, 1980). Además, una ligera desnaturalización de las proteínas puede incrementar la actividad surfactante de las mismas, por incrementarse la hidrofobicidad de la superficie proteica (Kato, Tsutsui, Matsudomi, Kobayashi, & Nakai, 1981). De todas formas, esto también puede disminuir el porcentaje efectivo de proteína que se adsorbe a la interfase, incrementando por tanto la concentración proteica necesaria para estabilizar una determinada emulsión.

3.3.4. Propiedades gelificantes

Las propiedades gelificantes de las proteínas son en parte responsables las propiedades sólidas o visco-elásticas de un alimento (Zayas, 1997a). Estas se definen como la capacidad que tienen las proteínas de formar geles cuando estructuras proteicas parcialmente desdobladas presentan cadenas polipeptídicas que interaccionan entre sí o con el medio— mediante enlaces de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas y enlaces covalentes disulfuro en puntos específicos— para dar lugar a una red tridimensional ordenada (Cheftel et al., 1989b; Schmidt, 1981). Las proteínas con un peso molecular más elevado y un alto porcentaje de aminoácidos con grupos hidrofóbicos tienden a establecer redes más fuertes en los sistemas gelificados.

En estos geles, la fase líquida impide el colapso de la red tridimensional en una masa compacta, mientras que la red tridimensional previene que el líquido escape. El desarrollo de la estructura elástica de los mismos está determinada por los enlaces de entrecruzamiento (Katsua, Rector, & Kinsella, 1990). Al igual que ocurre con el resto de

funcionalidades, las propiedades gelificantes están sujetas a la influencia de diferentes factores que determinarán el comportamiento de una determinada proteína:

- Concentración. El proceso de gelificación se acelera al aumentar el contenido proteico, debido a unos contactos intermoleculares más intensos.
- Calor. En la formación de un gel, la transición de la proteína de un estado nativo a uno de desnaturalización gracias a la acción del calor es un importante precursor de las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, el uso de la temperatura para la formación de geles debe controlarse, para que la proteína no se agregue.
- pH del medio y fuerza iónica. La distribución de cargas a lo largo de las cadenas laterales de aminoácidos puede ser modificada por las condiciones de pH y fuerza iónica. Así, los geles elaborados cerca del punto isoeléctrico de las proteínas resulta en geles menos hidratados y menos firmes por la falta de fuerzas repulsivas (Hermansson & Lucisano, 1982). Por su parte, la fuerza iónica influye en la microestructura de los geles formados, teniendo una estructura más fina cuanto menor sea la fuerza iónica (Hermansson, Harbitz, & Langton, 1986).

3.4. Proteínas presentes en productos horneados a base de cereales

Aunque el número de proteínas usadas en alimentos es extenso, en el caso de los productos horneados a base de cereales se pueden encontrar proteínas animales (proteínas de la leche o del huevo), y/o proteínas vegetales (mayoritariamente proteínas provenientes de cereales o leguminosas), teniendo estas un efecto importante sobre las características de los mismos. Su presencia puede deberse a ser proteínas presentes en los ingredientes de las formulaciones tradicionales, o por ser añadidas con el objetivo de aportar un beneficio funcional y/o nutricional al producto. En este apartado nos centraremos en las proteínas presentes como ingredientes de las formulaciones tradicionales.

3.4.1. Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche engloban a dos grandes grupos proteicos, fácilmente diferenciables entre sí: caseínas y proteínas de suero (Phillips & Williams, 2011). En torno al 80% de las proteínas de la leche son caseínas, se encuentran en forma de complejos macromoleculares, conteniendo una parte mineral (hasta un 8%) (comúnmente fosfato de calcio), denominados micelas (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1989a). A causa de esta estructura macromolecular son fácilmente aislables por centrifugación o precipitación isoeléctrica, a pH 4.6. A las proteínas no sedimentables bajo estas condiciones se las denomina proteínas del suero, y están constituidas por una mezcla de proteínas globulares.

- Las caseínas. Son un grupo heterogéneo de fosfoproteínas organizadas en micelas. Estas micelas tienen un diámetro variable desde 50 a 300 nm, y son las responsables del color blanco de la leche. Las proteínas que forman estas micelas son α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseínas en una proporción aproximada de 40:10:40:10 (O’Kennedy, 2011). Las caseínas son muy susceptibles a los cambios del pH, y se agregan a niveles macroscópicos a pH 4,6 (punto isoeléctrico de estas proteínas), separándose así de los componentes minerales presentes en las micelas. La aplicación de caseínas en matrices alimentarias está muy extendida por su capacidad gelificante a pHs ácidos junto con su buena capacidad emulsionante (O’Kennedy, 2011) y una gran estabilidad térmica por encima de pH 6.
- Las proteínas del suero. Engloban las α -lactoglobulinas, β -lactoglobulinas, albúmina de suero, inmunoglobulinas y otras proteínas minoritarias (lactoferrina y lactoperoxidasa). Estas proteínas son normalmente estables al ácido, pero sensibles al calor, especialmente las β -lactoglobulinas. Las tres primeras constituyen el 80-90% del contenido proteico del suero, siendo las α -lactoglobulinas y β -lactoglobulinas las mayoritarias y por tanto las principales responsables de las propiedades funcionales de las proteínas del suero (Schmidt & Morris, 1984). Las α -lactoglobulinas tienen una solubilidad baja, pero una buenas

propiedades gelificantes y de fijación de agua después de un calentamiento (Boland, 2011).

Las proteínas lácteas suelen estar presentes en las recetas tradicionales de los bizcochos. Además de sabor, las proteínas lácteas proporcionan estabilidad en las masas, por su capacidad espumante, así como cohesividad y ternura a las migas, por su capacidad de fijar agua.

3.4.2. Proteínas del huevo

El huevo está compuesto por dos fracciones fácilmente diferenciables entre sí, la clara y la yema. La primera es transparente y está compuesta principalmente por agua y proteínas. Por su parte, la yema presenta una coloración anaranjada o amarillenta, y está compuesta principalmente por agua, lípidos y proteínas.

- Proteínas de la clara. Engloban la ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucoide y otras proteínas minoritarias. Las proteínas de la clara de huevo tienen buenas capacidades espumantes en su estado nativo (Mine, 1995), así como una buena capacidad gelificante a partir de los 60 °C aproximadamente (Donovan, Mapes, Davis, & Garibaldi, 1975), siendo la ovotransferrina la proteína que más fácilmente se desnaturaliza con el calor.
- Proteínas de la yema. Estas proteínas engloban las lipovitelinas, la fosfovitina y las proteínas del plasma. Al igual que las proteínas de la clara, estas proteínas tienen la capacidad de formar geles al ser sometidas a un tratamiento térmico, aunque da lugar a geles más fluidos (Strixner & Kulozik, 2011). Estas proteínas también son capaces de formar y estabilizar emulsiones a altas temperaturas.

Las proteínas del huevo también son proteínas comúnmente presentes en los productos de panificación, sobre todo en bizcochos. Por sus buenas propiedades espumantes y emulsionantes (Mine, 1995) dan lugar a masas muy aireadas. Además aportan cohesividad, ya que el huevo coagula a temperaturas cercanas a la temperatura de

gelatinización del almidón (Ferreira, Hofer, & Raemy, 1997; Kiosseoglou & Paraskevopoulou, 2006). Estas proteínas también contribuyen de manera importante en el sabor y color de los productos, por su contribución en las reacciones de Maillard, que tienen lugar entre aminoácidos y azúcares reductores (Smak, 1972).

3.4.3. Proteínas de cereales

Las proteínas de cereales están presentes en todos los productos horneados a base de cereales, por estar presentes en las harinas a utilizar. Siendo la harina de trigo la más utilizada en la elaboración de productos horneados a base de cereales, el gluten es la proteína más comúnmente presente en este tipo de productos y cuyo efecto es más conocido. Sin embargo, otros cereales también utilizados en este tipo de productos, aunque en menor medida, son el arroz o el maíz. Las proteínas de estos cereales no tienen un efecto tan marcado como las del trigo sobre las propiedades de los productos finales.

- El gluten es una proteína compuesta por dos fracciones proteicas: gliadinas y gluteninas. Las primeras contribuyen a la viscosidad y extensibilidad de las masas, mientras que las segundas determinan su elasticidad (Lazaridou, Duta, Papageorgiou, Belc, & Biliaderis, 2007; Sluimer, 2005). La red de gluten se forma cuando la harina de trigo se hidrata y se somete a un trabajo mecánico de amasado, ya sea con maquinaria o manual. Es en el pan donde el gluten tiene un papel fundamental, ya que su ausencia resulta en masas sin cohesión, que darán lugar a panes con tendencia a desmigarse, blanquecinos y con otros defectos sensoriales (Gallagher, Gormley, & Arendt, 2004). El gluten también afecta a los parámetros de otro tipo de productos de panificación, como galletas o bizcochos (Delcour et al., 2012), pero su papel dominante en la calidad de los mismos no es tan evidente. En el caso de los bizcochos, un contenido de gluten más elevado parece resultar en una mejor estructura de la miga, con una distribución de las burbujas de aire más uniforme, así como volúmenes más altos (Wilderjans, Pareyt,

Goesaert, Brijs, & Delcour, 2008). En las galletas de masa corta tipo “sugar-snap” el gluten influye de tal manera que el uso de harinas de trigo con un alto porcentaje en proteína de gluten disminuye el ratio de expansión pero aumenta la densidad y la dureza de las mismas (Pareyt & Delcour, 2008).

- Las proteínas de arroz o de maíz pueden clasificarse haciendo uso de la clasificación de Thomas B. Osborne para proteínas vegetales (Osborne, 1908), que ya fue descrita en la sección “3.1.2. Clasificación de las proteínas”. La funcionalidad de estas proteínas en productos horneados no está tan estudiada como la del gluten. De las proteínas de arroz se sabe que presentan una buena capacidad de fijación de agua y una baja solubilidad y capacidad espumante, que puede mejorarse a pHs básicos (Amagliani, O’Regan, Kelly, & O’Mahony, 2017). Respecto a las proteínas de maíz, son solubles y presentan capacidad espumante a pHs neutros (Lin & Zayas, 1987).

3.4.4. Proteínas de leguminosas

Además del uso de harinas de cereales, cada vez es más común la incorporación de harinas provenientes de leguminosas en productos horneados a base de cereales. Estas harinas se caracterizan por tener un porcentaje proteico relativamente alto (entre un 17-40%) (de Almeida Costa, da Silva Queiroz-Monici, Pissini Machado Reis, & de Oliveira, 2006; Du, Jiang, Yu, & Jane, 2014). La proteína más comúnmente utilizada es la proteína de soja. La similitud de los componentes de esta proteína con otras proteínas de leguminosas sugiere que las mismas puedan tener funciones y aplicaciones similares (Derbyshire, Wright, & Boulter, 1976). En general, las proteínas de leguminosas presentan una buena capacidad de fijación de agua, que varía en función del origen de la proteína, siendo la soja capaz de retener hasta 4 y 5 su peso en agua (Vose, 1980). Además, estas proteínas presentan buenas solubilidades a pHs menores de 3 y mayores de 7, mientras que son altamente insolubles alrededor de pHs cercanos a 4-4,5 (Carbonaro, Cappelloni, Nicoli, Lucarini, & Carnovale, 1997). La inclusión de estas proteínas en productos a base

de cereales resulta en un descenso del volumen específico (en el caso de panes y bizcochos) y un aumento en la dureza (Monnet, Laleg, Michon, & Micard, 2019).

4. ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE PRODUCTOS HORNEADOS A BASE DE CEREALES

El interés por la incorporación de proteínas a los productos horneados a base de cereales está en auge, ya que existen ciertos grupos de población con unas necesidades proteicas diferentes (más información en la sección “1. Necesidades proteicas de la población”). Según la normativa europea (European Comission, 2019), para declarar un alimento fuente de proteínas o alto en proteínas se deben cumplir las siguientes premisas:

- Fuente de proteínas. La proteína tiene que ser la fuente de al menos el 12% del importe calórico del alimento.
- Alto en proteínas. La proteína tiene que ser la fuente de al menos el 20% del importe calórico del alimento.

Para conseguir cumplir con estas declaraciones, los niveles necesarios de proteína a incorporar son elevados. Las proteínas tienen la capacidad de modificar tanto la estructura y textura en los alimentos (da Silva & Rao, 2007) (más información en la sección “3. Proteínas y su funcionalidad en productos a base de cereales”). Por tanto, es de esperar que la incorporación de nuevas proteínas a formulaciones tradicionales, para cumplir con los niveles arriba indicados, tenga un impacto considerable en las propiedades finales de los productos.

Antes de incorporar determinadas proteínas en productos finales, es interesante tener una idea del efecto que estas tendrán sobre la funcionalidad del almidón, ya que la función de este es clave en productos a base de cereales. Conocer las interacciones que puedan ocurrir entre estos biopolímeros (proteínas y almidón), puede darnos una idea de cuál será dicho efecto sobre los productos finales. En esta línea, ya se han realizado

diferentes investigaciones, aunque no siempre con niveles demasiado elevados de proteínas, sobre todo en el caso de productos.

4.1. Efecto de diferentes proteínas sobre las propiedades del almidón

En la elaboración de productos horneados a base de cereales, las propiedades del almidón (referidas en la sección “2. El almidón y su funcionalidad”) tendrán una influencia en las características de los mismos. Como ya se ha referido con anterioridad, dicha funcionalidad estará influenciada por las condiciones del medio (como puede ser el pH o la temperatura). Siendo el objetivo de esta tesis el estudio del enriquecimiento proteico de productos a base de cereales, es importante por lo tanto entender el efecto que las proteínas exógenas tendrán sobre las propiedades funcionales del almidón.

