

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Tecnología de Alimentos

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Proyecto, presentado a la
Escuela de Tecnología de Alimentos para optar por el grado de
Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Evaluación del efecto de la adición de extracto de proteína del salvado
de arroz sobre las propiedades fisicoquímicas, sensoriales, reológicas y
en el almacenamiento de una galleta libre de gluten

Elaborado por:

María Rebecca Luna Zumbado

Carné: B13777

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica
Junio, 2019

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por:

M. Sc. Jacqueline Aiello Ramírez
Directora del Proyecto

M. Sc. Pedro Vargas Aguilar
Asesor del Proyecto

Mag. Laura Arroyo Esquivel
Asesora del Proyecto

M. Sc. Ana Lucía Mayorga Gross
Presidenta del Tribunal

M. Sc. Lea Wexler Gorieng
Profesora Designada

DEDICATORIA

A papi y mami, por enseñarme la magia

AGRADECIMIENTOS

Todo esto nunca lo hubiera logrado sin la ayuda de mi familia, por apoyarme en cada paso que di para llegar hasta aquí. A mami por siempre estar a mi lado y por leer cada reporte o trabajo que tuve que entregar para evitar, se fuera con horrores ortográficos y sin tildes; este título es tanto mío como tuyo. A papi por animarme a ser cada día mejor, y por acompañarme a cada examen de los sábados en las tardes; por darme la tranquilidad que necesitaba en cada uno de esos viajes de ida; y por la comida después. A mis abuelitos, por preocuparse por mi educación desde el principio; y por irme a recoger en las noches; y lo más importante llevarme a comer hamburguesas después.

A la profe Jacqueline, por permitirme hacer este proyecto y creer en mí; no hay forma de agradecerle todo el trabajo y tiempo invertido. Además de darme grandes consejos para mi vida personal y profesional.

Al profe Pedro por unirse a este proyecto, cuando casi ni teníamos el tema definido y por todo el apoyo y consejos que me brindo durante este proceso. A la profe Laura, por siempre estar ahí cuando tenía una duda en el laboratorio; y por siempre estar pendiente de mi progreso. A la profe Yorleny por apoyarme en todo momento, por probar las galletas aun cuando eran incomibles

A la profe Elba, María Lourdes y Erick por brindarme su ayuda, cada vez que los necesite, y fueron muchas veces; sin ustedes la parte sensorial, de textura y estadística de este documento no se hubiera logrado.

A Giovanni y Luis por recibirme todos los días con una sonrisa. Al final de este proyecto el laboratorio se sentía como un segundo hogar; gracias por aclarar cada una de mis dudas y por ayudarme cuando estaba perdida. A Camacho y Alonso por ayudarme al principio de este camino, cuando no tenía ni la mínima idea de lo que estaba haciendo.

A todos mis compañeros de carrera por hacer este camino más fácil y llevadero, principalmente a Maricel, Marcela, Lourdes, David y Carolina. También le tengo que agradecer a Wendy, Ana Ligia, Prisilla y Valeria, por recorrer este camino hacer la tesis conmigo, algunas lo hicieron un poco antes, pero me dejaron todos su consejos, sin los cuales estaría escribiendo esto.

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA	XI
JUSTIFICACIÓN	1
OBJETIVOS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
MARCO TEÓRICO	6
1. ARROZ	6
1.1. Estructura del grano de arroz	6
1.2. Procesamiento del arroz.....	7
2. SALVADO DEL ARROZ	8
2.1. Estabilización del salvado	8
2.2. Proteína del salvado de arroz	9
2.3. Tipos de proteínas presentes en el salvado de arroz	10
2.4. Extracción de la proteína del salvado de arroz.....	11
2.5. Propiedades funcionales de la proteína del salvado de arroz	13
2.6. Usos de la proteína del salvado de arroz.....	18
3. GALLETAS	19
3.1. Procesamiento de las galletas	19
3.2. Efecto de los ingredientes en las galletas	20
3.3. Tendencias en el mercado de las galletas	21
3.4. Deterioro de las galletas en el almacenamiento	26
4. MÉTODOS DE ANÁLISIS	29
4.1. Actividad del agua (aw)	29
4.2. Análisis de Textura de galletas y su masa.....	30
4.3. Dimensiones de las galletas	32
4.4. Medición de color	32
4.5. Análisis sensorial (agrado de los consumidores)	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. LOCALIZACIÓN	35
2. MATERIA PRIMA	35
3. PRUEBAS PRELIMINARES	36
3.1 Selección del método de extracción de la proteína	36
3.2 Elección del pH del extracto de proteína del salvado de arroz	36
3.3 Elección de los porcentajes de sustitución:	38

4.	PROCESO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNA DEL SALVADO DE ARROZ	39
4.1	Estabilización del salvado	39
4.2	Extracción de la proteína del salvado de arroz.....	39
4.3	Análisis del extracto de proteína del salvado de arroz (EP) y su funcionalidad.....	41
5.	PROCESO DE ELABORACIÓN DE LAS GALLETAS LIBRES DE GLUTEN SUSTITUIDAS CON EP	41
5.1	Formulación base de las galletas	41
5.2	Descripción del proceso de elaboración de las galletas control.....	42
5.3	Sustitución de las galletas libres de gluten con EP	43
5.4	Análisis de las galletas libres de gluten sustituidas con el EP	43
6.	ESTUDIO DE ALMACENAMIENTO DE LAS GALLETAS LIBRES DE GLUTEN SUSTITUIDAS CON EP	43
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
7.1	Análisis del extracto de proteína del salvado de arroz	44
7.2	Análisis de las galletas libres de gluten sustituidas con EP.....	44
7.3	Estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten sustituidas con EP	45
8.	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	46
8.1	Análisis del extracto de proteína del salvado de arroz	46
8.2	Análisis de las galletas libres de gluten sustituidas con EP.....	48
8.3	Estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten sustituidas con EP	51
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
1.	CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNA DEL SALVADO DE ARROZ	52
1.1.	Composición química del extracto de proteína.....	52
1.2.	Funcionabilidad del extracto de proteína.....	54
2.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE EP EN GALLETAS LIBRES DE GLUTEN.....	61
2.1.	Dimensiones de las galletas	61
2.2.	Color de las galletas	63
2.3.	Porcentaje de Humedad y Actividad del agua de las galletas	64
2.4.	Textura de las galletas	65
2.5.	Textura de la masa cruda para las galletas	66
2.6.	Agrado de las galletas por los consumidores	69
2.7.	Contenido teórico de proteína de las galletas.....	72
3.	ESTUDIO DE EFECTO DEL ALMACENAMIENTO DE GALLETAS LIBRES DE GLUTEN SUSTITUIDAS CON EXTRACTO DE PROTEÍNA	73
3.1.	Elección de la galleta para el estudio de almacenamiento.....	73
3.2.	Porcentaje de Humedad	74
3.3.	Actividad del agua	75
3.4.	Textura.....	76
3.5.	Análisis microbiológicos.....	78
	CONCLUSIONES.....	79
	RECOMENDACIONES.....	80
	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXOS	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Información de las materias primas utilizadas para la elaboración de galletas libres de gluten. _____	35
Cuadro II. Formulación base de las galletas libres de gluten _____	41
Cuadro III. Diseño experimental para evaluar el efecto del grado de sustitución del EP en las galletas libres de gluten. _____	45
Cuadro IV. Condiciones empleadas durante la prueba de textura de galletas _____	49
Cuadro V. Condiciones empleadas durante la prueba de textura de la masa de las galletas _____	50
Cuadro VI. Composición química del extracto de proteína del salvado de arroz. _____	52
Cuadro VII. Absorción de agua y aceite del extracto de proteína del salvado de arroz. _____	54
Cuadro VIII. Dimensiones de las galletas libres de gluten sustituidas con EP _____	61
Cuadro IX. Parámetros de color de las galletas libres de gluten sustituidas con EP _____	63
Cuadro X. Porcentaje de humedad y actividad del agua de las galletas libres de gluten sustituidas con EP _____	64
Cuadro XI. Dureza de las galletas libres de gluten sustituidas con EP _____	65
Cuadro XII. Parámetros de textura de la masa de las galletas libres de gluten sustituidas con EP _____	66
Cuadro XIII. Resultados del análisis de varianza del agrado de consumidores de las galletas libres de gluten sustituidas con EP. _____	70
Cuadro XIV. Contenido de proteína teórico de las galletas libres de gluten sustituidas con EP _____	73
Cuadro XV. Resultados del análisis de varianza de las características fisicoquímicas y reológicas para el estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten. _____	74
Cuadro XVI. Resultados de análisis microbiológicos de las galletas control y sustituidas al 15% con EP, el primer día del almacenamiento. _____	78
Cuadro XVII. Promedio de los lotes de la capacidad de absorción de agua y aceite del EP. _____	95
Cuadro XVIII. Promedios de los lotes de la solubilidad de la proteína del EP. _____	95
Cuadro XIX. Promedios de lotes de la estabilidad y capacidad de formación de espuma y emulsificación, de la proteína del EP, a diferentes pH. _____	96
Cuadro XX. Promedios de los lotes de galletas, con respecto a las mediciones de aw, porcentaje de humedad, dimensiones, textura y color. _____	96
Cuadro XXI. Resultados del análisis de varianza de las características fisicoquímicas y reológicas de los distintos tratamientos de galletas (Control, 15%, 25% y 30%) de EP _____	97
Cuadro XXII. Promedios de los lotes de masa de galleta, con respecto a los parámetros medidos con el TPA. _____	98
Cuadro XXIII. Resultados del análisis de varianza de las características reológicas de los distintos tratamientos de la masa de galletas (Control, 15%, 25% y 30%) de EP _____	98
Cuadro XXIV. Promedio de los resultados de porcentaje de humedad de las galletas (control y 15% EP) durante el almacenamiento. _____	99