A continuación, se prestan los estudios más destacados sobre interacciones de almidones con proteínas vegetales y/o animales que se han realizado hasta la fecha (Tabla 1).

Tabla 1. Investigaciones de las interacciones entre almidones/harinas y proteínas, y su influencia en las propiedades del almidón/harina.

Estudio	Almidón utilizado	Proteína utilizada	Porcentaje de proteína	Porcentaje de sólidos totales	Forma de hacer la mezcla
Li, Yeh, & Fan (2007)	Maíz	Soja	50-100%	20%	Sustitución
Ribotta & Rosell (2010)	Maíz y yuca	Soja	50%	5.5-11% (5.5% almidón, 5.5% proteína)	Adición
Colombo, León, & Ribotta (2011)	Maíz, trigo y yuca	Soja	50-68%	6-30.2%	Adición
Chinma, Ariahu, & Abu (2013)	Yuca	Soja	0-50%	1-18%	Sustitución
Villanueva, Ronda, Moschakis, Lazaridou, & Biliaderis (2018)	Arroz, patata y tapioca	Soja y clara de huevo	0-2%	20%	Sustitución

Estudio	Almidón utilizado	Proteína utilizada	Porcentaje de proteína	Porcentaje de sólidos totales	Forma de hacer la mezcla
Li, Yeh, & Fan (2007)	Maíz	Soja	50-100%	20%	Sustitución
Ribotta & Rosell (2010)	Maíz y yuca	Soja	50%	5.5-11% (5.5% almidón, 5.5% proteína)	Adición
Colombo, León, & Ribotta (2011)	Maíz, trigo y yuca	Soja	50-68%	6-30.2%	Adición
Chinma, Ariaahu, & Abu (2013)	Yuca	Soja	0-50%	1-18%	Sustitución
Ribotta, Colombo, & Rosell (2012)	Maíz y yuca	Guisante	50%	5.5 -11% (5.5% almidón, 5.5% proteína)	Adición
(Oñate Narciso & Brennan (2018)	Arroz	Guisante y suero	5-20%	9%	Adición
Joshi, Aldred, Panozzo, Kasapis, & Adhikari (2014)	Lenteja	Lenteja	0-100%	25%	Sustitución
Sun & Xiong (2014)	Guisante	Cacahuete	0-50%	10.7%	Sustitución
Yi et al. (2017)	Maíz	Lino hidrolizado	1.3-6.25%	15-16% (15% almidón, 0.2-1% proteína)	Adición
Chen, Zhang, Li, Xie, & Chen (2018)	Patata	Gluten hidrolizado	0.5-1.5%	5-5.075% (5% almidón, 0.025-0.075% proteína)	Adición
Lelievre & Husbands (1989)	Maíz waxy	Caseína	60-77%	10.5-18.0% (3-8% almidón, 7.5-10% proteína)	Adición
Doublier, Marzin, Visdeloup, & Lefebvre (1994)	Trigo, patata y tapioca	Caseína	No está claro	No está claro	No está claro
(Goel, Singhal, & Kulkarni (1999)	Maíz	Caseína	11.1-44.4%	5%	Adición y sustitución

Estudio	Almidón utilizado	Proteína utilizada	Porcentaje de proteína	Porcentaje de sólidos totales	Forma de hacer la mezcla
Li, Yeh, & Fan (2007)	Maíz	Soja	50-100%	20%	Sustitución
Ribotta & Rosell (2010)	Maíz y yuca	Soja	50%	5.5-11% (5.5% almidón, 5.5% proteína)	Adición
Colombo, León, & Ribotta (2011)	Maíz, trigo y yuca	Soja	50-68%	6-30.2%	Adición
Chinma, Ariaahu, & Abu (2013)	Yuca	Soja	0-50%	1-18%	Sustitución
Bertolini, Creamer, Eppink, & Boland (2005)	Yuca, Amylomaíz, maiz, maiz <i>waxy</i> , patata y trigo	Caseína	23-50%	13-20% (3-10% almidón, 10% proteína)	Adición
Noisuwan, Bronlund, Wilkinson, & Hemar (2008)	Arroz y arroz <i>waxy</i>	Caseína Suero	20-50%	10-20% (10% almidón, 0-10% proteína)	Adición
Kett et al. (2013)	Maíz <i>waxy</i>	Caseína	0-50%	5-10% (5% almidón, 5% proteína)	Adición
Aguilera & Rojas (1997)	Yuca	Suero	0-100%	10%	Sustitución
Aguilera & Baffico (1997)	Yuca	Suero	40-100%	10-18%	Sustitución
Shim & Mulvaney (2001)	Maíz	Suero	0-100%	15 y 30%	Sustitución
Ravindra, Genovese, Foegeding, & Rao (2004)	Maíz <i>waxy</i> entrecruzado	Suero	0-100%	5%	Sustitución
Yang, Irudayaraj, Otgonchimeg, & Walsh (2004)	Trigo	Suero	13.-23.8%	50%	No está claro
Fitzsimons, Mulvihill, & Morris (2008)	Maíz <i>waxy</i> entrecruzado	Suero	16.67-83.33%	2-12% (1-5% almidón, 1-10% proteína)	Adición

Estudio	Almidón utilizado	Proteína utilizada	Porcentaje de proteína	Porcentaje de sólidos totales	Forma de hacer la mezcla
Li, Yeh, & Fan (2007)	Maíz	Soja	50-100%	20%	Sustitución
Ribotta & Rosell (2010)	Maíz y yuca	Soja	50%	5.5-11% (5.5% almidón, 5.5% proteína)	Adición
Colombo, León, & Ribotta (2011)	Maíz, trigo y yuca	Soja	50-68%	6-30.2%	Adición
Chinma, Ariahu, & Abu (2013)	Yuca	Soja	0-50%	1-18%	Sustitución
Dang, Loisel, Desrumaux, & Doublier (2009)	Maíz <i>waxy</i> entrecruzado	Suero	14.3-27.3%	3.5-5.5% (3-4% almidón, 0.5-1.5% proteína)	Adición
Onwulata, Tunick, & Thomas-Gahring (2014)	Maiz, Amioca (almidón maiz <i>waxy</i> comercial), Hylon VII (almidón alto en amilosa comercial), platano, cebada y guisante.	Suero	25-75%	9%	Sustitución

4.1.1. Estudios con proteínas vegetales

De los estudios disponibles de las interacciones de proteínas vegetales con almidón se puede observar que la más estudiada es la de soja, si bien también se ha investigado el efecto de otras proteínas vegetales como las de guisante, lenteja, cacahuete, gluten o lino.

En relación a la proteína de soja, en general los resultados de los diferentes estudios coinciden entre sí. En la mayoría de los estudios la presencia de esta proteína resultó en un aumento de las temperaturas y del pico de viscosidad de la gelatinización del almidón,

así como del módulo elástico, y en una disminución de la sinéresis (Chinma et al., 2013; Colombo et al., 2011; Li et al., 2007; Ribotta & Rosell, 2010). Todo ello posiblemente relacionado con la buena capacidad de retención de agua de esta proteína, y por tanto una menor disponibilidad del agua para la gelatinización del almidón (Adebowale, Sanni, & Awonorin, 2005; Chinma et al., 2013; Rocca, Ribotta, Pérez, & León, 2009); así como con el hecho de que en algunos estudios la incorporación proteica se realizara por adición. Sin embargo, Villanueva et al. (2018) no observó cambios en las temperaturas de gelatinización con la presencia de la proteína de soja. Esto puede ser debido a que en este estudio el pH del medio se modificó, mientras que los otros estudios utilizaron agua como dispersante. Si bien con esta proteína los resultados de diferentes estudios coinciden de manera general, esto no ocurre con todas las proteínas. En el caso específico de las investigaciones con proteína de guisante se puede apreciar que Ribotta et al. (2012) observaron un aumento del pico de viscosidad al adicionar la proteína, mientras que Oñate Narciso & Brennan (2018) observaron un descenso. Al igual que ocurre con la soja, esta proteína presenta una buena capacidad de retención de agua (Toews & Wang, 2013), por lo que podría esperarse un comportamiento similar. Las diferencias pueden estar relacionadas con los diferentes almidones utilizados, arroz en el caso de Oñate Narciso & Brennan (2018), y yuca y maíz en el caso de Ribotta et al. (2012). La sinéresis solo fue evaluada por Ribotta et al. (2012), que concluyeron que la presencia de guisante no la modificó.

El resto de los estudios disponibles con proteínas vegetales se focalizaron en proteínas de lenteja (Joshi et al., 2014), cacahuete (Sun & Xiong, 2014), gluten hidrolizado (Chen et al., 2018) o lino hidrolizado (Yi et al., 2017). El hecho de que las proteínas estudiadas sean tan variadas, podría complicar la comparación de los resultados. Sin embargo, si se observó que los resultados de Joshi et al. (2014) y Sun & Xiong (2014) coincidieron; al observar un descenso del pico de viscosidad, módulo elástico y dureza de geles con la presencia de la proteína. Estos autores justificaron el descenso a una falta de interacción entre proteína y almidón, junto con la mayor solubilidad y por lo tanto menor capacidad de retención de

agua de las proteínas que estudiaron respecto al almidón. En base a esta justificación, sería de esperar que el uso de proteínas hidrolizadas, como hacen Chen et al. (2018) y Yi et al. (2017), también resultara en un descenso de estas propiedades. Esta asunción se cumple para Chen et al. (2018), pero no para Yi et al. (2017). Lo que posiblemente esté ocurriendo con más seguridad es que las diferencias entre estos estudios se deban a que cada proteína posee diferentes grupos funcionales, lo cual hará que cada una interactúe de manera diferente con el almidón.

4.1.2. Estudios con proteínas animales

Al igual que ocurre con los estudios con proteínas vegetales, son diversas las proteínas animales estudiadas. En general, las investigaciones se centran principalmente en las proteínas de la leche, aunque también se encuentran estudios con proteína de huevo.

Dentro de los estudios con proteínas de la leche se puede observar que se han investigado tanto las proteínas del suero como caseínas. En los estudios realizados con caseínas, priman los estudios sobre su efecto sobre el almidón de maíz (normal y/o *waxy*) (Bertolini et al., 2005; Goel et al., 1999; Kett et al., 2013; Lelievre & Husbands, 1989), aunque también se consideró el efecto de esta proteína sobre otros almidones como el de yuca, patata, tapioca y/o trigo (Bertolini et al., 2005; Doublier et al., 1994). En general, estos estudios, que se realizaron adicionando caseína, muestran que la presencia de esta proteína resulta en un aumento de las temperaturas y del pico de viscosidad durante el proceso de gelatinización (Bertolini et al., 2005; Goel et al., 1999; Kett et al., 2013; Noisuwan et al., 2008), posiblemente por el hecho de que esta se sitúe en la fase continua, lo cual aumentaría la concentración de sólidos en dicha fase, resultando en una viscosidad mayor. Sin embargo, parece que la fuente de almidón es importante en las interacciones caseína-almidón, ya que Bertolini et al. (2005) observó una disminución del pico de viscosidad cuando el almidón utilizado fue el de patata. La importancia de la fuente de almidón sobre las interacciones con esta proteína vuelve a evidenciarse al observar la influencia de la misma sobre el módulo elástico y/o la viscosidad de pastas

almidonosas. Así, en diferentes estudios se observa un incremento de estos parámetros al incorporar caseína (Bertolini et al., 2005; Lelievre & Husbands, 1989), mientras que en otros se observó un descenso cuando los almidones utilizados fueron los de patata o tapioca (Bertolini et al., 2005; Doublier et al., 1994). El ratio amilosa-amilopectina también parece ser clave, ya que se ha observado que el hinchamiento de los gránulos en caliente se incrementa por la presencia de caseína cuando se usan almidones *waxy* (Kett et al., 2013; Lelievre & Husbands, 1989), pero disminuye cuando se utilizan otros almidones (Doublier et al., 1994).

En las investigaciones realizadas con proteína de suero, se analizó su interacción tanto con almidones nativos (Aguilera & Baffico, 1997; Aguilera & Rojas, 1997; Noisuwan et al., 2008; Oñate Narciso & Brennan, 2018; Onwulata et al., 2014; Shim & Mulvaney, 2001; Yang et al., 2004), como con almidones modificados químicamente (Dang et al., 2009; Fitzsimons et al., 2008; Onwulata et al., 2014; Ravindra et al., 2004). Al igual que ocurría con otras proteínas, la presencia de suero modifica el comportamiento del almidón. Esto queda evidenciado si analizamos los cambios del pico de viscosidad durante el proceso de gelatinización. Así, Onwulata et al. (2014) y Oñate Narciso & Brennan (2018) observaron un descenso en el pico de viscosidad a medida que aumentaba el porcentaje de suero con todos los almidones estudiados. Sin embargo, el estudio de Noisuwan et al. (2008) muestra que el efecto de esta proteína está condicionado por la concentración de la misma, y que a niveles bajos puede llegar a disminuir el valor del pico de viscosidad que ocurre en la gelatinización. El tipo de almidón parece ser también clave, ya que en este mismo estudio esta disminución se observó para todos los niveles de adición cuando el almidón utilizado fue un almidón *waxy* (bajo en amilosa). Por ello, podría pensarse que el incremento de viscosidad observado en otros estudios puede estar relacionado con interacciones de las proteínas con la amilopectina. Los resultados respecto a las temperaturas de gelatinización también varían, aumentando (Fitzsimons et al., 2008; Shim & Mulvaney, 2001) o no (Noisuwan et al., 2008), en función de las condiciones específicas de cada estudio (ratio de los polímeros, concentración, condiciones

experimentales, etc). En lo referente a las propiedades de los geles elaborados con las mezclas proteína-almidón mediante un tratamiento térmico, parece que la coexistencia de la proteína de suero con el almidón da lugar a geles muy dependientes del índice de cizalla y menos consistentes que aquellos con solo almidón o suero (Dang et al., 2009; Onwulata et al., 2014; Ravindra et al., 2004; Yang et al., 2004). De todas formas, algunos estudios (Aguilera & Baffico, 1997; Aguilera & Rojas, 1996) evidencian que la presencia de hasta un 10-20% de algunos almidones en geles a base de caseína puede aumentar los valores del módulo elástico de los mismos con respecto a un gel solo con proteína. Sin embargo, la importancia del pH sobre el módulo elástico solo ha sido considerada por Shim & Mulvaney (2001), observando diferencias dependiendo del pH del medio.

Respecto a otro tipo de proteínas animales, los estudios son limitados, y parece ser que solo Villanueva et al. (2018) han estudiado recientemente mezclas de diferentes almidones con una proteína no láctea: la de clara de huevo. Estos autores observaron que la presencia de proteína no afectó a las temperaturas de gelatinización, pero si incrementaron el módulo elástico de los geles.

En general puede verse que a pesar del elevado número de estudios sobre las interacciones proteína-almidón, hay estudios que encuentran resultados contradictorios. Como ya se ha ido indicado a lo largo de esta sección, esto puede deberse a los diferentes tipos y porcentajes de las proteínas y almidones utilizados, la diferente concentración de sólidos entre los estudios (reflejados en la Tabla 1), junto con la variabilidad de las condiciones experimentales. Todo ello dificulta la comparación de los mismos, y poder sacar conclusiones generales. Por todo ello, parece necesario comparar un número más elevado de proteínas, a concentraciones más elevadas y bajo unas mismas condiciones experimentales, con el objetivo de poder hacer un análisis claro, sin tantas variables interfiriendo, del efecto de altos niveles de proteínas en las propiedades de las harinas/almidones. De esta forma se podrá tener una idea más clara de cómo la adición proteica influirá en los productos horneados a base de cereales.

4.2. Panes sin gluten enriquecidos proteicamente

Los panes son productos fermentados y horneados compuestos principalmente por harina y agua, con una humedad final del 35-40% (Wade, 1988). La humedad final está relacionada con la hidratación de las masas, que varían según el tipo de pan, pero en general la mayoría de los panes contienen en su formulación un nivel de hidratación del 55–65% en base harina (Martínez, Román, & Gómez, 2018). Tradicionalmente los panes se elaboran con harina de trigo, siendo el gluten la proteína mayoritaria de este cereal. Como ya se ha indicado con anterioridad, dicha proteína tiene una función estructural muy importante, contribuyendo de manera considerable a la apariencia y estructura de los productos fermentados y horneados a base de trigo, como es el pan. Su ausencia resulta en masas sin cohesión, que darán lugar a panes con tendencia a desmigarse, blanquecinos y con otros defectos sensoriales (Gallagher et al., 2004). Por ello, los panes sin gluten suponen un reto tecnológico para la industria alimentaria, ya que las harinas sin gluten no tienen la capacidad de formar masas extensibles (Wieser, 2007), con capacidad de retener gas (Gan, Ellis, & Schofield, 1995) y dar lugar a productos con una buena estructura de miga en el producto final. La funcionalidad del gluten se intenta sobrevenir haciendo uso de ingredientes que de alguna forma intentan imitar el comportamiento del gluten, como gomas o hidrocoloides (Gallagher et al., 2004); o mediante el uso de nuevas tecnologías como lo son las altas presiones (Vallons, Ryan, & Arendt, 2011). Además de este reto, los panes sin gluten tienen el problema de presentar un perfil nutricional más pobre que los panes con gluten, ya que tienen un contenido proteico menor (Miranda et al., 2014). Es por ello que su enriquecimiento proteico puede resultar aún más interesante que el de los panes con gluten. En esta línea, son varios los autores que ya han estudiado el efecto de diferentes proteínas sobre las propiedades y la aceptabilidad de panes sin gluten (Tabla 2). Estas investigaciones no se focalizan en una sola proteína; y pueden encontrarse estudios que prueban diferentes proteínas animales y vegetales a diferentes niveles, ya bien por adición o sustitución de carbohidratos (en la mayoría de los casos). Además, la formulación control no es siempre la misma. Por ejemplo, hay estudios

que solo utilizan almidón, mientras que otros usan harina o mezclas de almidón y harina. Todo esto hace que aumenten las variables que afectan a las propiedades de los panes sin gluten y que pueda llegar a ser complicado hacer una comparativa de los resultados de cada estudio. En la literatura también hay disponibles estudios sobre enriquecimiento proteico de panes con gluten, pero estas no se abordan en esta introducción por no ser este tipo de panes objeto de estudio en esta tesis doctoral.

Tabla 2. *Investigaciones sobre enriquecimiento proteico de panes sin gluten.*

Estudio	Almidón/harina utilizada	Proteína utilizada	Forma de incorporar la proteína	Cantidad de proteína
Gallagher, Gormley, & Arendt (2003)	Harina sin gluten (no se especifica origen)	Proteínas lácteas	Adición	3-6 g/ 100 g harina
Marco & Rosell (2008)	Harina de arroz	Soja	Sustitución parcial de la harina	13 g/100 g mezcla proteína-harina
Nunes, Ryan, & Arendt (2009)	Harina de arroz Almidón de patata	Caseína y suero	Adición	10 g/100 g mezcla harina-almidón
Shin, Gang, & Song (2010)	Harina de arroz	Suero, caseína y soja	Sustitución parcial de la harina	3 o 6 g/100 g mezcla proteína-harina
Crockett, le, & Vodovotz (2011)	Harina de arroz Almidón de yuca	Soja y albúmina	Adición	Soja: 1-3 g/ 100 g masa Albúmina: 5-15 g/100g masa
Smerdel et al. (2012)	Harinas extruidas (arroz/ trigo sarraceno/ patata/ maíz) Almidón de maíz	Soja, albúmina y caseína	Adición	La necesaria para un contenido proteico de los panes constante (no se indica cual)
Krupa-Kozak, Baczek, & Rosell (2013)	Almidón de maíz y de patata	Caseína, suero y suero hidrolizado	Sustitución parcial del almidón de maíz	19.9 o 39.8 g/100 g almidón de maíz
Ziobro, Witczak, Juszcak, & Korus (2013)	Almidón de maíz y de patata	Albumina, altramuz, soja, colágeno y guisante	Sustitución parcial del almidón	10 g/100 g mezcla proteína-almidón
Storck et al.(2013)	Harina de arroz	Albúmina y caseína	Sustitución parcial de la harina	0-6 g/100 g mezcla proteína-harina

Estudio	Almidón/harina utilizada	Proteína utilizada	Forma de incorporar la proteína	Cantidad de proteína
Kittisuban, Ritthiruangdej, & Supphantharika (2014)	Almidón de arroz	Suero	Sustitución parcial del almidón	1 o 2 g/100 g mezcla proteína-almidón
Ziobro, Juszczak, Witczak, & Korus (2016)	Almidón de maíz y de patata	Albumina, altramuz, soja, colágeno y guisante	Sustitución parcial del almidón y total de pectina y goma guar	10 g/103.7 g mezcla proteína-almidón
Nozawa, Ito, & Arai (2016)	Harina de arroz	Albumina	Adición	0.625-5 g/100 g harina
Phongthai, D'Amico, Schoenlechner, & Rawdkuen (2016)	Harina de arroz	Albumina	Adición	2 o 4 g/100 g harina
Aprodu, Alexandra Badiu, & Banu (2016)	Harina de arroz y maíz Almidón de patata	Soja, altramuz, huevo, caseína y suero	Sustitución parcial de las harinas y el almidón	15 g/100g mezcla proteína-harinas-almidón
Witczak, Juszczak, Ziobro, & Korus (2017)	Almidón de maíz y de patata	Patata	Sustitución parcial del almidón	2, 6 o 10 g/100 g mezcla proteína-almidón
Horstmann, Foschia, & Arendt (2017)	Almidón de patata	Patata, soja, guisante, altramuz, algarroba	Adición	2 g/100 g almidón
Han et al. (2019)	Mezcla comercial (harinas de garbanzo, yuca, sorgo, alubia y almidón de patata)	Albúmina	Sustitución	0-15 g/100 g mezcla proteína-harina
Pico, Reguilón, Bernal, & Gómez (2019)	Harina de arroz y almidón de maíz	Arroz, guisante, albúmina y suero	Sustitución parcial de la harina y el almidón	5 o 10 g/100 g mezcla proteína-harina-almidón

En los estudios de panes sin gluten, queda claro que la viscoelasticidad de las masas enriquecidas está relacionada con la fuente proteica que se adiciona. Así, la presencia de huevo o suero suele reducir el módulo elástico de estas (Crockett et al., 2011; Nunes et

al., 2009; Ziobro et al., 2016, 2013), probablemente por la buena solubilidad de estas proteínas (Boland, 2011; Strixner & Kulozik, 2011). Sin embargo, Phongthai et al. (2016) observaron un ligero aumento de la consistencia con la incorporación de niveles muy bajos de proteína de huevo. Este resultado inesperado puede deberse a un sobrecalentamiento de la masa durante su elaboración que de alguna manera hubiera desnaturizado dichas proteínas, ya que la proteína de huevo coagula con calor, provocando un aumento del módulo elástico de las masas que la contienen (Han et al., 2019). Respecto a la caseína, parece que su incorporación aumenta la elasticidad de las masas sin gluten (Nunes et al., 2009). Existen otros estudios que miden la consistencia de las masas con Mixolab®, lo cual conlleva un calentamiento de la masa, y hace que los resultados de estos estudios no sean comparables con los resultados de ensayos oscilatorios de reología donde no hay un calentamiento de las masas. Aun así, los resultados de los estudios que utilizan este método no siempre coinciden, ya que Krupa-Kozak et al. (2013) observó un descenso de la consistencia al adicionar caseína, mientras que Aprodu et al. (2016) observó un aumento para esta misma proteína. Quizás estas diferencias estén relacionadas con el porcentaje de proteína utilizado, considerablemente mayor en el estudio de Krupa-Kozak et al. (2013). Por su parte, la incorporación de proteínas vegetales (guisante, soja, patata y altramuz) resultó en un aumento de la viscoelasticidad de las masas (Aprodu et al., 2016; Crockett et al., 2011; Marco & Rosell, 2008; Witczak et al., 2017; Ziobro et al., 2016, 2013), posiblemente por la baja solubilidad y buena capacidad de hidratación que las proteínas vegetales suelen presentar (Zayas, 1997b). Solamente el estudio de Ziobro et al. (2016) observó un descenso en el módulo elástico al incorporar proteína de altramuz, pero esto está muy probablemente relacionado con el hecho de que en este estudio la proteína está sustituyendo no solo parte de la harina, si no también pectina y goma guar.

En lo que respecta al volumen específico, se observa que las proteínas animales tienden a aumentar el volumen, aunque este efecto es más claro al incorporar clara de huevo (Crockett et al., 2011; Han et al., 2019; Nozawa et al., 2016; Phongthai et al., 2016; Storck

et al., 2013; Ziobro et al., 2016, 2013). Esto se justifica por las buenas propiedades emulsionantes de esta proteína (Mine, 1995; Strixner & Kulozik, 2011), y su coagulación a temperaturas similares al almidón (Biliaderis, Maurice, & Vose, 1980). Se podría decir que las proteínas lácteas (caseína y suero) también siguen esta tendencia (Aprodu et al., 2016; Krupa-Kozak et al., 2013; Nunes et al., 2009; Shin et al., 2010), también por sus buenas propiedades espumantes (Boland, 2011; O'Kennedy, 2011). Sin embargo, hay estudios discordantes. Así, Kittisuban et al. (2014), que también incorporaron suero, no observaron una tendencia clara, ya que para el volumen específico subía o bajaba respecto al control en función del nivel proteico de forma no lineal. Esto puede deberse a que en este estudio se estaban modificando los niveles de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y levadura a la vez que los niveles de proteínas. De hecho, lo que sí que observaron estos autores fue un descenso del volumen al aumentar al mismo tiempo los niveles de proteína y HPMC. Por su parte Gallagher et al. (2003) también observó que la inclusión de proteínas lácteas resultó en un descenso del volumen específico. Esto puede estar influenciado por un colapso de las masas durante el proceso de horneado, por el calentamiento de las proteínas de suero y la pérdida de su funcionalidad espumante (Boland, 2011). Los estudios disponibles sobre enriquecimiento con proteína de colágeno (Ziobro et al., 2016, 2013) observan un descenso del volumen específico, posiblemente por sus buenas capacidades de fijación de agua (Tarté, 2011), lo cual puede dificultar el crecimiento de la masa durante la fermentación y el horneado. Respecto al efecto de proteínas vegetales en este parámetro, también dependió de la proteína utilizada. Así, la incorporación de proteínas de soja resultó en un descenso del volumen específico (Aprodu et al., 2016; Crockett et al., 2011; Marco & Rosell, 2008; Ziobro et al., 2016, 2013), aunque en el caso de Crockett et al. (2011), que utilizó dos formulaciones control diferentes, esto solo se cumple con una de las formulaciones, lo cual de nuevo muestra la importancia de la formulación de partida, y lo cuidadosos que debemos ser al sacar conclusiones generales de los estudios disponibles. Para la formulación que no sigue la misma tendencia que los otros estudios citados, Crockett et al. (2011) observaron que respecto a la formulación control, el volumen aumentó con los niveles más bajos de