Cuadro XXV. Promedio de los resultados de actividad del agua de las galletas (control y 15% EP) durante el almacenamiento. _____	99
Cuadro XXVI. Promedio de los resultados de los análisis microbiológicos realizados a las distintas galletas (control y 15% EP) al inicio del almacenamiento. _____	99
Cuadro XXVII. Promedio de los resultados de textura de las galletas (control y 15% EP) durante el almacenamiento. _____	100
Cuadro XXVIII. Resultados del análisis de varianza de las características fisicoquímicas y reológicas de los distintos tratamientos de galletas (Control, 15%, 25% y 30% de EP), durante el almacenamiento. _	100
Cuadro XXIX. Resultados del análisis de varianza de las propiedades funcionales del EP _____	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de como la actividad del agua, afecta varios procesos degradativos de los alimentos (Prakash et al., 2016)	28
Figura 2. Gráfico típico de una prueba de ruptura para un alimento sólido	30
Figura 3. Gráfico típico de un TPA	31
Figura 4. Espacio de color CIE Lab.	33
Figura 5. Método alcalino de extracción de la proteína del salvado de arroz	37
Figura 6. Proceso de estabilización del salvado de arroz para la posterior extracción de la proteína	39
Figura 7. Proceso de obtención del extracto de proteína del salvado de arroz	40
Figura 8. Proceso de elaboración de las galletas libres de gluten	42
Figura 9. Comportamiento de la Solubilidad de la proteína del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$.	56
Figura 10. Comportamiento de la capacidad de formación de espuma del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$.	56
Figura 11. Comportamiento de la estabilidad de la espuma del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$; con $1-\beta=0,16$.	58
Figura 12. Comportamiento de la capacidad de la emulsión del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$, con $1-\beta=0,28$.	59
Figura 13. Comportamiento de la estabilidad de la emulsión del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$, con $1-\beta= 0,08$.	60
Figura 14. Vista de la parte baja de las galletas libres de gluten sustituidas con EP (en orden de izquierda a derecha, control, 15%, 25% y 30% de EP).	62
Figura 15. Galletas libres de gluten sustituidas con extracto de proteína del salvado de arroz	63
Figura 16. Análisis de conglomerados para la prueba de agrado de galletas sustituidas con EP, brindando y no información de las propiedades de las proteínas	69
Figura 17. Comportamiento del agrado de los consumidores en los diferentes grupos de conglomerados, dependiente de si no se le ofrece información (línea verde) o si se le informa sobre la proteína en la galleta (línea azul), además del promedio de ambos (Triangulo amarillo), con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Bonferroni con un $\alpha= 0,05$.	71
Figura 18. Comportamiento del porcentaje de humedad de las galletas control y sustituidas con proteína (15%), durante el tiempo de almacenamiento.	75
Figura 19. Comportamiento de la actividad del agua de las galletas control y sustituidas con proteína (15%), durante el tiempo de almacenamiento.	76
Figura 20. Comportamiento de la dureza de las galletas control y sustituidas con proteína (15%), durante el tiempo de almacenamiento.	77
Figura 21. Resultados obtenidos del análisis proximal de los extractos de proteína del salvado de arroz de diferentes pH (4 y 7) de las pruebas preliminares de este proyecto, realizado por el laboratorio de química del CITA. Proteína Salvado de arroz 1 (pH 4) y proteína salvado de arroz 2 (pH 7)	95

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la adición de extracto de proteína de salvado de arroz (EP), sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas, sensoriales y el almacenamiento de galletas libres de gluten, con tres grados de sustitución. En primera instancia se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica y de funcionabilidad del EP; con lo cual se determinó que sus principales componentes son la proteína y grasa. La solubilidad de la proteína presente cambió según el pH, con una curva característica para este tipo de proteína. El EP presentó buena capacidad de formación y estabilidad de espuma, siendo afectada por el pH de la disolución; lo mismo ocurrió con la formación y estabilización de la emulsión, en la cual al alejarse del punto Isoeléctrico y volverse más alcalinos se propiciaba esta propiedad. La absorción de aceite y agua presentaron valores bajos.

Posteriormente se elaboraron galletas libres de gluten, con sustituciones de 15%, 25% y 30% de EP, para evaluar el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas y sensoriales de las mismas; con las galletas presentaron una tendencia a disminuir su diámetro levemente y aumentar su tonalidad café, conforme aumenta el grado de sustitución. Por su parte no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en la luminosidad, saturación del color, porcentaje de humedad, actividad del agua, altura y dureza de las galletas. Por su parte la masa cruda de las galletas sustituidas presentó menor dureza, adhesividad, gomosidad y masticabilidad, que la de la control. Las galletas sustituidas con 15% de EP fueron la de mayor aceptación por parte de los consumidores; el conocimiento del contenido de proteína de las galletas no provocó diferencias en el agrado. Las galletas con 15% se pueden etiquetar como fuente de proteína y las sustituciones mayores se pueden declarar como altas en proteína, según el Reglamento Técnico Centroamérica de etiquetado nutricional

A las galletas de 15% de EP y la galleta control se les realizó un almacenamiento de 45 días a 20°C, donde se observó un aumento en el aw, porcentaje de humedad y dureza. No se presentaron diferencias significativas en el comportamiento del porcentaje de humedad entre los tratamientos, a diferencia de la dureza (mayor para el control) y aw (mayor para la proteína) aun así, no afectó la estabilidad del almacenamiento. Es por esto que se puede considerar que el extracto de proteínas del salvado del arroz tiene potencial para ser utilizado en la elaboración de galletas libres de gluten.

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

%	Porcentaje
Kg	Kilogramos
pI	Punto isoelectrico
G	Gramos
Ml	Mililitros
Mg	Miligramos
<	Menor que
>	Mayor que
Mm	Milímetros
≥	Mayor o igual que
máx.	Máximo
min.	Mínimo
H	Horas
Psi	Libra por pulgada cuadrada
°C	Grados centígrados
G	Gravedades
M ó mol/L	Mol por litro
L	Litros
Min	Minutos
Cm	Centímetros
ANDEVA	Análisis de Varianza
A	Alfa
=	Igual
Rpm	Revoluciones por minuto
T	Temperatura
±	Mas o menos
°	Grados
S	Segundos
UFC	Unidades formadoras de colonias

JUSTIFICACIÓN

El arroz (*Oryza sativa L.*) es uno de los cereales más consumidos en el mundo, esto lleva a que se cultive en muchos países principalmente en los asiáticos. Para el 2014 se llegó a producir 742 millones de toneladas métricas a nivel mundial (FAO, 2017). Para obtener el arroz que se consume a diario, se requiere llevar a cabo una limpieza, descascarillado, blanqueado y pulido del grano. De este procesamiento se logra obtener un 70% de rendimiento, esto se debe a que se obtienen gran cantidad de subproductos, tales como: cascarilla o granza (20%), germen (2%) y el salvado (8%) (Gul *et al.*, 2015).

Una vez descascarillado el arroz, el salvado es la parte externa del arroz integral y representa un 8-10% del total del grano; para el 2014 se produjeron 70 millones de toneladas métricas de salvado (Rafe & Sadeghian, 2017). Al estar constituido por varias capas externas posee diversos nutrientes, siendo una buena fuente de proteínas, minerales, grasa y fibra dietética. La gran mayoría del salvado se utiliza como alimento animal y una pequeña parte se utiliza para la extracción de su aceite (Gul *et al.*, 2015).

El aceite del salvado tiene grandes cualidades nutricionales, relacionadas con sus propiedades antioxidantes y quimiopreventivas y de igual forma presenta buenas propiedades para uso culinario. Es por lo que este aceite ha estado ganando interés por parte de los consumidores. Pero después de su proceso de extracción, el subproducto obtenido es desechado, sin saber que este salvado desengrasado presenta un alto contenido de proteína (12-14%) de muy buena calidad (Mann *et al.*, 2016).

La proteína que se encuentra en el salvado tiene un valor nutricional único y propiedades nutraceuticas. Esto se debe a que presenta un alto contenido de aminoácidos esenciales, principalmente la lisina, siendo este el mayor contenido de todos los cereales. Cabe mencionar que esta proteína además de tener gran valor nutricional es hipoalergénica, lo cual permite su uso en una gran cantidad de productos, incluidos las fórmulas para bebés (Mann *et al.*, 2016; Amagliani *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012; Chandi & Sogi, 2007).

La extracción y empleo de esta proteína de tan buena calidad es de gran interés para satisfacer las demandas del mercado, que piden incorporar proteína a sus productos sin que aumenten drásticamente de precio; es por lo que usar como fuente el desecho del

procesamiento de un subproducto es una excelente opción (Chandi & Sogi, 2007). Para esta extracción se pueden utilizar varios tipos de métodos; están los enzimáticos, físicos y alcalinos. Estos últimos son los más utilizados a nivel industrial, ya que se basan en solubilidad de las proteínas dependiendo de las condiciones de pH de la solución, donde solubilizan la proteína en medio alcalino y la precipitan al llegar a su punto isoeléctrico (pI) (Patsanguan *et al.*, 2014).

El método alcalino es simple, fácil de aplicar industrialmente y con un bajo costo, ya que no requiere la utilización de calor o materias primas caras. Esto combinado con el hecho de que el salvado de arroz es una materia de bajo costo, permite obtener proteína de muy buena calidad a bajo precio y con gran capacidad de aplicación en la industria alimentaria (Phongthai *et al.*, 2016a; Hou *et al.*, 2017).

En la actualidad la proteína es un nutriente muy apreciado por los consumidores, la encuesta del 2013 de IFIC's Food & Health reportó que un 58% de los consumidores estadounidenses revisan si los productos contienen proteínas a la hora de realizar su compra. Según Datamonitor más del 85% de los consumidores que compran alimentos funcionales, eligen los productos etiquetados como altos en proteína, debido a que los consideran buenos para ellos (Adams, 2014).

Este interés en las proteínas se debe a los muchos beneficios asociados a su consumo, como son el aumento de masa muscular, mejoramiento del rendimiento deportivo, control del apetito y mantenimiento de peso (Rivera, 2015; Garrido *et al.*, 2016; MacKenzie-Shalders *et al.*, 2015). Con esto se puede observar que los consumidores de productos altos en proteína son principalmente deportistas y personas que buscan cuidar su salud; los cuales son grupos en crecimiento en la actualidad.

Por lo señalado anteriormente, es importante estudiar el potencial de la proteína del salvado del arroz para la elaboración de productos altos en proteína, la cual no solo ayudaría a aumentar el valor nutricional del producto, sino que además brindaría propiedades funcionales, las cuales podrían favorecer el procesamiento, almacenamiento y las características sensoriales del producto. La capacidad de formación de emulsiones y espuma, la absorción de agua y aceite, son algunas de las propiedades de las proteínas que pueden aportar a los productos horneados, ya sea para reducir la pérdida de humedad, mantener la frescura y la sensación en la boca, así como para aumentar la retención de sabor y brindar la textura óptima (Patsanguan *et al.*, 2014; Gul *et al.*, 2015).

Las propiedades funcionales antes mencionadas, son de gran ayuda para la mayoría de los productos de panificación, pero principalmente para los libres de gluten. Ya que al eliminar esta proteína se producen defectos de calidad, como es la disminución del volumen, tendencia a desmoronarse y colores y textura atípicos. Lo que ha llevado a la elaboración de estudios científicos, con los cuales se ha encontrado que la incorporación de proteína láctea y vegetal, principalmente aislados, ayuda a mejorar la estructura y textura de estos productos. En el caso de la proteína del salvado de arroz se ha encontrado que aumenta la elasticidad, resistencia al corte, vida útil y la retención de gas en los productos libres de gluten (Naqash *et al.*, 2017).

La hipoalergenicidad propia de la proteína del salvado de arroz, la convierte en una gran opción en la elaboración de productos libres de gluten (Phongthai *et al.*, 2016). Al añadir proteína de arroz a estos productos, no solo se intenta reemplazar el gluten y tratar de mejorar sus características, sino que también se intenta mejorar la calidad nutricional de estos productos, ya que en su mayoría están compuestos por almidones y harinas refinadas; además de que contienen más azúcar y grasa para enmascarar la textura y sabor perdido (Hensel, 2015; Manzatti *et al.*, 2015; Varzakas & Tzia, 2015).

El mercado de productos libres de gluten ha aumentado en los últimos años de forma acelerada. Este fenómeno no solo se debe a las personas que presentan síntomas al consumir gluten (alergia al trigo, sensibilidad al gluten y celiacía); sino a las personas que compran estos productos, ya que consideran que les puede ayudar en otras áreas (Hensel, 2015). De las personas que adquieren los productos libres de gluten, el 38% lo consume porque cree que beneficia su salud, un 25% por que les ayuda a perder peso y un 13% para mejorar su desempeño atlético (Hensel, 2015; Zhao, 2012).

Es de interés estudiar el efecto de la incorporación de la proteína del salvado de arroz para determinar si mejora la calidad de los productos libres de gluten, para lograr que estos se encuentren en sincronía con lo que los consumidores esperan de éstos. Es por esto que en el presente estudio se evaluó el efecto de la adición de un extracto de proteína a galletas libres de gluten.

Las galletas son uno de los productos de panadería más populares y de gran interés comercial, esto se debe a su facilidad de consumo, gran variedad, larga vida útil y precio accesible; es por lo que es una buena matriz para implementar formulaciones

nutricionales como es el caso del enriquecimiento con proteínas (De Almeida Marques *et al.*, 2016; Bassinello *et al.*, 2011; Mancebo *et al.*, 2015).

El consumo de galletas está generalizado en toda la población, por lo tanto, si se realiza alguna mejora, esta va a llegar a muchas poblaciones que lo necesiten, como es el caso de los niños en estado de desnutrición, (Bassinello *et al.*, 2011); además es más fácil darle a un niño una galleta, la cual es relacionada con diversión o postre, que una comida completa o un suplemento. De igual forma es beneficioso para adultos mayores los cuales pierden masa muscular debido al envejecimiento o por condiciones de desnutrición (Stelten *et al.*, 2015). Y a las personas con reacciones adversas al consumir el gluten, que debido a las restricciones en su dieta y la baja calidad nutricional de los productos libres de gluten que se encuentran actualmente en el mercado.

Es por esto que las galletas libres de gluten son una buena opción para realizar un enriquecimiento con un extracto de proteína extraído del salvado de arroz, tanto para mejorar su calidad nutricional, así como para mejorar los problemas de textura. Al utilizar la proteína del salvado del arroz se está aprovechando un subproducto de la industria arrocera nacional, el cual de otro modo se destinaria a alimento animal, a pesar de su gran valor.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la adición de extracto de proteína del salvado de arroz sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas, sensoriales y en el almacenamiento de una galleta libre de gluten, con tres grados de sustitución.

Objetivos Específicos

- a. Caracterizar un extracto de proteína obtenido a partir del salvado de arroz de origen nacional, mediante análisis fisicoquímicos y de funcionalidad, para conocer su potencial uso en una galleta libre de gluten.
- b. Estudiar el efecto de la sustitución de diferentes porcentajes de extracto de proteína del salvado de arroz (15%, 25% y 30%) sobre las propiedades fisicoquímicas, reológicas y sensoriales de una galleta libre de gluten, para seleccionar la fórmula de mayor agrado.
- c. Evaluar el efecto del almacenamiento, sobre las características fisicoquímicas, y reológicas de la galleta de mayor agrado para conocer su comportamiento durante 45 días a temperatura ambiente.

1. Arroz

El arroz (*Oryza sativa L.*) es un cereal de la familia de las Poaceae, y es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, esto se debe a que es un alimento básico de la dieta, ya que suple el 21% de las necesidades calóricas; y en algunos países asiáticos hasta el 80% de las calorías y 20% de la proteína consumida diariamente. Se cultiva en más de 100 países, la producción anual estimada para el 2016 fue de 480 MMT (FAO, 2018), de las cuales el 90% es producido entre China e India; y se estima que solo el 5% alcanza el mercado de exportaciones (Sjöo & Nilsson, 2018; Guiné & Correia, 2016; Arendt & Dal Bello, 2008).

La producción costarricense para el período 2016/2017 fue de 200 347 toneladas métricas de arroz, la cual aumento con respecto al año anterior, pero a pesar de esto la producción solo logra cubrir el 56% del consumo nacional, por lo tanto, se debe recurrir a importaciones de Uruguay y Argentina. Para este período el consumo per cápita de los costarricenses fue de 47,48 kg al año, el cual se mantiene con la tendencia de años anteriores. La variedad de arroz más utilizada en el país corresponde a la Palmar 18 (Conarroz, 2017).

La mayoría del arroz es consumido cocido; pero una pequeña porción es molida para obtener su harina o es separado para obtener su almidón, ambos productos han aumentado en popularidad, ya que pueden ser utilizados para la elaboración de productos libres de gluten, debido a su sabor suave, color neutro, fácil digestibilidad, propiedades hipoalergénicas y funcionales (Sjöo & Nilsson, 2018; Phongthai *et al.*, 2017; Arendt & Dal Bello, 2008).