proteína pero se mantuvo para los niveles más altos. Algo parecido le ocurre a Witczak et al. (2017), que observó que la incorporación de proteína de patata a niveles del 2% (en base harina) resultó en un aumento del volumen específico, pero a niveles superiores este disminuyó. Para otras proteínas los resultados entre estudios no fueron del todo congruentes. Por ejemplo, el enriquecimiento con proteína de altramuza no modifica (Ziobro et al., 2016), sube (Ziobro et al., 2013) o baja (Aprodu et al., 2016) el volumen en función del estudio. Lo mismo ocurre con la proteína de guisante, la cual no tiene efecto en el volumen específico en el estudio de Ziobro et al. (2013), pero que lo disminuye según Ziobro et al. (2016). Esto de nuevo muestra que la matriz, el porcentaje y las condiciones experimentales deben considerarse antes de sacar conclusiones sobre el efecto de una determinada proteína. Posiblemente el nivel de humedad de los panes (diferente en cada estudio, y optimizado, o no, de forma diferente en cada caso) está influyendo de manera significativa en los volúmenes específicos que obtiene cada estudio. Llama la atención que no se le dé más importancia a este nivel de hidratación, ya que el volumen específico de los panes es un factor visual que los potenciales compradores tendrán en cuenta a la hora de comprar un determinado pan. De los estudios reflejados en la Tabla 2, solamente Aprodu et al. (2016) hace un barrido de humedades, evidenciando que la misma influye de manera significativa en las propiedades de los panes sin gluten.

En la línea de lo observado con el volumen, para la textura de los panes sin gluten enriquecidos también se observa que, si bien la fuente de proteína influye en los resultados, también lo hace la matriz, el porcentaje proteico y las condiciones experimentales. A la hora de evaluar la textura de panes sin gluten, es importante tener en mente que existe una relación inversamente proporcional entre volumen específico y dureza (más volumen menos dureza); como ya ha sido demostrado por diversos estudios sobre panes sin gluten (Jafari, Koocheki, & Milani, 2018; Mancebo, Martínez, Merino, de la Hera, & Gómez, 2017; Martínez & Gómez, 2017). Con la excepción de los estudios con proteína de huevo, cuya presencia en general aumentó tanto el volumen como la dureza,

para el resto de los estudios sí que se observa esta relación inversamente proporcional entre volumen específico y dureza, de manera muy evidente en el estudio de (Damin, Alcântara, Nunes, & Oliveira, 2009). Volviendo a las observaciones sobre la dureza de los estudios disponibles, Gallagher et al. (2003) y Nunes et al. (2009) observaron un incremento de la dureza con la incorporación de proteínas láctelas. Esto está de acuerdo con las observaciones de Kittisuban et al. (2014) con proteína de suero, pero no con las de Aprodu et al. (2016) que observó un descenso tanto con suero como caseína, o Krupa-Kozak et al. (2013), que observó un descenso al incorporar suero, aunque si observó un aumento al incorporar caseína. Respecto a la proteína de huevo parece que la presencia de esta proteína bien aumenta la dureza (Crockett et al., 2011; Nozawa et al., 2016; Phongthai et al., 2016), no la modifica significativamente (Han et al., 2019) o la baja (Aprodu et al., 2016). Con las proteínas vegetales ocurre algo parecido, y también se observan resultados discordantes entre estudios. Por ejemplo, con la incorporación de proteína guisante Ziobro et al. (2013) observaron un aumento de la dureza, mientras que Ziobro et al. (2016) observaron un descenso. La forma de incorporar la proteína seguramente influye en estos resultados, ya que en el caso de Ziobro et al. (2016) la incorporación proteica se realizó mediante una sustitución parcial del almidón y total de pectina y goma guar, mientras que en el caso de Ziobro et al. (2013) la incorporación proteica se realizó sustituyendo solamente parte del almidón, pero ningún otro ingrediente. Algo parecido ocurre con la proteína de soja, con la cual Marco & Rosell (2008) observa un incremento de la dureza, mientras que Crockett et al. (2011) y Aprodu et al. (2016) observaron lo contrario. Sin embargo, al incorporar proteína de altramuz, estos últimos autores observaron un incremento de la dureza.

En lo que respecta al color, en general la incorporación de proteína en las formulaciones de los estudios resumidos en la Tabla 2 se traduce en una tendencia general de oscurecimiento de la corteza. Son interesantes los resultados del estudio de Pico et al. (2019), centrado en el efecto del enriquecimiento proteico de panes sin gluten en su corteza. Dicho estudio muestra que, si bien el oscurecimiento ocurre tanto con proteínas

animales como vegetales, este es más evidente con las proteínas animales. Dichas diferencias podrían atribuirse a la mayor solubilidad de las proteínas animales, lo cual podría inducir un mayor contacto con los azúcares reductores, que también están disueltos. Además, este mismo estudio también muestra que la incorporación de proteínas modifica el perfil aromático de los panes, lo cual puede tener un efecto en la aceptabilidad de los mismos, aunque en este caso no se realizó una evaluación sensorial.

En los estudios en los que se llevó a cabo una cata hedónica de los panes sin gluten enriquecidos proteicamente (Crockett et al., 2011; Gallagher et al., 2003; Kittisuban et al., 2014; Phongthai et al., 2016; Shin et al., 2010; Witczak et al., 2017; Ziobro et al., 2016, 2013), si se observó un efecto en la aceptación de los mismos. Con la excepción de los estudios de Gallagher et al. (2003) y Shin et al. (2010) con proteínas lácteas y soja (esta solo en el último estudio), y Phongthai et al. (2016) con albúmina de huevo, la incorporación de proteínas tanto animales como vegetales resultó en una peor evaluación de los parámetros hedónicos evaluados, especialmente del sabor. Sin embargo, en algunos estudios algunas de las proteínas vegetales (guisante y patata) si mejoraron la apariencia, el olor y el color (Witczak et al., 2017; Ziobro et al., 2016, 2013), según la apreciación de los catadores. Por otra parte, en algunos casos las proteínas animales mejoraron el olor (colágeno) o el color (huevo) (Ziobro et al., 2016).

Todos los estudios disponibles muestran de nuevo, al igual que ocurría con los estudios de interacciones proteína-almidón, que hay estudios con una misma proteína que muestran resultados discordantes. Esto de nuevo puede deberse a los diferentes porcentajes utilizados, las diferencias en la formulación, o las condiciones experimentales. Además de las ya citadas investigaciones, existen estudios sobre enriquecimiento proteico de panes sin gluten que no incorporan una formulación control (Horstmann et al., 2017; Smerdel et al., 2012), lo cual hace aún más complicado poder sacar conclusiones del efecto de cada proteína.

4.3. Bizcochos enriquecidos proteicamente

Los bizcochos son productos horneados compuestos de harina, azúcar, leche, huevo, y agentes impulsores con una humedad final del 18-28% (Bennion & Bamford, 1997), aunque la formulación puede variar según el tipo de bizcocho. Estos pueden dividirse en dos grandes grupos:

- Bizcochos tipo “sponge”. Son bizcochos muy aireados que dan lugar a bizcochos con una estructura interna relativamente abierta.
- Bizcochos tipo “layer”. Son bizcochos que además de los ingredientes arriba expuestos, contienen grasa sólida (mantequilla) (Wilderjans, Luyts, Brijs, & Delcour, 2013). Esta grasa, cremada con el azúcar, da lugar a un batido aireado que dará lugar a bizcochos con una estructura mucho más fina y cerrada (McWilliams, 1989).

El enriquecimiento proteico de bizcochos ha sido estudiado tanto con proteínas vegetales como animales (Tabla 3). Al igual que lo que se observaba con el enriquecimiento proteico de panes, existen estudios que se focalizan en proteínas diferentes, tanto animales como vegetales, si bien la más estudiada es la soja, como ocurría con los estudios sobre panes.

Tabla 3. Investigaciones sobre enriquecimiento proteico de bizcochos.

Estudio	Almidón/harina utilizada	Proteína utilizada	Forma de incorporar la proteína	Cantidad de proteína
Jyotsna, Sai, Manohar, Indrani, & Venkateswara Rao (2007)	Harina de trigo	Suero	Sustitución	10-30 g/ 100 g mezcla harina-proteína
Wilderjans et al.(2008)	Almidón de trigo	Gluten	Sustitución	5-15 g/ 100 g mezcla almidón-proteína No hay control
Subagio & Morita (2008)	Harina de trigo	Proteínas de judía egipcia y semillas de judía egipcia	Sustitución	0.5-1.5 g/ 75 g mezcla harina-proteína
Ronda, Oliete, Gómez, Caballero, & Pando (2011)	Almidones de maíz, patata, trigo y arroz	Soja y gluten	Sustitución	10-20 g/ 100 g mezcla almidón-proteína
Majzoobi, Ghiasi, Habibi, Hedayati, & Farahnaky (2014)	Harina de trigo	Soja	Sustitución	5-30 g/ 100 g mezcla harina-proteína
Matos, Sanz, & Rosell (2014)	Harina de arroz	Soja, guisante, albúmina, caseína y gluten	Adición	17.3 g/ 117.3 g harina
Shevkani & Singh (2014)	Almidón de maíz	Proteínas de alubias rojas, guisante, amaranto y gluten	Sustitución	10 g/100 g mezcla almidón-proteína
Shevkani, Kaur, Kumar, & Singh (2015)	Harina de arroz	Proteína de chicheros rojos y blancos	Sustitución	4-12 g/100 g mezcla harina-proteína
Bala, Kumar, Nanda, & Gupta (2019)	Harina de maíz	Albúmina, caseína, suero y soja.	Adición	13 g/50 g harina

El efecto de la presencia proteica en las propiedades de los batidos/masas de bizcochos ha sido evaluado de manera distinta según qué estudio. Así, la mayoría se centra en su efecto en la densidad (Bala et al., 2019; Jyotsna et al., 2007; Majzoobi et al., 2014; Ronda et al., 2011; Wilderjans et al., 2013), aunque dentro de estos algunos también estudian el efecto en la viscosidad (Jyotsna et al., 2007; Wilderjans et al., 2013). Por otro lado, ciertos estudios se focalizaron en evaluar la viscoelasticidad de las masas (Bala et al., 2019; Matos et al., 2014; Ronda et al., 2011; Shevkani et al., 2015; Shevkani & Singh, 2014). Estas tres mediciones dan información diferente, lo cual hace complicado comparar los resultados entre estudios. Los estudios que evaluaron la densidad observaron un descenso de la misma con la incorporación de las diferentes proteínas. Solamente Ronda et al. (2011) y Bala et al. (2019) observaron un incremento de la densidad al combinar la proteína de gluten o soja (respectivamente) con almidón de maíz, pero no al combinar gluten con almidón de trigo (Ronda et al., 2011), donde sí se observó un descenso. Esto de nuevo pone en evidencia la importancia del almidón en las interacciones proteína-almidón, como ya se ha indicado en las sub-secciones anteriores “4.1. Efecto de diferentes proteínas sobre las propiedades del almidón” y “4.2. Panes enriquecidos proteicamente”. Respecto a la viscosidad, (Jyotsna et al., 2007) observó un descenso, mientras que (Wilderjans et al., 2008) observó lo contrario. Respecto a la viscoelasticidad de las masas, de manera general se vio aumentada por la presencia de proteínas vegetales (Bala et al., 2019; Matos et al., 2014; Ronda et al., 2011; Shevkani et al., 2015; Shevkani & Singh, 2014), posiblemente por la buena capacidad de retención de agua de las mismas, mientras que las proteínas animales disminuyeron la misma (Bala et al., 2019; Matos et al., 2014). Respecto a esta característica, llama la atención que Ronda et al. (2011) observaron que en sus masas la componente viscosa siempre fue superior a la componente elástica, mientras que en el resto de los estudios observaron lo contrario. Esto podría deberse a las diferencias en las formulaciones, ya que este estudio es el único que usa almidón en lugar de harina.