1.1. Estructura del grano de arroz

El grano de arroz está conformado por una cubierta externa protectora, llamada cascarilla o granza, la cual debe ser separada; por su parte en la parte interna se encuentra el salvado, germen y el endospermo (Wrigley *et al.*, 2016).

La cascarilla del arroz es constituida por dos capas unidas, llamadas lemma y palea, las cuales están compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa, sílice y lignina; lo cual le brinda características abrasivas que ayudan a la protección del grano. Debido a

su composición la cascarilla es una importante fuente de energía para varios usos, tales como camas avícolas, floricultura y hasta sustituto de combustibles fósiles (Wrigley *et al.*, 2016; Nadathur *et al.*, 2016).

El salvado (8-10%) corresponde a las capas internas que cubren al grano después de remover la cascarilla (pericarpio, testa, nucellus y aleurona), estas capas tienen alto contenido de grasa, proteínas, vitaminas del complejo B y minerales; su composición se ve afectada por el grado de pulido que se le da al grano. El germen (1-3%) se encuentra ubicado en el área baja del grano, presenta una composición muy nutritiva, que el grano en caso de requerirlo la utilizaría para germinar (Wrigley *et al.*, 2016; Cho & Almeida, 2012; Chakraverty & Singh, 2014 & Nadathur *et al.*, 2016).

El endospermo es el componente principal del grano (90-91%), el cual está compuesto en su mayoría por almidón el cual le brinda su alto valor calórico; a su vez los demás componentes se encuentran en concentraciones muy bajas (Nadathur *et al.*, 2016).

1.2. Procesamiento del arroz

Para la obtención del arroz blanco que se consume habitualmente se requiere un procesamiento para eliminar las capas externas; es por esto que después de la cosecha el grano completo de arroz se seca hasta bajar la humedad a un 12-14%, y así evitar que se deteriore, decolore o desarrolle olores extraños durante el almacenamiento; no se puede secar más, porque se vuelve quebradizo (Guiné & Correia, 2016). Posteriormente se lleva a cabo el descascarillado, mediante roles de hule o discos de esmeril, los cuales remueven las cascarillas por fricción; de este proceso se obtiene el arroz integral. Este arroz puede ser consumido, pero normalmente se le aplica un pulido, con el cual se remueven las capas del salvado y el germen mediante abrasión, dejando el grano blanco listo para el consumo (Lusas & Rooney, 2001; Sun, 2016; Arendt & Dal Bello, 2008).

De este proceso además de la cascarilla y salvado se obtienen granos quebrados; pudiendo ser utilizados para producir harina de arroz o separar el almidón, los cuales como se mencionó anteriormente son ingredientes en las formulaciones libres de gluten (Lusas & Rooney, 2001; Arendt & Dal Bello, 2008).

2. Salvado del arroz

El salvado es el subproducto obtenido después del pulido del arroz integral, por lo cual en muchos casos corresponde a una mezcla de las capas internas y el germen, un poco del almidón del endospermo y fragmentos de la cascarilla. El salvado de arroz está compuesto por 12-16% de proteína cruda, 23-28 % de fibra soluble e insoluble y un 15-20% de aceite, el cual incluye una matriz de compuestos bioactivos, como el orizanol, fitoesterol, tocotrienol, escualeno, policosanol, ácido fítico, ácido ferúlico y el inositol hexafosfatado para mencionar algunos; además de un 7-8% de minerales como, hierro, fósforo y magnesio; y vitaminas del complejo B. La composición antes mencionada, puede verse modificada por la variedad del arroz, las condiciones climáticas y el procesamiento utilizado (Rafe *et al.*, 2014; Gul *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2016; Watson *et al.*, 2014 & Amagliani *et al.*, 2017a).

El salvado del arroz presenta cualidades nutricionales de alta calidad, ya que se ha encontrado que puede ayudar a disminuir el riesgo de diabetes tipo 2, regula el metabolismo de lípidos, controla el síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares, además de mostrar actividad anticancerígena (Watson *et al.*, 2016).

Es por lo que los investigadores le están buscando aplicaciones en la industria alimentaria, principalmente ayudando a aumentar el valor nutricional de los alimentos procesados; los cuales se encuentran en gran demanda en el mercado actualmente (Gul *et al.*, 2015). Una de las ventajas del salvado es que se puede utilizar simplemente estabilizado o desengrasado; o se pueden adicionar sus diferentes componentes por separado, ya sea su aceite o su proteína hipoalergénica de gran calidad (Gul *et al.*, 2015).

En este trabajo nos vamos a centrar en las propiedades funcionales y un posible uso de la proteína del salvado de arroz

2.1. Estabilización del salvado

A pesar de su gran valor nutricional del salvado, el 90% se utiliza como alimento animal y el restante se utiliza para la extracción de su aceite. Esto se debe a que, para consumo humano el salvado cuenta con una vida útil muy corta, debido a su tendencia a enranciarse; además de la presencia de compuestos anti nutricionales (Mann *et al.*, 2016; Cho & Almeida, 2012; Watson *et al.*, 2014 & Nadathur *et al.*, 2016).

La rancidez se debe a su alto contenido de aceite, además de lipasas muy potentes, las cuales son liberadas de las células durante el pulido de los granos; y al entrar en contacto con el aceite causan su hidrólisis, liberando ácidos grasos y glicerol, lo cual conlleva a la formación de malos olores y un aumento en la acidez del aceite (Mann *et al.*, 2016; Chakraverty & Singh, 2014; Cho & Almeida, 2012 & Watson *et al.*, 2014).

Los compuestos que afectan el salvado en su mayoría corresponden a enzimas o algún tipo de proteína (a excepción de los fitatos), es por esto que para estabilizar el salvado se pueden desnaturar estos compuestos; esto se logra mediante un tratamiento ligero con ácido y álcali o térmico (ya sea el uso de vapor, autoclavar, sancochar, secar o tostar). Hay muchos métodos, pero todos tienen sus ventajas y desventajas, por lo tanto, se debe elegir el que no afecte el salvado para el uso posterior (Mann *et al.*, 2016; Chakraverty & Singh, 2014; Watson *et al.*, 2014; Yada, 2018 & Zhang *et al.*, 2012).

En el caso de los tratamientos térmicos para estabilizar antes mencionados, no se recomienda utilizarlos cuando se quiere realizar una extracción posterior de la proteína, esto se debe a que el calor desnaturiza y forman agregados de las proteínas, por lo tanto, se vuelven insolubles y muy difíciles de extraer (Zhang *et al.*, 2012 & Nadathur *et al.*, 2016).

Para extraer la proteína se debe recurrir a otro método de estabilización. En muchos casos se prefiere desengrasar el salvado y así evitar la reacción de hidrólisis, al remover su sustrato. Para desengrasar el salvado se pueden utilizar métodos mecánicos, en los cuales se prensa el salvado para extraer el aceite; pero su rendimiento es bajo, en comparación con la extracción con solventes no polares, siendo el n-hexano el más utilizado (Chakraverty & Singh, 2014). Con este proceso se logra obtener dos subproductos con alto valor nutricional. Por una parte, se obtiene un aceite de excelente calidad para cocinar y con alto contenido de compuestos bioactivos; y un subproducto estable, con un alto contenido de proteína y fibra de muy buena calidad (Mann *et al.*, 2016; Chakraverty & Singh, 2014 & Watanabe *et al.*, 2019).

2.2. Proteína del salvado de arroz

El valor nutricional de las proteínas varía significativamente dependiendo de su composición de aminoácidos, digestibilidad, pureza, la proporción de aminoácidos esenciales y los efectos que sufre durante el procesamiento. En la actualidad se están

investigando diferentes fuentes de proteínas para conocer sus propiedades y la posibilidad de que contribuyan a suplementar los productos alimentarios (Han *et al.*, 2015).

La proteína del salvado del arroz es superior nutricionalmente no solo a la del arroz pulido, sino también a la de otros cereales o fuentes vegetales. Entre sus características, se encuentra un alto contenido de aminoácidos esenciales, principalmente la lisina, valina, histidina, triptófano y treonina (Amagliani *et al.*, 2016; Wrigley *et al.*, 2016 & Mann *et al.*, 2016). Esto lleva a que la proteína tenga un PER (tasa de eficiencia proteica, razón de la cantidad de peso ganado, sobre la cantidad de proteína consumida) la cual se encuentra en un rango de 1,9-2,5; el cual puede ser comparable con el de la caseína (2,5) (Watanabe *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012 & Watanabe *et al.*, 2015). De igual forma su NPU (utilización proteínica neta) y valor biológico, 70,7 y 72,6 respectivamente es comparable al del suero de leche (74,0 y 78,8) (Han *et al.*, 2015). También se puede mencionar que su digestibilidad verdadera sobrepasa el 90% (Zhang *et al.*, 2012 & Adebisi *et al.*, 2009).

El hecho de que la proteína del salvado del arroz sea hipoalergénica, la hace aún más interesante, ya que puede ser utilizada para la elaboración de productos para bebés y para personas con alguna alergia alimentaria (Watanabe *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015 & Nadathur *et al.*, 2016) A todo esto se le puede agregar que en las últimas investigaciones se le ha atribuido actividad anticancerígena (Yada, 2018 & Han *et al.*, 2015).