Las propiedades de los productos finales también se vieron afectadas por la presencia de proteínas, aunque no siempre con una tendencia clara. Por ejemplo, la proteína de soja aumentó el volumen específico aumentó ligeramente en algunos (Bala et al., 2019; Majzoobi et al., 2014), mientras que en otros este aumento solo se observó con ciertos almidones, como los de trigo y patata (Ronda et al., 2011), o directamente no se vio influenciado (Matos et al., 2014; Ronda et al., 2011). Con esta misma proteína, para la dureza también se observaron resultados discordantes, ya que Majzoobi et al. (2014) observaron un aumento a medida que se incrementaba el porcentaje proteico, mientras que Bala et al. (2019) observaron un descenso. Esto es interesante, ya que Bala et al. (2019) adicionó la proteína (aumentando por tanto la proporción de sólidos en la masa), mientras que Majzoobi et al. (2014) incorporó la proteína por sustitución. Las diferencias entonces podrían estar relacionadas bien con la harina utilizada (de maíz y trigo respectivamente) o más probablemente con las diferencias en la formulación, ya que el estudio de Bala et al. (2019) no se incluye ni huevo ni leche. En las primeras fases del horneado, las burbujas de aire dentro de las masas se expanden debido al calentamiento, lo cual hace que en mayor o menor medida haya coalescencia entre las diferentes burbujas o que el aire se escape del producto. Dicha coalescencia puede ser disminuida por la presencia de huevo y/o leche, ya que estas proteínas tienen la capacidad de estabilizar estas burbujas. Esto se debe a que durante el horneado las proteínas de huevo coagulan (Kiosseoglou & Paraskevopoulou, 2006), mientras que las de suero se agregan (Koo, Chung, Ogren, Mutilangi, & McClements, 2018), lo cual podría ayudar a mantener más aire en los bizcochos y por tanto a dar volúmenes mayores. Con otras proteínas también se encontraron resultados diferentes, como por ejemplo con la proteína de gluten, donde sí se observó una tendencia de incremento del volumen específico (posiblemente por la formación de la red de gluten), pero por el contrario, la dureza disminuyó (Shevkani & Singh, 2014; Wilderjans et al., 2008) o no se vio afectada (Matos et al., 2014). En lo que respecta al color, y en línea con lo observado en panes, un incremento de proteína resultó en un oscurecimiento de los bizcochos. La aceptabilidad de los bizcochos enriquecidos con proteínas vegetales no se vio afectada a niveles de

proteína bajos (Bala et al., 2019; Majzoobi et al., 2014; Subagio & Morita, 2008). Sin embargo, Majzoobi et al. (2014) observaron un empeoramiento drástico de las características sensoriales cuando el porcentaje de proteína en las mezclas proteína-almidón usadas superaron el 30%. Por su parte, las proteínas animales parecen ayudar a mejorar la aceptabilidad de los bizcochos, como sugieren los resultados de Bala et al. (2019).

De nuevo es evidente que existen resultados discorantes entre los estudios disponibles, lo cual de nuevo puede deberse a los diferentes porcentajes utilizados, las diferencias en la formulación, o las condiciones experimentales.

4.4. Galletas “Sugar-snap” enriquecidas proteicamente

Las galletas son productos horneados compuestos básicamente de harina, azúcar, grasa y agua; aunque pueden llevar otros ingredientes. La principal característica de las galletas respecto a otros a base de cereales es su baja humedad, inferior al 5% (Wade, 1988). Al igual que con otros productos, existen diferentes tipos de galletas, dentro de los cuales destacan las “Sugar-snap cookies”. Estas se caracterizan por su elevado contenido en grasa y azúcar, lo cual imposibilita un desarrollo de la red de gluten, dando lugar a masas de galletas poco extensibles (también denominadas masas cortas) (Wade, 1988). En este tipo de galletas, es fundamental que durante el amasado se desarrolle lo menos posible la red de gluten (cuando se use harina de trigo), aunque los ingredientes deben dispersarse adecuadamente (Baltsavias, Jurgens, & Van Vliet, 1999), aunque debido a los altos niveles de grasa y azúcar de este tipo de galletas, la influencia que las proteínas pueden tener sobre la misma es limitado. A pesar de ello, la proteína no es inerte en la masa, especialmente durante el horneado (Gaines, 1990).

El enriquecimiento proteico de este tipo de galletas ha sido estudiado tanto con proteínas vegetales como animales. Al igual que con las mezclas proteína-almidón, ocurre que hay estudios donde la harina ha sido parcialmente sustituida por proteína, mientras que existen otros en los que se ha añadido a mayores (Tabla 4).

Tabla 4. Investigaciones sobre enriquecimiento proteico de galletas.

Estudio	Almidón/harina utilizada	Proteína utilizada	Forma de incorporar la proteína	Cantidad de proteína
Claughton & Pearce (1989)	Harina de trigo	Proteína de semilla de girasol	Sustitución	0-20 g proteína /100 g mezcla harina-proteína
Kara, Sivri, & Köksel (2005)	Harina de trigo	Proteasas	Adicción	No está claro
Pareyt, Wilderjans, Goesaert, Brijs, & Delcour (2008)	Almidón de trigo	Gluten	Sustitución	5-15 g proteína /100 g mezcla harina-proteína
Yadav, Yadav, & Chaudhary (2011)	Harina de trigo	Proteína del salvado de arroz	Sustitución	0-15 g proteína /100 g mezcla harina-proteína
Gani et al.(2015)	Harina de trigo	Caseína, proteína de suero e hidrolizados de estas proteínas	Sustitución	0-15 g proteína /100 g mezcla harina-proteína
Sarabhai et al.(2015)	Harinas de trigo y arroz	Soja y proteína de suero	Sustitución	0-10 g proteína /100 g mezcla harina-arroz-proteína
Sarabhai & Prabhasankar (2015)	Harina de castaña	Proteína de suero	Sustitución	5-10 g proteína /100 g mezcla harina-proteína
Wani, Sogi, Singh, & Khatkar (2015)	Harina de trigo	Proteína de sandía	Sustitución	2.5-10 g proteína /100 g mezcla harina-proteína
Mancebo, Rodríguez, & Gómez (2016)	Harina de arroz y Almidón de maiz	Proteína de guisante	Sustitución	10-20 g proteína/100 g mezcla harina-almidón-proteína
Gerzhova, Mondor, Benali, & Aider (2016)	Harinas de arroz y trigo sarraceno	Proteína de canola	Sustitución	3-9 g proteína/100 g mezcla harina-proteína
Sert, Demir, & Ertaş (2016)	Harina de trigo	Caseína	Adicción	3 g proteína/100 g harina
Tang & Liu (2017)	Harina de trigo	Proteína de soja y suero	Sustitución	0-30 g proteína/100 g harina

Puede apreciarse que, en su mayoría, el enriquecimiento proteico de este tipo de productos se realiza en galletas elaboradas con harina de trigo. Respecto a las proteínas estudiadas, en general son proteínas vegetales, aunque también hay estudios con proteínas animales. De manera general, la incorporación de proteínas vegetales resulta en galletas con un menor índice de expansión, aunque en algunos estudios las proteínas no tuvieron un efecto sobre este parámetro (Gani et al., 2015; Mancebo et al., 2016; Wani et al., 2015). En los estudios que usaron proteínas animales se encontró la tendencia opuesta, aumentando este parámetro (Sarabhai et al., 2015; Sarabhai & Prabhasankar, 2015). La adicción de proteasas a galletas resultó en un incremento del índice de expansión, lo que sugiere que además de con el origen, la influencia de las proteínas sobre este parámetro está relacionado con la longitud de las cadenas de aminoácidos de la proteína a incorporar. Por su parte, la dureza también se vio afectada por la presencia de proteínas exógenas, aunque los resultados observados en las diferentes investigaciones no siempre coinciden. En la mayoría de los estudios se observa un aumento de la dureza, pero Mancebo et al. (2016), Sarabhai et al. (2015) observaron lo contrario. Parece que esta está relacionada con la longitud de las cadenas proteicas y su efecto sobre el índice de expansión. En lo que sí coinciden los estudios es en el color, que se vio oscurecido por la presencia de proteínas. Respecto a la aceptabilidad, las observaciones de las diferentes investigaciones varían desde una mejor (Gerzhova et al., 2016) a una peor (Gani et al., 2015) aceptación, pasando por estudios donde no se observa un efecto (Mancebo et al., 2016), posiblemente debido a los diferentes porcentajes empleados.

Al igual que en las secciones anteriores, queda claro que los resultados entre diferentes estudios no siempre coinciden, lo cual de nuevo puede estar relacionado con los diferentes niveles proteicos utilizados, las diferencias en la formulación, o las condiciones experimentales.

Después de analizar la bibliografía disponible, se puede concluir que es complicado comparar unos estudios con otros debido tanto a la variabilidad de las condiciones

experimentales como de los porcentajes de proteína utilizados. Además, los porcentajes de sustitución de harina/almidón por proteínas en productos horneados a base de cereales son realmente bajos, lo cual hace que en la mayoría de los casos no se esté llegando a los niveles necesarios que demanda la población. Por lo tanto, parece necesario estudiar más en profundidad el efecto de porcentajes proteicos elevados tanto en el comportamiento de las harinas/ almidones, para su posterior incorporación en productos horneados a base de cereales. Todo ello con el objetivo final de conseguir que dichos productos tengan una cantidad de proteínas elevadas sin empeorar las características físicas de los mismos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- A. Bos, M., & van Vliet, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3), 437–471. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(00\)00077-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(00)00077-4)
- Adebowale, A. A., Sanni, L. O., & Awonorin, S. O. (2005). Effect of Texture Modifiers on the Physicochemical and Sensory Properties of Dried Fufu. *Food Science and Technology International*, 11(5), 373–382. <https://doi.org/10.1177/1082013205058531>
- Aguilera, J. M., & Baffico, P. (1997). Structure-mechanical properties of heat-induced whey protein/cassava starch gels. *Journal of Food Science*, 62(5), 1048–1054. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15035.x>
- Aguilera, J. M., & Rojas, E. (1996). Rheological, Thermal and Microstructural Properties of Whey Protein-Cassava Starch Gels. *Journal of Food Science*, 61(5), 962–966. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10911.x>
- Aguilera, J. M., & Rojas, G. V. (1997). Determination of kinetics of gelation of whey protein and cassava starch by oscillatory rheometry. *Food Research International*, 30(5), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(97\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(97)00058-6)
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008>
- Aprodu, I., Alexandra Badiu, E., & Banu, I. (2016). Influence of Protein and Water Addition on Gluten-Free Dough Properties and Bread Quality. *International Journal of Food Engineering*, 12(4). <https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0308>
- Bala, M., Arun Kumar, T. V., Tushir, S., Nanda, S. K., & Gupta, R. K. (2019). Quality protein maize based muffins: influence of non-gluten proteins on batter and muffin characteristics. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 713–723. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3529-8>
- Baltsavias, A., Jurgens, A., & Van Vliet, T. (1999). Rheological properties of short doughs at large deformation. *Journal of Cereal Science*, 29(1), 33–42. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0219>
- Banovic, M., Arvola, A., Pennanen, K., Duta, D. E., Brückner-Gühmann, M., Lähteenmäki, L., & Grunert, K. G. (2018). Foods with increased protein content: A qualitative study on European consumer preferences and perceptions. *Appetite*, 125, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.01.034>
- Beelen, J., Vasse, E., Janssen, N., Janse, A., de Roos, N. M., & de Groot, L. C. P. G. M. (2018). Protein-enriched familiar foods and drinks improve protein intake of hospitalized older patients: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 37(4), 1186–1192. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.05.010>
- BeMiller, J. N. (2019). Starches: Molecular and granular structures and properties. In *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists* (3rd ed., pp. 159–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00006-6>
- Bennion, E. B., & Bamford, G. S. (1997). *The technology of cake making*. (A. J. Bent, Ed.) (6th ed.).

- London (United Kingdom): Blackie Academic and Professional.
- Bertoft, E. (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy*, 7(3), 56. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030056>
- Bertolini, A. C., Creamer, L. K., Eppink, M., & Boland, M. (2005). Some rheological properties of sodium caseinate-starch gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2248–2254. <https://doi.org/10.1021/jf048656p>
- Biliaderis, C. G., Maurice, T. J., & Vose, J. R. (1980). Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science*, 45(6), 1669–1674. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07586.x>
- Boland, M. (2011). Whey proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins* (pp. 30–51). Cambridge (United Kingdom): Woodhead Publishing Limited.
- Branden, C., & Tooze, J. (1999). *Introduction to protein structure* (2nd ed.). New York (United States of America): Tylor and Francis.
- Calvo-Lerma, J., Crespo-Escobar, P., Martínez-Barona, S., Fornés-Ferrer, V., Donat, E., & Ribes-Koninckx, C. (2019). Differences in the macronutrient and dietary fibre profile of gluten-free products as compared to their gluten-containing counterparts. *European Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0385-6>
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M., & Carnovale, E. (1997). Solubility-Digestibility Relationship of Legume Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3387–3394. <https://doi.org/10.1021/jf970070y>
- Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., & Lorient, D. (1989a). Las proteínas de la leche. In J.-C. Cheftel, J.-L. Cuq, & D. Lorient (Eds.), *Proteínas alimentarias* (pp. 179–220). Zaragoza (España): Acribia, S.A.
- Cheftel, J.-C., Cuq, J.-L., & Lorient, D. (1989b). Propiedades funcionales de las proteínas. In J.-C. Cheftel, J.-L. Cuq, & D. Lorient (Eds.), *Proteínas alimentarias* (pp. 49–105). Zaragoza (España): Acribia, S.A.
- Chen, B., Zhang, B., Li, M. N., Xie, Y., & Chen, H. Q. (2018). Effects of glutenin and gliadin modified by protein-glutaminase on pasting, rheological properties and microstructure of potato starch. *Food Chemistry*, 253, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.155>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0451-8>
- Claughton, S. M., & Pearce, R. J. (1989). Protein Enrichment of Sugar-Snap Cookies with Sunflower Protein Isolate. *Journal of Food Science*, 54(2), 354–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb03079.x>
- Colombo, A., León, A. E., & Ribotta, P. D. (2011). Rheological and calorimetric properties of corn-, wheat-, and cassava- starches and soybean protein concentrate composites. *Starch/Staerke*, 63(2), 83–95. <https://doi.org/10.1002/star.201000095>
- Colonna, P., & Buléon, A. (1992). New insights on starch structure and properties. In *Cereal chemistry and technology: A long past and a bright future, Proceedings of the ninth international cereal and bread congress* (pp. 25–42).
- Crockett, R., le, P., & Vodovotz, Y. (2011). Effects of soy protein isolate and egg white solids on the