2.3. Tipos de proteínas presentes en el salvado de arroz

La proteína del salvado del arroz corresponde principalmente a un grupo de proteínas de almacenamiento; las cuales tienen la función de acumular altos niveles de aminoácidos en espacios reducidos de la semilla (Yada, 2018). La proteína presente se puede separar y categorizar mediante la clasificación basada en solubilidad de Osborne.

- a. **Albúminas:** corresponde a las proteínas solubles en agua, las cuales se coagulan al ser tratadas con calor. Estas proteínas son fácilmente digeridas y absorbidas. De las proteínas presente en el salvado representan un 24-43%. Su punto isoeléctrico (pI) es a 4,1 y 6,4.
- b. **Globulinas:** son las proteínas solubles en soluciones salinas, las cuales son ricas en cisteína y metionina, pero pobres en lisina. Un 13-36% de las proteínas del salvado son globulinas, las cuales tienen un pI 4,3; 5,85-7,27 y 7,9.

- c. Prolaminas: estas proteínas son solubles en etanol al 60-70%, son ricas en glutamina e isoleucina, pero pobres en lisina. Su baja solubilidad en agua se debe a su bajo contenido de aminoácidos polares y su alto contenido de aminoácidos ácidos. Solo un 1-5% de la proteína del salvado son prolaminas. Su pI está en el rango de 6,0-6,5.
- d. Glutelinas: la mayoría de la proteína del salvado (22-45%) es soluble en álcali o ácido, debido que están muy agregadas, con muchos enlaces disulfúricos y alto peso molecular. Estas proteínas son ricas en lisina y tienen un pI de 4,8; 5,7-6,8 y 8,0-8,7 (Amagliani *et al.*, 2017a; Datta, 2008; Lasztity, 1995 & Nadathur *et al.*, 2016).

Una característica diferenciadora de la proteína del arroz es que las glutelinas son predominantes sobre las prolaminas, las cuales son mayoritarias en todos los cereales; esta peculiaridad hace que la proteína del arroz sea similar a la de las leguminosas, ya que las glutelinas es la fracción más balanceada en aminoácidos esenciales, principalmente lisina y triptófano (Amagliani *et al.*, 2017; Datta, 2008 & Nadathur *et al.*, 2016).

Otra parte importante de la fracción proteica del salvado son las enzimas, entre ellas se encuentran varios tipos de lipasa los cuales tienen la especificidad de hidrolizar el triacilglicerol en la posición 1,3. Además de las lipasas, se pueden encontrar amilasas, catalasas, oxidasas del ácido ascórbico, citocromo y polifenoles; deshidrogenasas y esterases, de las cuales algunas causan la rancidez oxidativa después del pulido (Yada, 2018; Lasztity, 1995 & Nadathur *et al.*, 2016).

2.4.Extracción de la proteína del salvado de arroz

Previo a la extracción de la proteína del salvado, se debe llevar a cabo la estabilización y desengrasado del mismo; siempre tomando en cuenta que las condiciones utilizadas no deben desnaturalizar o agregar las proteínas, ya que esto dificulta el proceso de extracción y disminuye el rendimiento. La presencia de fibra dificulta la extracción, ya que se encuentra fuertemente unida a la proteína (Amagliani *et al.*, 2017b; Patsanguan *et al.*, 2014).

Se han realizado muchos estudios buscando el mejor método de extracción de las proteínas, entre ellos están los alcalinos, enzimáticos y físicos o una combinación de ellos. A continuación, se explica el fundamento de cada uno.

- Métodos alcalinos: es el método más utilizado a nivel industrial, debido a su simplicidad y bajo costo, ya que este se basa en la solubilidad de las proteínas, al ser las glutelinas las mayoritarias del arroz, se utilizan condiciones alcalinas para propiciar la solubilización de la mayor cantidad. Cuando se tiene a las proteínas en solución se procede a separarlas, ya sea con una precipitación a su punto Isoeléctrico o con una ultrafiltración; siendo las últimas las que poseen mejores propiedades funcionales. Cuando se utiliza el pI se obtienen productos con contenido de proteína en un rango de 40 a 80%; las diferencias en el contenido de proteínas que se logra extraer pueden depender del tipo de arroz, el grado de molienda, el método de estabilización y las condiciones alcalinas. Los estudios han demostrado que la proteína obtenida por este método tiene mejor digestibilidad y biodisponibilidad que la obtenida mediante procesos enzimáticos. Aun así, se debe tener cuidado con este método, porque condiciones alcalinas muy fuertes, pueden causar desnaturalización e hidrólisis de las proteínas, aumento de la extracción de productos no proteicos, aumento de la reacción de Maillard y la formación de productos tóxicos como la lisinoalanina (Amagliani *et al.*, 2017b; De Souza *et al.*, 2016; Phongthai *et al.*, 2016; Banndyopadhyay, *et al.*, 2012; Rahim, *et al.*, 2015; Anderson & Guraya, 2001; Hou *et al.*, 2017 ; Kumagai *et al.*, 2009 & Wang *et al.*, 2016).
- Método enzimático: con este método se utilizan enzimas que hidrolizan los carbohidratos (celulasa, hemicelulasa, pectinasa y xilanas) para permitir la liberación de las proteínas de las estructuras de polisacáridos, los cuales forman la pared celular; en muchos casos se deben utilizar condiciones variadas para adecuarse a las condiciones óptimas de las enzimas, las cuales pueden requerir en algunos casos temperaturas o pH altos. Luego del tratamiento enzimático se debe definir el mejor método de separar las proteínas; dependiendo de este se obtienen concentrados y asiladas con alto contenido de proteína. También se pueden utilizar proteasas para las extracciones, pero se obtienen hidrolizados proteicos, pero sus propiedades varían. Los métodos enzimáticos son muy utilizados en estudios, ya que se obtienen las proteínas con mejores propiedades funcionales, pero a pesar de sus ventajas son muy costosos (Amagliani *et al.*, 2017b; Phongthai *et al.*, 2016; Rahim, *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).
- Métodos físicos: en estos procesos se induce pocas modificaciones al producto, además de ser más económicos, ya que se basan en separar la proteína del salvado

mediante mecanismos físicos, en lugar de químicos o enzimáticos; el problema es que sus rendimientos y contenido de proteínas son muy bajos, por lo tanto, se suelen combinar con métodos enzimáticos, para ayudar a la separación. Entre los más utilizados para la extracción de proteína del salvado están, congelamiento-descongelamiento, homogenización de alta velocidad, altas presiones, agua supercrítica y zonificación (Amagliani *et al.*, 2017b; Rahim, *et al.*, 2015).

2.5. Propiedades funcionales de la proteína del salvado de arroz

Más allá de su aporte nutricional y a la salud, el valor de las proteínas se extiende a sus propiedades funcionales; las cuales hacen a las proteínas versátiles y útiles en el desarrollo, procesamiento, almacenamiento y consumo de un amplio rango de alimentos (Amagliani *et al.*, 2017b & Yada, 2018).

Las propiedades funcionales de las proteínas no son una característica estática, sino se ve influenciada por factores intrínsecos (estructura de la proteína, conformación, composición de aminoácidos, propiedades fisicoquímicas y su hidrofobicidad e hidrofilia) y extrínsecos (pH, temperatura, tiempo y la influencia o interacción con otros componentes del alimento). Con estas la proteína logra disolverse, y absorber agua o grasa, formar espumas, emulsiones, geles y películas. Estas propiedades tienen su impacto en las características sensoriales, como el sabor y textura; que en última instancia determina la aceptabilidad de los consumidores hacia los productos (Amagliani *et al.*, 2017b & Yada, 2018).

a. Solubilidad:

La solubilidad corresponde a la habilidad de cierto soluto de disolverse en un solvente. En el caso de las proteínas su solubilidad se ve mediada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. En estado nativo, las proteínas se doblan en forma globular, donde los grupos no polares o hidrofóbicos se encierran y estabilizan y los grupos hidrofílicos se encuentran en la superficie formando enlaces de hidrógeno con el agua; pero cuando la proteína se desdobla, los grupos hidrofóbicos quedan expuestos. Por lo tanto, para solubilizar una proteína se requiere limitar la interacción de grupos hidrofóbicos y aumentar la repulsión electrostática entre proteínas, ya que la baja solubilidad se da por la dominancia de fuerzas de atracción y la asociación molecular, es

por esto que las proteínas presentan su solubilidad más baja, en su punto isoelectrico (pI), en el cual todas sus cargas tienen un valor neto de 0 (Yada, 2018 & Wang *et al.*, 1999).

La solubilidad se ve afectada por la temperatura, pH, concentración de sal y la constante dieléctrica del solvente; esto se debe a que variaciones en esos factores causan cambios conformacionales y estructurales en la proteína (Amagliani *et al.*, 2017b).