- physicochemical properties of gluten-free bread. *Food Chemistry*, 129(1), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.030>
- Crosbie, G. B., & Ross, A. S. (2007). *The RVA Handbook*. St. Paul: American Association of Food Chemists. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1745-4603.2007.00124.x>
- da Silva, J. A. L., & Rao, M. A. (2007). Rheological behavior of food gels. In M. A. Rao (Ed.), *Rheology of Fluid and Semisolid Foods* (2nd ed., pp. 339–401). Boston (Massachusetts), United States of America: Springer.
- Damin, M. R., Alcântara, M. R., Nunes, A. P., & Oliveira, M. N. (2009). Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1744–1750. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.019>
- Damodaran, S. (2007). Aminoacids, peptides, and proteins. In S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (pp. 217–230). Boca Raton (USA): CRC Press.
- Dang, H. V., Loisel, C., Desrumaux, A., & Doublier, J. L. (2009). Rheology and microstructure of cross-linked waxy maize starch/whey protein suspensions. *Food Hydrocolloids*, 23, 1678–1686.
- de Almeida Costa, G. E., da Silva Queiroz-Monici, K., Pissini Machado Reis, S. M., & de Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.020>
- Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2006). Three classes of starch granule swelling : Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*, 64, 452–465.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 469–492. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101303>
- Derbyshire, E., Wright, D. J., & Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15(1), 3–24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89046-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89046-9)
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to food colloids*. Oxford University Press.
- Donovan, W. J., Mapes, C. J., Davis, J. G., & Garibaldi, J. A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(1), 73–83. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740260109>
- Doublier, J. L., Marzin, C., Videloup, S., & Lefebvre, J. (1994). Effect of sodium caseinate on the pasting behaviour of starches from different origins. *Carbohydrate Polymers*, 25, 228–229.
- Du, S., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001>
- Eggum, B. O., & Beames, R. M. (1983). The nutritive value of seed proteins. In W. Gottschalk & H. P. Muller (Eds.), *Seed Proteins* (pp. 499–531). The Hague (The Netherlands): Nijhoff/Junk.
- European Comission. (2019). Nutrition Claims. Retrieved 13 June 2019, from https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/nutrition_claims_en

- European Food Safety Authority. (2017). Dietary Reference Values for nutrients Summary report. *EFSA Supporting Publications*, 14(12). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121>
- FAO/WHO/UNU. (1985). *Energy and protein requirements*. Genova.
- Ferreira, M., Hofer, C., & Raemy, A. (1997). A calorimetric study of egg white proteins. *Journal of Thermal Analysis*, 48(3), 683–690. <https://doi.org/10.1007/BF01979514>
- Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., & Morris, E. R. (2008). Co-gels of whey protein isolate with crosslinked waxy maize starch: Analysis of solvent partition and phase structure by polymer blending laws. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 468–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.011>
- Fontes, S. de M., Cavalcanti, M. T., Candeia, R. A., & Almeida, E. L. (2017). Characterization and study of functional properties of banana starch green variety of Mysore (Musa AAB - Mysore). *Food Science and Technology*, 37(2), 224–231. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.18916>
- Freepick. (2019). Freepick. Retrieved from <https://www.freepik.com>
- Gaines, C. S. (1990). Influence of chemical and physical modification of soft wheat protein on sugar-Snap cookie dough consistency, cookie size, and hardness. *Cereal Chemistry*, 67(1), 73–77.
- Gallagher, E., Gormley, T. ., & Arendt, E. . (2003). Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering*, 56(2–3), 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00244-3)
- Gallagher, E., Gormley, T. R., & Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3–4), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.012>
- Gan, Z., Ellis, P. R., & Schofield, J. D. (1995). Gas Cell Stabilisation and Gas Retention in Wheat Bread Dough. *Journal of Cereal Science*, 21(3), 215–230. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1995.0025>
- Gani, A., Broadway, A. A., Ahmad, M., Ashwar, B. A., Wani, A. A., Wani, S. M., ... Khatkar, B. S. (2015). Effect of whey and casein protein hydrolysates on rheological, textural and sensory properties of cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5718–5726. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1649-3>
- Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M., & Aider, M. (2016). Incorporation of canola proteins extracted by electroactivated solutions in gluten-free biscuit formulation of rice-buckwheat flour blend: Assessment of quality characteristics and textural properties of the product. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(3), 814–827. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13034>
- Goel, P. K., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1999). Studies on interactions of corn starch with casein and casein hydrolysates. *Food Chemistry*, 64, 383–389.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.011>

- Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(155).
- Han, A., Romero, H. M., Nishijima, N., Ichimura, T., Handa, A., Xu, C., & Zhang, Y. (2019). Effect of egg white solids on the rheological properties and bread making performance of gluten-free batter. *Food Hydrocolloids*, 87(June 2018), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.022>
- Hermansson, A. M. (1986). Water- and fat holding. In A. M. Mitchell & D. A. Ledward (Eds.), *Functional Properties of Food Macromolecules* (pp. 273–314). London (United Kingdom): Elsevier Applied Science.
- Hermansson, A. M., Harbitz, O., & Langton, M. (1986). Formation of two types of gels from bovine myosin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(69).
- Hermansson, A. M., & Lucisano, M. (1982). Gel characteristics-water binding properties of blood plasma gels and methodological aspects on the water binding of gel systems. *Journal of Food Science*, 47(1955).
- Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M., & Suzuki, A. (1981). Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research*, 94(2), 205–213. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80718-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80718-1)
- Hoover, R. (1995). Starch retrogradation. *Food Reviews International*, 11, 331–346.
- Horstmann, S. W., Foschia, M., & Arendt, E. K. (2017). Correlation analysis of protein quality characteristics with gluten-free bread properties. *Food and Function*, 8(7), 2465–2474. <https://doi.org/10.1039/c7fo00415j>
- Ishiguro, K., Noda, T., Kitahara, K., & Yamakawa, O. (2000). Retrogradation of Sweetpotato Starch. *Starch/Staerke*, 52(1), 13–17. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-379X\(200001\)52:1<13::AID-STAR13>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-379X(200001)52:1<13::AID-STAR13>3.0.CO;2-E)
- Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2018). Functional effects of xanthan gum on quality attributes and microstructure of extruded sorghum-wheat composite dough and bread. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 551–558. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.031>
- Joshi, M., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., & Adhikari, B. (2014). Rheological and microstructural characteristics of lentil starch-lentil protein composite pastes and gels. *Food Hydrocolloids*, 35, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.016>
- Jyotsna, R., Sai Manohar, R., Indrani, D., & Venkateswara Rao, G. (2007). Effect of Whey Protein Concentrate on the Rheological and Baking Properties of Eggless Cake. *International Journal of Food Properties*, 10(3), 599–606. <https://doi.org/10.1080/10942910601048986>
- Kara, M., Sivri, D., & Köksel, H. (2005). Effects of high protease-activity flours and commercial proteases on cookie quality. *Food Research International*, 38(5), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.012>
- Karpaviciute, A. (2018). The power of protein. Retrieved 29 May 2019, from <https://www.nielsen.com/au/en/insights/news/2018/the-power-of-protein.html>
- Kato, A., Tsutsui, N., Matsudomi, N., Kobayashi, K., & Nakai, S. (1981). Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(12), 2755–2760. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864964>

- Katsua, K., Rector, D., & Kinsella, J. E. (1990). Viscoelastic properties of whey protein matrix in comminuted meat products. *Journal of Food Science*, *55*(516).
- Kett, A. P., Chaurin, V., Fitzsimons, S. M., Morris, E. R., O'Mahony, J. A., & Fenelon, M. A. (2013). Influence of milk proteins on the pasting behaviour and microstructural characteristics of waxy maize starch. *Food Hydrocolloids*, *30*(2), 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.002>
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *7*(3), 219–280.
- Kiosseoglou, V., & Paraskevopoulou, A. (2006). Eggs. In *Bakery Products: Science and Technology* (pp. 161–172). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470277553.ch8>
- Kittisuban, P., Ritthiruangdej, P., & Suphantharika, M. (2014). Optimization of hydroxypropylmethylcellulose, yeast β -glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.045>
- Koo, C. K. W., Chung, C., Ogren, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2018). Extending protein functionality: Microfluidization of heat denatured whey protein fibrils. *Journal of Food Engineering*, *223*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.020>
- Krupa-Kozak, U., Baczek, 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. <https://doi.org/10.3390/nu5114503>
- Kuntz, I. D. (1971). Hydration of Macromolecules. III. Hydration of Polypeptides. *Journal of the American Chemical Society*, *93*(2), 514–516. <https://doi.org/10.1021/ja00731a036>
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N., & Biliaderis, C. G. (2007). Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *Journal of Food Engineering*, *79*(3), 1033–1047. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.03.032>
- Le-Bail, P., Hesso, N., & Le-Bail, A. (2018). Starch in Baked Products. In *Starch in Food* (pp. 595–632). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00015-9>
- Lelievre, J., & Husbands, J. (1989). Effects of sodium caseinate on the rheological properties of starch pastes. *Starch-Stärke*, *41*, 236–238.
- Li, J. Y., Yeh, A. I., & Fan, K. L. (2007). Gelation characteristics and morphology of corn starch/soy protein concentrate composites during heating. *Journal of Food Engineering*, *78*(4), 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.043>
- Lin, C. S., & Zayas, J. F. (1987). Protein solubility, emulsifying stability and capacity of two deffated corn germ proteins. *Journal of Food Science*, *52*(1615).
- López Fandiño, R. (2014). Las proteínas, ¿qué son y cómo son? In *Las proteínas de los alimentos* (pp. 7–14). CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Majzoobi, M., Ghiasi, F., Habibi, M., Hedayati, S., & Farahnaky, A. (2014). Influence of soy protein isolate on the quality of batter and sponge cake. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 1164–1170. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12076>

- Mancebo, C. M., Martínez, M. M., Merino, C., de la Hera, E., & Gómez, M. (2017). Effect of oil and shortening in rice bread quality: Relationship between dough rheology and quality characteristics. *Journal of Texture Studies*, 48(6), 597–606. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12270>
- Mancebo, C. M., Rodriguez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.045>
- Marco, C., & Rosell, C. M. (2008). Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1205–1213. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0838-6>
- Martínez, M. M., & Gómez, M. (2017). Rheological and microstructural evolution of the most common gluten-free flours and starches during bread fermentation and baking. *Journal of Food Engineering*, 197, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.008>
- Martínez, M. M., Román, L., & Gómez, M. (2018). Implications of hydration depletion in the in vitro starch digestibility of white bread crumb and crust. *Food Chemistry*, 239, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.122>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.05.007>
- McWilliams, M. (1989). *Foods: experimental perspectives*. New York (United States of America): MacMillian Publishing Company.
- Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., & Stephen, G. R. (1985). The roles of amylose and amylopectin and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135, 271–281.
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 225–232.
- Miranda, J., Lasa, A., Bustamante, M. A., Churrua, I., & Simon, E. (2014). Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(2), 182–187. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0410-4>
- Monnet, A. F., Laleg, K., Michon, C., & Micard, V. (2019). Legume enriched cereal products: A generic approach derived from material science to predict their structuring by the process and their final properties. *Trends in Food Science and Technology*, 86(February), 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.027>
- Noisuwan, A., Bronlund, J., Wilkinson, B., & Hemar, Y. (2008). Effect of milk protein products on the rheological and thermal (DSC) properties of normal rice starch and waxy rice starch. *Food Hydrocolloids*, 22, 174–183.
- Nowson, C., & O'Connell, S. (2015). Protein requirements and recommendations for older people: A review. *Nutrients*, 7(8), 6874–6899. <https://doi.org/10.3390/nu7085311>
- Nozawa, M., Ito, S., & Arai, E. (2016). Effect of ovalbumin on the quality of gluten-free rice flour bread made with soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.010>
- Nunes, M. H. B., Ryan, L. A. M., & Arendt, E. K. (2009). Effect of low lactose dairy powder addition