Cabe mencionar que la solubilidad se ve relacionada con otras propiedades funcionales, como es la capacidad de emulsificación y formación de espumas y geles (Yada, 2018; Rosell *et al.*, 2015 & Rafe & Sadeghian, 2017). Es por lo que para su uso como ingrediente se requiere que una proteína tenga una solubilidad superior al 80% (Ma *et al.*, 2017 & Chandi & Sogi, 2007).

La proteína del arroz presenta una solubilidad mínima en el rango de 4-5 de pH (rango en el que se encuentra el pI de la mayoría de sus proteínas); mientras que su solubilidad aumenta conforme aumenta la alcalinidad o acidez. Esto se debe a que las proteínas predominantes en el arroz son glutelinas, las cuales solo se disocian con las condiciones extremas de pH. (Amagliani *et al.*, 2017b; Nadathur *et al.*, 2016 & Phongthai *et al.*, 2016). La solubilidad de esta proteína se puede ver aumentada cuando se encuentra unida a la fibra dietética o la fracción soluble de la hemicelulosa (Rafe & Sadeghian, 2017).

Por su parte la adición de sales como el cloruro de sodio, no causa grandes cambios en la solubilidad de la proteína del salvado de arroz, ya que las globulinas no son proteínas predominantes (Wang *et al.*, 1999).

Debido a su naturaleza hidrofóbica, las proteínas del arroz son insolubles y por lo tanto no logran producir una masa suficientemente viscoelástica, la cual sea capaz de retener el dióxido de carbono que se forma durante la fermentación de productos de panadería. Esto se debe al bajo contenido de prolaminas en la proteína del arroz, provocando que los productos tengan bajo volumen específico y con una miga compacta (Arendt & Dal Bello, 2008). Es por esto que este tipo de proteína no están utilizada en la industria de panadería, ni se ha considerado como un sustituto del gluten, en los productos para celíacos.

b. Absorción de agua y aceite

Esta propiedad es una medida de la cantidad de agua que puede ser absorbida por gramo de un polvo de proteína la cual se relaciona directamente con la interacción de las moléculas de proteína con el agua, y su capacidad de ligarla e hincharse (Yada, 2018).

Esta propiedad está en función de varios parámetros como: el tamaño, forma, factores estéricos, características conformacionales, el balance de hidrofílico-hidrofóbico de los aminoácidos en la proteína, así como los lípidos y carbohidratos asociados a la misma. Pero también se ve afectada por la solubilidad de la proteína y las condiciones de pH, temperatura, presión de vapor, entre otras (Chavan *et al.*, 2001).

La absorción de agua es requerida en productos de panadería para reducir la pérdida de humedad durante el empaque, para mantener fresca y la sensación seca en la boca al comerlos (Amagliani *et al.*, 2017b; Yadav *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Rafe & Sadeghian, 2017 & Chandi & Sogi, 2007).

Las proteínas del salvado ayudan a ligar e inmovilizar la humedad y aceite en los productos, por lo tanto, evitan su salida durante la congelación y descongelación (Nadathur *et al.*, 2016). Para su utilización en productos viscosos, como las sopas o salsas, se requiere que la absorción de agua se encuentre en el rango de 1,49 a 4,72 g/g (Zhang *et al.*, 2012). La absorción de agua por parte de la proteína del salvado es de 3,87 a 5,60 g/g (Amagliani *et al.*, 2017b), lo que le permitiría ser fácilmente utilizada en productos que requieran retener humedad.

La absorción de aceite es la medida de la cantidad de aceite que puede ser absorbida por gramo de proteína en polvo. Esta propiedad ayuda a mejorar la sensación en boca y la retención de sabor y textura de ciertas comidas (Yada, 2018; Amagliani *et al.*, 2017b; Rafe & Sadeghian, 2017 & Patsanguan *et al.*, 2014).

La absorción de aceite se ve favorecida cuando la estructura de la proteína se desdobra, exponiendo así más grupos hidrofóbicos, permitiendo la retención física del aceite (Zhang *et al.*, 2012 & Patsanguan *et al.*, 2014). Esta propiedad se ve afectada por el tamaño, cantidad de aminoácidos no polares y método de procesamiento, siendo los de menor tamaño y densidad los que absorben y retienen más grasa (Yada, 2018).

El gran contenido de aminoácidos no polares en proteínas de origen vegetal les facilita ligar hidrocarburos de cadena larga, aumentando su absorción. (Yada, 2018), en el caso de la proteína del salvado es de 3,74 a 9,18 mL/g (Amagliani *et al.*, 2017b), lo cual puede ser de ayuda para retener sabor o mejorar la textura de los productos libres de gluten.

c. Formación de espuma

La espuma es una dispersión de burbujas de gas suspendidas en un líquido o semisólido con alta viscosidad. Durante su formación, se produce una adsorción de moléculas reactivas en la interfase gas-líquido, debido a su marcada actividad superficial, como es el caso de las proteínas y polisacáridos. La espuma confiere textura y atributos sensoriales deseados en ciertos alimentos (Xiong *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2017 & Chandi & Sogi, 2007).

La capacidad de formar espuma depende de la habilidad de la proteína de disolverse rápidamente en la interfase del aire-agua y llevar a cabo un rápido cambio conformacional y reorganizarse en la interfase y formar una película cohesiva y viscoelástica en la interfase mediante interacciones intermoleculares (Amagliani *et al.*, 2017b; Rosell *et al.*, 2015; Patsanguan *et al.*, 2014; Rafe & Sadeghian, 2017 & Patsanguan *et al.*, 2014).

La capacidad de formar espuma (FE) describe la cantidad de área interfacial que la proteína es capaz de estabilizar por unidad de peso o concentración; esto está relacionado con alta flexibilidad molecular e hidrofobicidad. La capacidad de estabilizar la espuma (EEs), es la habilidad de la proteína de mantener la espuma a pesar del estrés mecánico y gravitacional. Esto se logra por las propiedades reológicas de la película, como son la viscosidad y resistencia al corte, elasticidad y la magnitud de la presión de separación entre las capas de proteínas. (Amagliani *et al.*, 2017b).

Es importante mencionar que las propiedades de las proteínas requeridas para formar y para estabilizar la espuma son diferentes, ya que para lo primero se requiere la difusión de proteínas solubles a la interfase aire-agua y al mismo tiempo llevar a cabo un rápido cambio conformacional y reordenamiento en la interfase; mientras que para estabilizarla se requiere formar una película gruesa, cohesiva y viscoelástica alrededor de la burbuja (Wang *et al.*, 1999).

La condición de pH de la disolución donde se encuentra la proteína va a afectar su capacidad de interactuar en la interfase, ya que el pH varía las cargas electrostáticas de la proteína ocasionando cambios en su conformación, y por lo tanto la solubilidad de esta (Phillips & Williams, 2011; Yadav *et al.*, 2011; Chandi & Sogi, 2007 & Patsanguan *et al.*, 2014). También la presencia de grasa disminuye la capacidad de formación de espuma y su estabilidad en la proteína del salvado de arroz (Rafe & Sadeghian, 2017).

La capacidad de formación de espuma de la proteína del salvado de arroz es comparable con la del huevo (Nadathur *et al.*, 2016 & Wang *et al.*, 1999), el cual es el estándar en espuma.

d. Formación de emulsiones

Emulsificar es el proceso de dispersar un líquido entre otro, cuando estos son totalmente inmiscibles; esperando que la dispersión lograda se mantenga estable y no se separen sus componentes en las dos fases (Sakamoto *et al.*, 2017).

Las proteínas son capaces de estabilizar gotas de aceite contra la floculación y coalescencia, ya que al contar con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos estos pueden interactuar en la interfase agua-aceite, además que se repelen entre sí cuando se encuentran en un pH lejano a su pI, al poseer una carga neta, ya sea positiva o negativa. (Phillips & Williams, 2011; Chen & Rosenthal, 2015 & Phongthai *et al.*, 2016).

Al igual que con la formación de espuma, las propiedades de emulsificación se ven afectadas por factores tales como: velocidad de absorción de la proteína en la interfase aceite-agua, la cantidad de proteína absorbida, los cambios conformacionales que se dan en la interfase, la reducción de tensión que se logre en la interfase y la formación de una película cohesiva (Amagliani *et al.*, 2017b & Zang *et al.*, 2019). Uno de los factores más importantes es la solubilidad de la proteína, entre más lejos se encuentre el pH del punto isoeléctrico, mayor es su capacidad para emulsificar (Amagliani *et al.*, 2017b; Zang *et al.*, 2019 & Yadav *et al.*, 2011).

La capacidad de emulsificación (CE) se refiere a la máxima cantidad de aceite que puede ser emulsificado en condiciones específicas por una cantidad estándar de proteína. La estabilidad de la emulsión (EEm), corresponde a la habilidad de la proteína de formar una emulsión que puede resistir cambios en sus propiedades durante un cierto periodo de tiempo (Amagliani *et al.*, 2017b)

La proteína del salvado presenta capacidad de emulsificación comparable a la caseína, la cual le ayuda en la elaboración de productos cárnicos (Nadathur *et al.*, 2016). Pero al mismo tiempo es mucho menor a la del suero bovino, lo cual se puede deber a la baja hidrofobicidad en la superficie, lo que lleva a bajas interacciones entre el aceite y la proteína. (Amagliani *et al.*, 2017b & Wang *et al.*, 1999).