- on the properties of gluten-free batters and bread quality. *European Food Research and Technology*, 229(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1023-2>
- O’Kennedy, B. T. (2011). Caseins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins* (pp. 13–28). Cambridge (United Kingdom): Woodhead Publishing Limited.
- Oñate Narciso, J., & Brennan, C. (2018). Whey and Pea Protein Fortification of Rice Starches: Effects on Protein and Starch Digestibility and Starch Pasting Properties. *Starch - Stärke*, 70(9–10), 1700315. <https://doi.org/10.1002/star.201700315>
- Onwulata, C. I., Tunick, M. H., & Thomas-Gahring, A. E. (2014). Pasting and extrusion properties of mixed carbohydrate and whey protein isolate matrices. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4), 1577–1591. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12118>
- Pareyt, B., & Delcour, J. A. (2008). The role of wheat flour constituents, sugar, and fat in low moisture cereal based products: A review on sugar-snap cookies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 824–839. <https://doi.org/10.1080/10408390701719223>
- Pareyt, B., Wilderjans, E., Goesaert, H., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2008). The role of gluten in a sugar-snap cookie system: A model approach based on gluten–starch blends. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 863–869. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.06.011>
- Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2011). *Handbook of food proteins*. (G. O. Phillips & P. A. Williams, Eds.). Cambridge (UK): Woodhead Publishing Limited.
- Phongthai, S., D’Amico, S., Schoenlechner, R., & Rawdkuen, S. (2016). Comparative study of rice bran protein concentrate and egg albumin on gluten-free bread properties. *Journal of Cereal Science*, 72, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.09.015>
- Pico, J., Reguilón, M. P., Bernal, J., & Gómez, M. (2019). Effect of rice, pea, egg white and whey proteins on crust quality of rice flour-corn starch based gluten-free breads. *Journal of Cereal Science*, 86(February), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.014>
- Purdon, A. D., Tinker, D. O., & Neumann, A. W. (1980). The temperature dependence of surface tension and critical micelle concentration of egg lysolecithin. *Colloid and Polymer Science Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift Für Polymere*, 258(9), 1062–1069. <https://doi.org/10.1007/BF01382403>
- Ravindra, P., Genovese, D. ., Foegeding, E. ., & Rao, M. . (2004). Rheology of heated mixed whey protein isolate/cross-linked waxy maize starch dispersions. *Food Hydrocolloids*, 18(5), 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.12.004>
- Ribotta, P. D., Colombo, A., & Rosell, C. M. (2012). Enzymatic modifications of pea protein and its application in protein-cassava and corn starch gels. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.006>
- 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. <https://doi.org/10.1002/star.200900259>
- Roccia, P., Ribotta, P. D., Pérez, G. T., & León, A. E. (2009). Influence of soy protein on rheological properties and water retention capacity of wheat gluten. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 358–362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.03.002>
- Roman, L., Gomez, M., Li, C., Hamaker, B. R., & Martinez, M. M. (2017). Biophysical features of

- cereal endosperm that decrease starch digestibility. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.055>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.001>
- Sarabhai, S., Indrani, D., Vijaykrishnaraj, M., Milind, Arun Kumar, V., & 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1432-5>
- Sarabhai, S., & Prabhasankar, P. (2015). Influence of whey protein concentrate and potato starch on rheological properties and baking performance of Indian water chestnut flour based gluten free cookie dough. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(2), 1301–1308. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.111>
- Schmidt, R. H. (1981). Gelation and coagulation. In J. P. Cherry (Ed.), *Protein Functionality in Foods* (p. 131). Washington DC (United States of America): ACS Symposium Series.
- Schmidt, R. H., & Morris, H. A. (1984). Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems. *Food Technology*, *38*(85).
- Schwenke, K. D. (1998). Proteins: some principles of classification and structure. In D. Möbius & R. Miller (Eds.), *Proteins at Liquid Interfaces*. Elsevier.
- Sert, D., Demir, M. K., & Ertaş, N. (2016). Rheological, physical and sensorial evaluation of cookies supplemented with dairy powders. *Food Science and Technology International*, *22*(3), 196–202. <https://doi.org/10.1177/1082013215583149>
- Shevkani, K., Kaur, A., Kumar, S., & Singh, N. (2015). Cowpea protein isolates: Functional properties and application in gluten-free rice muffins. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(2), 927–933. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.058>
- Shevkani, K., & Singh, N. (2014). Influence of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates on the characteristics of starch-based gluten-free muffins. *International Journal of Food Science & Technology*, *49*(10), 2237–2244. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12537>
- Shim, J., & Mulvaney, S. J. (2001). Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(8), 706–717. <https://doi.org/10.1002/jsfa.869>
- Shin, M., Gang, D. O., & Song, J. Y. (2010). Effects of protein and transglutaminase on the preparation of Gluten-free rice bread. *Food Science and Biotechnology*, *19*(4), 951–956. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0133-8>
- Sluimer, P. (2005). Principles of breadmaking: Functionality of raw materials and process steps. In A. A. of C. Chemist (Ed.) (pp. 53–58). St. Paul, Minnesota.
- Smak, C. (1972). New approach to determine the brownness of bread crust, correlation between crust color and protein content. *Cereal Chemistry*.
- Smerdel, B., Pollak, L., Novotni, D., Čukelj, N., Benković, M., Lušić, D., & Ćurić, D. (2012). Improvement of gluten-free bread quality using transglutaminase, various extruded flours

- and protein isolates. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51(4), 242–253.
- Stone, M. B., & Campbell, A. M. (1980). Emulsification in systems containing soy protein isolates, salt and starch. *Journal of Food Science*, 45(6), 1713–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb07595.x>
- Storck, C. R., da Rosa Zavareze, E., Gularte, M. A., Elias, M. C., Rosell, C. M., & Guerra Dias, A. R. (2013). Protein enrichment and its effects on gluten-free bread characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.005>
- Strixner, T., & Kulozik, U. (2011). Egg proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins* (pp. 150–209). Cambridge (United Kingdom): Woodhead Publishing Limited.
- Subagio, A., & Morita, N. (2008). Effects of Protein Isolate from Hyacinth Beans (*Lablab purpureus* (L.) Sweet) Seeds on Cake Characteristics. *Food Science and Technology Research*, 14(1), 12–17. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.12>
- Sun, Q., & Xiong, C. S. L. (2014). Functional and pasting properties of pea starch and peanut protein isolate blends. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.064>
- Tang, M. C., & Copeland, L. (2007). Investigation of starch retrogradation using atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers*, 70(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.025>
- Tang, X., & Liu, J. (2017). A Comparative Study of Partial Replacement of Wheat Flour with Whey and Soy Protein on Rheological Properties of Dough and Cookie Quality. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/2618020>
- Tarté, R. (2011). Meat protein ingredients. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of food proteins* (pp. 56–91). Cambridge (United Kingdom): Woodhead Publishing Limited.
- Taylor, W. R., May, A. C. W., Brown, N. P., & Aszódi, A. (2001). Protein structure: geometry, topology and classification. *Reports on Progress in Physics Related Content*, 64, 517–590.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1990). Swelling and Gelatinization of Cereal Starches . I. Effects of Amylopectin , Amylose , and Lipids. *Cereal Chemistry*, 67(6), 551–557.
- Tester, R. F., & Morrison, W. R. (1994). Properties of damaged starch granules. V. Composition and swelling of fractions of wheat starch in water at various temperatures. *Journal of Cereal Science*. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1994.1057>
- Thomas, T., Erdman, K. A., & Burke, L. M. (2016). Nutrition and athletic performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 48(3), 543–568. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000852>
- Toews, R., & Wang, N. (2013). Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. *Food Research International*, 52(2), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.009>
- Tran, T. T. B., 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. <https://doi.org/10.1021/jf105021r>
- United States of America National Human Genome Research Institute. (2019). Proteins. Retrieved

- 10 June 2019, from <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Protein>
- Vallons, K. J. R., Ryan, L. A. M., & Arendt, E. K. (2011). Promoting structure formation by high pressure in gluten-free flours. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(7), 1672–1680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.024>
- Vamadevan, V., & Bertoft, E. (2015). Structure-function relationships of starch components. *Starch - Stärke*, *67*, 55–68. <https://doi.org/10.1002/star.201400188>
- Villanueva, M., Ronda, F., Moschakis, T., Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2018). Impact of acidification and protein fortification on thermal properties of rice, potato and tapioca starches and rheological behaviour of their gels. *Food Hydrocolloids*, *79*, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.022>
- Vose, J. R. (1980). Production and functionality of starches and protein isolates from legume seeds (Field peas and horsebeans). *Cereal Chemistry*, *57*, 406–410.
- Wade, P. (1988). Preparation of biscuit doughs. In *Biscuits, Cookies and crackers. The principles of the craft (Vol.1)* (p. 18). London (United Kingdom): Elsevier Applied Science.
- Wani, A. A., Sogi, D. S., Singh, P., & Khatkar, B. S. (2015). Influence of watermelon seed protein concentrates on dough handling, textural and sensory properties of cookies. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(4), 2139–2147. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1224-3>
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, *24*(2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Wilderjans, E., Luyts, A., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2013). Ingredient functionality in batter type cake making. *Trends in Food Science and Technology*, *30*(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.01.001>
- Wilderjans, E., Pareyt, B., Goesaert, H., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2008). The role of gluten in a pound cake system: A model approach based on gluten–starch blends. *Food Chemistry*, *110*(4), 909–915. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.079>
- Witczak, T., Juszczak, L., Ziobro, R., & Korus, J. (2017). Rheology of gluten-free dough and physical characteristics of bread with potato protein. *Journal of Food Process Engineering*, *40*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12491>
- World Health Organization. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition*.
- Yadav, R. B., Yadav, B. S., & Chaudhary, D. (2011). Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making. *British Food Journal*, *113*(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1108/00070701111174596>
- Yang, H., Irudayaraj, J., Otgonchimeg, S., & Walsh, M. (2004). Rheological study of starch and dairy ingredient-based food systems. *Food Chemistry*, *86*, 571–578.
- Yi, L., Jie, M., Dong, L., Li-jun, W., Benu, A., & Chen, X. D. (2017). Effect of Addition of Antioxidant Flaxseed Polypeptide on the Rheological Properties of Native Maize Starch. *International Journal of Food Engineering*, *13*. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0397>
- Zayas, J. F. (1997a). Gelling Properties of Proteins. In J. F. Zayas (Ed.), *Functionality of proteins in foods* (pp. 310–366). Berlin (Germany): Springer.
- Zayas, J. F. (1997b). Water holding capacity of proteins. In J. F. Zayas (Ed.), *Functionality of proteins in foods* (pp. 76–133). Berlin (Germany): Springer.

- 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2043-5>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.006>

OBJETIVOS Y ESTRUCTURA

1. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

1.1. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis doctoral es evaluar el efecto de la sustitución de un alto porcentaje (hasta un 45%) de hidratos de carbono por diferentes proteínas en las propiedades físicas de productos horneados a base de cereales. Esto permitirá ampliar el conocimiento disponible sobre las interacciones que ocurren entre diferentes proteínas y el almidón, para así poder aumentar con éxito el contenido proteico en productos horneados a base de cereales, sin que sus propiedades físicas se vean afectadas negativamente. Para la consecución de este objetivo general se establecen dos objetivos específicos.

1.2. Objetivos específicos

El primer objetivo es el estudio de las interacciones de proteínas animales (colágeno, proteínas de la leche y albúmina de huevo) y vegetales (guisante, arroz, patata y proteína vegetal hidrolizada) con el almidón, para comprender su efecto sobre las propiedades funcionales del almidón. De esta forma, se pretende tener una idea de que diferencias existen entre el comportamiento del almidón cuando coexiste con un alto porcentaje de proteínas frente a su comportamiento en solitario. Este comportamiento se evaluó tanto sin modificar las condiciones del medio como variando el pH del mismo.

El segundo objetivo es evaluar el efecto de la incorporación de altos niveles proteicos (hasta un 45%) en panes sin gluten, bizcochos sin gluten y galletas sobre las propiedades físicas de las masas/batidos y productos finales. Las proteínas utilizadas se seleccionaron en base a los resultados obtenidos del primer objetivo. Además, se aplicaron mezclas (en panes sin gluten y bizcochos sin gluten) con el objetivo de evaluar posibles interacciones entre las distintas proteínas en cada una de las elaboraciones.

2. ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral se estructura en dos secciones diferenciadas en base a los objetivos específicos previamente descritos (Figura 1). Cada sección a su vez se divide en apartados correspondientes a los trabajos científicos obtenidos durante el desarrollo de la tesis doctoral.

Sección 1. Interacciones proteína-almidón

- Bravo-Núñez, Á., & Gómez, M. (2019). Physicochemical properties of native and extruded maize flours in the presence of animal proteins. *Journal of Food Engineering*, 243, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.005>
- Bravo-Núñez, Á., & Gómez, M. (2019). Assessing the influence of vegetal protein source on the physicochemical properties of maize flours. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00256-8>
- Bravo-Núñez, Á., Garzón, R., Rosell, C. M., & Gómez, M. (2019). Evaluation of Starch–Protein Interactions as A Function of pH. *Foods*, 8(5), 155. <https://doi.org/10.3390/foods8050155>

Sección 2. Aplicación de las interacciones proteína-almidón en sistemas modelo

- Bravo-Núñez, Á., Sahagún, M., & Gómez, M. (2019). Assessing the importance of protein interactions and hydration level on protein-enriched gluten-free breads: a novel approach. *Food and Bioprocess Technology*, <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02258-2>
- Bravo-Núñez, Á., Sahagún, M., Bravo-Núñez, A., & Gómez, M. (2019). Mixture design for the optimization of protein-enriched gluten-free layer cakes. Enviado para su publicación a *The International Journal of Food Science and Technology*.
- Bravo-Núñez, Á., Sahagún, M., Martínez, P., & Gómez, M. (2018). Incorporation of gluten and hydrolysed gluten proteins has different effects on dough rheology and cookie characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 1452–1458. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13724>

Interacciones proteína-almidón y su aplicación en sistemas modelo

Objetivo general: evaluar el efecto de la sustitución de un alto porcentaje (hasta un 45%) de hidratos de carbono por diferentes proteínas en las propiedades físicas de productos horneados a base de cereales

Interacciones proteína-almidón

Interacciones de proteínas
animales con harina de maíz

Interacciones de proteínas
animales y vegetales con
almidón de maíz
modificando el pH

Interacciones de proteínas
vegetales con harina de maíz



Aplicación de las interacciones proteína- almidón en sistemas modelo

Enriquecimiento proteico de
panes sin gluten

Enriquecimiento proteico de
galletas

Enriquecimiento proteico de
bizcochos sin gluten



Figura 1. Esquema de la tesis

SECCIÓN I. INTERACCIONES PROTEÍNA-ALMIDÓN

Physicochemical properties of native and extruded maize flours in the presence of animal proteins

Bravo-Núñez, Á., & Gómez, M. (2019). Physicochemical properties of native and extruded maize flours in the presence of animal proteins. *Journal of Food Engineering*, 243, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.005>

Abstract

Interest in protein-enriched starchy products has increased, as protein intake moderately higher than current recommendations may provide health benefits for ageing populations. Influence of the substitution of native or extruded flours by 25 or 50% of proteins (collagen, milk, whey, or egg white) was studied. Collagen was the only protein that increased water binding capacity ($p < 0.05$) up to 233.72% for mixtures with native flours, and up to 40.85% for mixtures with extruded flours. Regarding gelling properties, regardless of the flour used, mixtures with 50% of collagen increased water absorption index and swelling power ($p < 0.05$) by $\sim 100\%$, while mixtures with 50% of egg protein decreased water absorption index by $\sim 40\%$ ($p < 0.05$). Pasting viscosity decreased in flour-protein mixtures, except the ones with egg protein, which increased. Endotherm peaks shifted to higher temperatures when proteins were present. Regarding viscoelastic behaviour, when using native flour and higher protein content, gels presented stronger gel behaviour.