2.6. Usos de la proteína del salvado de arroz

Como se ha mencionado anteriormente la utilización de la proteína del salvado del arroz ha aumentado en los últimos años debido a su gran calidad nutricional y a su bajo costo. Todo esto se ve acrecentado por el problema mundial de malnutrición, el cual es predominante en países en desarrollo (Han *et al.*, 2015 & Yadav *et al.*, 2011).

A pesar de sus grandes beneficios esta proteína no se encuentra disponible comercialmente, debido a su complejidad y su baja solubilidad, ya que su estructura está formada por muchos enlaces disulfúricos entrecruzados, los cuales causan fuertes agregaciones. A esto se debe agregar que la proteína del salvado se encuentra rodeada por fibra, lo cual dificulta aún más su extracción; y a un olor característico que no es muy apetitoso (Kaewka *et al.*, 2009; Rafe *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2016; Amagliani *et al.*, 2017b & Adebisi *et al.*, 2009).

A pesar de los problemas antes mencionados, actualmente se están realizando investigaciones para mejorar los porcentajes de extracción de la proteína, tratando de obtenerla con la mayor pureza, sin efectos por el procesamiento y con las mejores propiedades funcionales. Esto con el fin de utilizarla en el desarrollo de productos con alto valor nutricional, para personas en desnutrición en riesgo social; para suplementar productos para deportistas y como alternativa de alimentos para bebés (Amagliani *et al.*, 2017b).

Varios estudios han demostrado que el concentrado de proteína del salvado de arroz puede ser utilizado como ingrediente en la formulación de productos altos en proteína, como es el caso del pan, galletas, pastas, por decir algunos; siempre priorizando los productos donde se requiera baja solubilidad de la proteína (Amagliani *et al.*, 2017b).

3. Galletas

Las galletas se producen de una masa obtenida de productos básicos como: harina, grasa (ya sea mantequilla, aceite o manteca), azúcar, leche, huevos, sal, agua, almidón, agentes leudantes o emulsificantes y esencias. La masa debe ser lo suficientemente viscosa que permita ser horneada en una superficie lisa (Hu & Jacobson, 2016; Samnu & Sahin, 2008).

Las galletas se caracterizan por formulaciones con bajo contenido de agua, debido a su alta proporción de azúcar y grasa; lo que ocasiona que su masa sea cohesiva, pero con muy poca elasticidad y extensibilidad; debido a que estos ingredientes evitan la formación de la red de gluten, pero al mismo tiempo proporciona la plasticidad y cohesividad deseada. El esparcimiento durante el horneado es un parámetro muy importante de la calidad de las galletas, es por lo que la elasticidad no es deseada, ya que puede ocasionar que estas se encojan después del corte (Samnu & Sahin, 2008).

Al modificar los ingredientes y realizar cambios en el procesamiento se pueden obtener una variedad infinita de galletas, las cuales varían en tamaño, forma, textura, composición, sabor y color. (Samnu & Sahin, 2008).

3.1. Procesamiento de las galletas

El procesamiento de las galletas tiene un esquema básico, el cual varía solo en los primeros pasos, ya que depende del tipo de galleta que se desee obtener, así va a ser el tiempo y tipo de mezclado de la masa, además del equipo utilizado para formarlas. Las galletas se pueden producir utilizando máquinas formadoras, moldes rotatorios, cortadores y con manga, donde las últimas son las menos cohesivas en comparación con las primeras (Manley, 2011; Samnu & Sahin, 2008).

Después de cortar las galletas se procede a hornearlas, es ahí donde la masa sufre cambios físicos y químicos en el horno, como son: la formación de la corteza, derretimiento de la grasa, coagulación de las proteínas, gelatinización de los almidones, caramelización de los azúcares, conversión del agua a vapor y expansión y escape de los gases. Se debe utilizar la temperatura y tiempo necesario para que todos estos cambios se den favorablemente (Manley, 2011; Samnu & Sahin, 2008).

Al terminar el horneado se procede a dejar enfriar las galletas, ya que al salir del horno además de su alta temperatura, los ingredientes no se han estabilizado en su estado actual, principalmente el agua no se ha redistribuido, lo que causa que las galletas todavía estén suaves y elásticas. Por último, se procede a empacar las galletas para conservar sus características en el tiempo; y ser consumidas en cualquier momento del día (Manley, 2011; Samnu & Sahin, 2008).

3.2.Efecto de los ingredientes en las galletas

Los ingredientes de los productos de panadería son la harina, azúcar, grasas, huevos, agentes leudantes, agua, entre muchos otros; sus porcentajes van a variar según el tipo de producto que se esté formulando. Cada uno de estos ingredientes tiene su propio rol y función en la preparación de las galletas, los cuales se explican a continuación:

- a. Harina: es el componente principal de los productos de panadería, dado que brinda el gluten para la formación de la estructura. En el caso de las galletas se utilizan harinas del tipo débil, ya que un alto contenido de proteínas (gluten) ocasiona la producción de galletas gruesas, duras y con poco esparcimiento. El esparcimiento de las galletas es un parámetro de calidad, el cual depende de su velocidad y el tiempo de fijación. El problema con el gluten es que este disminuye estos factores, ya que cuando la masa de las galletas se calienta, disminuye su viscosidad, lo que le permite esparcirse hasta que la viscosidad vuelve a aumentar y detiene el esparcimiento; pero el gluten al llegar a su temperatura de transición vítrea ocasiona un aumento en la viscosidad y detiene el esparcimiento (Sumnu & Sahin, 2008). Cabe mencionar que en algunos casos sí se desea la obtención de galletas duras y con mayor resistencia durante el procesamiento, por lo tanto, se utilizan harinas con mayor contenido de proteína (Davidson, 2018).
- b. Azúcar: es uno de los ingredientes principales en galletas, en primera instancia brindan dulzor y color. También actúa como un agente endurecedor al cristalizar cuando la galleta se enfría, haciendo el producto crujiente; pero en cantidades moderadas, actúa como ablandador, debido a su habilidad de retener agua. De igual forma hace las galletas frágiles, ya que controla la hidratación y dispersa las proteínas y el almidón, evitando la formación de una masa continua (Sumnu & Sahin, 2008; Davidson, 2018 & O'Sullivan, 2017).

- c. Grasas: es un ingrediente esencial para las galletas, ya que durante el mezclado actúa como lubricante y compite con la fase acuosa, previniendo la formación de la red de gluten. Su adición suaviza la masa, disminuyendo su viscosidad, lo cual le permite mayor esparcimiento durante el horneado. Si se utilizan en altas cantidades, evita el hinchamiento y gelatinización del almidón, lo cual les da una textura crujiente a las galletas. Además, cabe mencionar que brinda sabor al producto final (Sumnu & Sahin, 2008; Davidson, 2018 & O'Sullivan, 2017).
- d. Huevos: ayudan en el esponjamiento y emulsificación de la masa, ya que permite unir el agua y grasa, lo que resulta en una galleta más cremosa y con textura suave (Sumnu & Sahin, 2008).
- e. Agentes leudantes: en las galletas se utilizan agentes químicos, como son el bicarbonato de sodio o amonio; los cuales hacen las galletas porosas y crujientes (Sumnu & Sahin, 2008 & Davidson, 2018).
- f. Agua: es necesaria para la solubilización de los ingredientes, la hidratación del almidón y proteínas; y la formación de la red de gluten. El agua en las galletas no es un ingrediente principal, ya que no se desea la formación de la red de gluten; pero si se utiliza muy poca la masa queda frágil y las galletas con mucha corteza. El agua se debe utilizar con medida para disminuir la viscosidad y aumentar la extensibilidad de la masa (Sumnu & Sahin, 2008).

3.3. Tendencias en el mercado de las galletas

Como parte de las dietas actuales se recomienda realizar dos meriendas al día, para mantener el metabolismo activo, estas comidas no pueden ser muy grandes; en este caso las galletas ayudan por su pequeño tamaño, además de que, con su contenido de carbohidratos, ayuda a suplir energía para mejorar la actividad del cerebro (Manley, 2011). El mercado mundial de los snacks está valorado en \$66 billones, en el 2003, del cual el 22% corresponde a productos de panadería, galletas y palomitas (Han *et al.*, 2010).

Pero los productos utilizados para las meriendas no solo deben cumplir con las necesidades nutricionales, sino adaptarse al estilo de vida actual, esto también lo cumplen las galletas, con su tamaño y forma fácil de transportar y almacenar, versatilidad en sus sabores y una larga vida útil (Manley, 2011).