Keywords: Maize flour; pregelatinisation; proteins; dairy; collagen; egg white.

Assessing the influence of vegetal protein source on the physicochemical properties of maize flour

Bravo-Núñez, Á., & Gómez, M. (2019). Assessing the influence of vegetal protein source on the physicochemical properties of maize flour. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00256-8>

Abstract

There has been an increasing interest in developing protein-enriched cereal products of recent. The quality of these products will depend on interactions between proteins and starch presented in the flours. The present study aimed to study the influence of the substitution of maize flour by 25 or 50% of proteins (potato, rice, pea or hydrolyzed gluten). Hydration, pasting, thermal, rheological and textural properties of the flour and mixtures were analyzed. Hydration properties were enhanced by the presence of rice or pea proteins, being the increase more evident when higher the protein content. All flour-protein samples modified pasting profiles, decreasing overall viscosity but increasing gelatinization temperature. Among the different flour-protein samples, those with pea protein presented higher values for hydration, pasting, and rheological parameters. Mixtures with hydrolyzed gluten protein presented the lowest values for both viscoelastic moduli and hardness. Mixtures with potato protein presented the lowest values for hydration properties, but gave the highest hardness among flour-protein gels.

Keywords: Maize flour; rheology; pasting properties; proteins.

Evaluation of Starch–Protein Interactions as A Function of pH

Bravo-Núñez, Á., Garzón, R., Rosell, C. M., & Gómez, M. (2019). Evaluation of Starch–Protein Interactions as A Function of pH. *Foods*, 8(5), 155.
<https://doi.org/10.3390/foods8050155>

Abstract

Protein–starch gels are becoming more common in food processing when looking for enriched foods. However, processing conditions scarcely are considered when producing those gels. The aim of this research was to study the effect of processing pH (4.5, 6.0, and 7.5) on the hydration and pasting properties, gel microstructure, and texture of corn starchy gels made with four different proteins (pea, rice, egg albumin, and whey) at a ratio of 1:1 starch/protein and a solid content of 12.28%. The water binding capacity of the starch–protein mixtures was positively influenced by low solubility of the protein used. Acidic pH decreased the apparent peak viscosity of both starch and starch–protein mixtures, with the exception of starch–albumin blends, which increased it. The gels' microstructure showed that the uniformity of the protein-enriched gels was dependent on protein type and pH, leading to diverse hardness. In general, the starchy gels containing animal proteins (albumin and whey) were more affected by pH than those obtained with vegetal proteins (pea and rice). Therefore, processing pH might be an advisable method to modify the functionality of starch–protein gels.

Keywords: starch; pH; proteins; pasting properties; texture

Assessing the importance of protein interactions and hydration level on protein enriched gluten-free breads. A novel approach

Bravo-Núñez, Á., Sahagún, M., & Gómez, M. (2019). Assessing the Importance of Protein Interactions and Hydration Level on Protein-Enriched Gluten-Free Breads: a Novel Approach. *Food and Bioprocess Technology*, (2018).

<https://doi.org/10.1007/s11947-019-02258-2>

Abstract

The effect of starch substitution by 30% of different mixtures of egg white and pea proteins (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100) was studied. The effect of hydration levels on specific volume was determined in order to later study the physical characteristics of different protein-enriched breads with an adjusted hydration level to achieve a specific volume similar to that of commercial wheat breads ($5.5 \pm 0.5 \text{ cm}^3/\text{g}$). Hydration level needs to achieve this specific volume increased when increasing pea protein ratio. Control batter presented the highest elastic modulus, followed by the batter enriched with pea protein. Elastic modulus decreased progressively when increasing egg protein content. Same trend was observed for the viscous modulus. Differently, hardness was increased by the presence of egg protein, while decreased with the presence of pea protein. Breads with the same amount of both proteins showed no significant differences, compared to the control hardness. Regarding crumb structure, egg protein generated a uniform structure of small air bubbles that opened progressively when the proportion of pea protein was increased, until the same levels of both proteins were added, closing again with a higher pea protein content, but was not as close as when egg protein only was added.

Key words: Protein synergy; gluten-free; bread; hydration; volume.

Mixture design for the optimization of protein-enriched gluten-free layer cakes

Bravo-Núñez, Á., Sahagún, M., Bravo-Núñez, A., & Gómez, M. (2019). Mixture design for the optimization of protein-enriched gluten-free layer cakes.

Submitted to *International Journal of Food Science and Technology*.

Abstract

The effect of different protein mixtures (pea, whey and egg-white proteins) on the physical characteristics of batters and baked gluten-free layer cakes after substituting 45% of flour was evaluated. A mixture design approach was used to determine the interaction effects of the three proteins on the cakes physical characteristics. For batter density two interactions were observed, and higher values were found for batters containing a mixture of 60-80% egg white and 20-40% whey than in batter containing only one of these proteins, or a pea content of 70-90% than in batter containing only pea. For batter viscosity significant interactions between egg-white and pea, and between whey and pea proteins were observed, which explains the gentler decrease in viscosity at higher egg-white and/or whey protein ratios. Regarding hardness, an interaction between egg-white and whey occurred, and increasing whey content helped to reduce hardness to a greater extent than increasing pea content.

Key words: Gluten-free; cakes; proteins; mixture design; optimization.

Incorporation of gluten and hydrolysed gluten proteins have different effects on dough rheology and cookie characteristics

Bravo-Núñez, Á., Sahagún, M., Martínez, P., & Gómez, M. (2018). Incorporation of gluten and hydrolysed gluten proteins has different effects on dough rheology and cookie characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 1452–1458. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13724>

Abstract

This study aims to establish how the substitution of wheat flour by high levels (15, 30 and 45 %) of gluten or hydrolyzed gluten proteins effect on sugar-snap cookies properties. An increase in water binding capacity was observed when proteins were present. An increase in the dough elastic modulus was observed for gluten protein but it decreased when hydrolyzed gluten protein was used. Regarding the physical characteristics of the cookies, for the same protein percentage, the presence of gluten protein decreased spread ratio and increased hardness, while hydrolyzed gluten protein increased spread ratio and yielded darker cookies without modifying the hardness. As for sensory characteristics, taste was negatively influenced by hydrolyzed protein and visual acceptability was enhanced when gluten protein was present. Overall acceptability was decreased for the highest levels of hydrolyzed gluten protein. Nevertheless, the highest levels of gluten protein did not modify the acceptability.

Keywords: gluten; protein hydrolysates; wheat; rheology; baking.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La conclusión general de la presente tesis doctoral es que es posible desarrollar productos con un alto contenido proteico, existiendo una relación entre las interacciones entre proteína-almidón y las propiedades de los productos enriquecidos proteicamente. Se cumple la hipótesis de que, a la hora de incluir una proteína u otra en una matriz, el efecto de la misma sobre las propiedades del almidón está relacionado con su efecto dentro del producto. Por tanto, conocer estas interacciones nos permite hacer un enriquecimiento más eficiente.

Del estudio del efecto de la presencia proteica en las propiedades del almidón se sacan las siguientes conclusiones:

1. Las proteínas de colágeno, leche, arroz y guisante incrementan las propiedades de hidratación de la harina de maíz, mientras que las proteínas de huevo, suero de leche, gluten hidrolizado y patata las disminuyen. Además, la capacidad de fijación de agua aumenta a pHs más altos (básicos) y cuando las proteínas son menos solubles.
2. La evolución de la viscosidad de la harina durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento se ve afectada por la presencia de proteína. Así, las proteínas de colágeno, leche, suero de leche y las cuatro proteínas vegetales estudiadas hicieron disminuir la viscosidad en todos los puntos de la curva, mientras que la presencia de albúmina de huevo la aumenta drásticamente. Además, las temperaturas de gelatinización se ven incrementadas por la presencia proteica, de forma más evidente con la proteína de huevo. El cambio de pH no modifica esta tendencia, si bien cuanto más ácido el pH, menor la viscosidad a lo largo de todo el ciclo.
3. El comportamiento visco-elástico de los geles elaborados con mezclas de proteína-almidón evidencia que de forma general las proteínas debilitan la estructura de los geles de almidón (valores del módulo elástico más bajos).

Del efecto de la presencia proteica en las propiedades de productos horneados a base de cereales, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

4. La combinación de proteínas en el enriquecimiento proteico de panes sin gluten y bizcochos sin gluten ayuda a la compensación de los efectos de las mismas, haciendo posible el desarrollo de productos con características más parecidas a aquellos sin enriquecer.
5. Se pueden obtener panes sin gluten enriquecidos proteicamente haciendo uso de mezclas de guisante y huevo, siendo la mejor combinación la mezcla con cantidades iguales de cada proteína, al ser la más parecida al control. Además de la proporción de cada proteína añadida, también es importante el nivel de hidratación, ya que influye de manera importante en el volumen específico de los panes sin gluten.
6. Para el desarrollo de bizcochos enriquecidos proteicamente, se observó que, aplicando mezclas de proteínas de albúmina de huevo, suero de leche y guisante, los mejores resultados se obtienen al usar mezclas donde las proteínas mayoritarias son suero de leche o guisante. Así, un mayor contenido en suero resulta en bizcochos con texturas más similares a los bizcochos sin enriquecer, mientras que un mayor contenido en guisante da lugar a bizcochos con un volumen similar pero una dureza ligeramente mayor respecto a los bizcochos sin enriquecer.
7. En galletas, se ha observado que el peso molecular de las proteínas influye en el efecto que estas tendrán sobre las características finales de las mismas. Así, un alto peso molecular da lugar a galletas con un diámetro menor y una dureza mayor que una galleta sin enriquecer, mientras que una proteína con un bajo molecular (proteína hidrolizada) tiene el efecto contrario.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

The main conclusion of the present doctoral thesis is that it is possible to develop products with a high protein content, and that there is a relationship between the proteins-starch interactions and the characteristics of the protein-enriched products. Thus, it is proven that when including one or another protein in a food matrix, the effect of each protein on the starch characteristics is related with its effect in the matrix. Therefore, knowing these interactions allows to perform a more efficient enrichment.

From the study of the effect of proteins in the properties of starch it can be concluded that:

1. Collagen, milk, rice, and pea proteins increased hydration properties of maize flour, while egg albumin, whey, hydrolysed gluten and potato proteins decreased them. In addition, water binding capacity increased at higher pHs (more basic) and when proteins were less soluble.
2. Viscosity evolution of the flour during a heating-cooling cycle was affected by the presence of proteins. Collagen, milk, whey, and the four vegetal proteins decreased the viscosity along all the curve, while the presence of egg albumin protein increased it drastically. In addition, gelatinization temperatures were increased by the presence of any of the proteins, more evidently with egg albumin protein. pH modification did not modify this trend, although the overall viscosity was lower at more acid pHs, both for the starch and the mixtures.
3. Viscoelastic behaviour of the gels elaborated with protein-starch mixtures evidenced that, in general, proteins had a weakening effect on the structure of starch gels (lower elastic modulus values).

Regarding the effect of proteins on the properties of bakery products, it can be concluded that:

4. The combination of proteins for the protein enrichment of gluten-free breads and cakes helped to compensate the effects of each individual protein; allowing the successful

development of products with characteristics more similar to the ones of the unenriched products.

5. Protein-enriched gluten-free breads can be obtained using pea and egg albumin proteins mixtures, being the best combination the mixture with the same quantity of these proteins, as the final product was more similar to the control. On top of the ratio of each protein, the hydration level of the batters was also important, as it has an important influence on the specific volume of the gluten-free breads.
6. For the development of protein-enriched gluten-free cakes, it was observed that when using mixtures of egg albumin, whey and pea proteins, best results were achieved when whey or pea proteins were the dominant proteins in the mixtures. A higher whey protein ratio in the mixture resulted in cakes with textures similar to the one of the unenriched cake. A higher pea protein ratio resulted in cakes with a specific volume similar to the control, but with a slightly higher hardness than the control.
7. For cookies, it was observed that the molecular weight of the proteins influenced the effect that they have on the characteristics of the final product. Proteins with a higher molecular weight gave place to cookies with a smaller diameter and a higher hardness than an unenriched cookie, while proteins with lower molecular weight (hydrolysed protein) had the contrary effect.