Para mantenerse como una de las meriendas favoritas, las galletas deben de cumplir con las tendencias actuales del mercado, es por lo que los productores están innovando en galletas libres de gluten y con declaraciones nutricionales, una de las más buscadas en este momento son las altas en proteínas y fibra.

a. Libres de Gluten

La celiacía es una enfermedad autoinmune, en la cual se presenta una respuesta anormal del sistema inmune al consumo de gluten (presente en el trigo, cebada y centeno), resultando en una inflamación y daño a la mucosa del intestino delgado, reduciendo la absorción de nutrientes y causando síntomas gastrointestinales. Aunque esta no es la única enfermedad relacionada, también está la alergia al trigo y la sensibilidad al gluten, las cuales al igual que la celiacía requieren una dieta libre del detonante, es por esto que en la actualidad se están desarrollando productos libres de gluten (Jnawali *et al.*, 2016; Naqash *et al.*, 2017; Manley, 2011 & Osborn & Morley, 2016).

Del 2013 al 2015 el mercado de productos libres de gluten vio un crecimiento del 136%; el cual se debe a que un 1-2% de la población sufre de celiacía y un porcentaje aun mayor sufre algún tipo de sensibilidad relacionada. Pero esta no es la única razón, ya que las personas sin ningún impedimento dietario, también buscan estos productos, ya que consideran que tienen beneficios para su salud y las ayudan a perder peso (Gobbetti *et al.*, 2018 & Hensel, 2015).

Los productos libres de gluten son alimentos que están constituidos por, o son elaborados únicamente con ingredientes que no contienen trigo, cebada, centeno o sus variedades híbridas, o han sido procesados de forma especial para eliminar el gluten, y cuyo contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor, esto según el CODEX STAN 118-1979 (2008).

Esto es un reto, principalmente en el área de panadería, ya que el gluten forma una red, que en productos horneados se encarga de mantener la estructura, absorber agua y brindar cohesividad, viscosidad y elasticidad de la masa (Jnawali *et al.*, 2016).

La elaboración de galletas libres de gluten es más sencilla, en comparación con otros productos horneados, ya que en estas no se desea la formación de la red de gluten, pero al mismo tiempo se tienen problemas con las harinas y almidones usualmente

utilizados, ya que estos imparten sabores que no son apetecidos por los consumidores. La harina de arroz, por su sabor neutral y color pálido es una de las más utilizadas (Osborn & Morley, 2016).

Para lograr las características en los productos libres de gluten, se deben utilizar harinas refinadas, almidones y grandes cantidades de azúcares y grasa, es por lo que los consumidores de estos productos presentan deficiencias nutricionales, principalmente en proteínas, fibra dietética, minerales y vitaminas. Por lo cual es importante mejorar la calidad de estos productos (Osborn & Morley, 2016; Jnawali *et al.*, 2016; Gobbetti *et al.*, 2018 & Hensel, 2015).

b. Alta en proteína

Hoy en día nuestra sociedad está muy consciente de su salud y los alimentos que consumen, lo que ha llevado a que se estudie la ciencia de la comida y sus componentes, lo que ha ocasionado un aumento en el interés por las propiedades bioactivas de las proteínas, las cuales no solo son fuente de energía y aminoácidos para las síntesis de proteína muscular, si no también ayudan con el crecimiento y metabolismo celular. Las investigaciones han demostrado que el aumento en el consumo de proteínas contribuye a modular la respuesta anabólica y el sistema inmune; mejora la fuerza muscular, función física, salud cardiovascular, el manejo del peso y metabolismo de las grasa y glucosa (Yada, 2018 & Di Pasquale, 2007).

Las proteínas son esenciales para mantener una vida saludable, ya que son utilizadas como bloques formadores para la síntesis de enzimas, hormonas, tejidos, proteínas del sistema inmune, masa muscular, matriz ósea y otros componentes. El requerimiento de proteínas varía dependiendo de la edad, peso, género, estado físico (embarazo, enfermedad y condición física) y el ambiente; pero en forma general se recomienda un consumo diario de 0,8g por kilogramo de peso corporal (g/Kg/día); para las poblaciones en riesgo se recomienda aumentar a 1g/kg/día (Yada, 2018 & Osborn & Morley, 2016).

La importancia de la proteína en la dieta se debe a que esta no se acumula en el cuerpo normalmente, si no que se cuenta con una “reserva” transitoria de aminoácidos en el plasma sanguíneo, los cuales se usan para funciones estructurales y metabólicas; por su parte el exceso se utiliza como cadenas de carbono, para guardarse como glucosa o

grasa y el nitrógeno se excreta por la orina. Por lo tanto, el contenido de proteína en el cuerpo está en cambio constante, entre la degradación y síntesis; donde normalmente se mantiene constante. Pero si la síntesis es mayor a la degradación, se logra un aumento de la masa muscular, lo cual se logra con el consumo de proteína en las comidas; el problema se da cuando es mayor la degradación, esto ocurre si no se consume la cantidad que el cuerpo requiere, ocasionado la degradación de sus tejidos para obtener los aminoácidos necesarios para la formación de los compuestos esenciales (Di Pasquale, 2007 & Taylor IV, 2012).

Esto ha llevado a una demanda creciente de productos los cuales poseen un alto contenido de proteínas; según la encuesta de Nilsen en el 2015, el 32% de los consumidores buscan productos altos en proteínas; esto bajo la idea de que les da más energía (50%) y los ayuda a saciarse (48%) (Osborn & Morley, 2016). Según el RTCA de etiquetado nutricional (2012), los productos se pueden considerar fuente de proteínas al contener un mínimo de 5 gramos por porción de 100g o mL; por su parte para considerarlo alto o buena fuente de proteína debe contar con mínimo 10g en la porción.

El desarrollo de productos altos en proteína es atractivo a diferentes sectores de la población, debido a sus múltiples beneficios. En primera instancia están los deportistas, los cuales actualmente no son solo los de alto rendimiento, sino toda persona que realice una actividad física; también están las personas que buscan en la proteína perder peso; y uno de los grupos más importantes son las personas con problemas de desnutrición, siendo las más afectadas las personas adultas mayores y las personas con escasos recursos.

Los deportistas requieren alimentos altos en proteínas, para tener suficiente en su sistema y evitar un balance negativo que ocasione una degradación de la masa muscular, es por esto que la recomendación de consumo está en 1,2-1,8 g/kg/ día; cabe resaltar que este valor varía para cada persona y el tipo de deporte practicado. Muchos estudios han comprobado que el consumo de proteína por parte de los deportistas les ayuda a propiciar el crecimiento de músculos, evitar sus lesiones y mejorar el proceso de recuperación. En si no se ha definido el momento óptimo para su consumo, por lo tanto, se recomienda tanto antes como después del entrenamiento; y que la proteína este acompañada de carbohidratos, para mejorar su absorción (Yada, 2018; Clifton *et al.*, 2014; Di Pasquale, 2007 & Taylor IV, 2012).

Por su parte los productos altos en proteínas son utilizados para ayudar al control del peso, ya que hay evidencia que demuestra que un aumento moderado del consumo de proteína beneficia el manejo del peso, mediante el control del consumo de energía, ya que aumenta la saciedad, facilita la pérdida de grasa y mantiene el peso corporal después de una dieta (Yada, 2018; Clifton *et al.*, 2014 & Astrup & Geiker, 2014).

El consumo de proteína, como se mencionó anteriormente es incentivado para ayudar de forma extraordinaria al cuerpo para mantenerse saludable. Pero hay otras situaciones donde el consumo de proteína no es suficiente para cubrir las necesidades básicas, como es el caso de las personas adultas mayores o personas en condiciones de desnutrición por bajos recursos.

Al llegar a la edad adulta, a partir de los 45-55 años, se empieza a observar un declive en la masa muscular, debido a varios factores, entre ellos el sedentarismo, deterioro en el recambio de las proteínas, procesos neurodegenerativos y uno de los más importantes es el insuficiente consumo de proteína. Lo cual ocasiona muchos problemas para movilizarse y propicia muchas caídas, de las cuales es más difíciles recuperarse. Es por lo que para evitar que este declive se dé, se debe tener un consumo alto de proteínas, para evitar tener un balance negativo, el cual propicia la degradación del musculo, por lo tanto, se recomienda un consumo de 1,2-2,0g/kg/día (Yada, 2018; Loenneke *et al.*, 2016 & Gorissen *et al.*, 2015).

En países en desarrollo ha aumentado el interés de desarrollar productos altos en proteína, como solución del problema de malnutrición de la población, especialmente para niños los cuales muestran dificultades físicas y mentales, para desarrollarse (Bassinello *et al.*, 2011; Mishra & Chandra, 2012; Singh *et al.*, 1993 & Bajaj *et al.*, 1991)

Por lo que, en varios países, se han utilizado las galletas como un vector para implementar los programas de fortificación de alimentos, debido a que son productos fáciles de elaborar y fortificar. Estos programas se ven favorecidos por el concepto que se tiene de que las galletas como postres o premios, lo cual facilita el consumo de las galletas fortificadas, principalmente por los niños (Farzana & Mohajan, 2015; Manley, 2011 & Pérez *et al.*, 2008).

Al adicionar proteínas a las galletas estas actúan comúnmente como agentes estructurales, logrando así aumentar las propiedades de textura, consistencia y estabilidad del producto final. (Phongthai *et al.*, 2017).

En la actualidad hay gran cantidad de investigaciones, donde se trata de fortificar las galletas con diferentes fuentes de proteínas, siendo las más comunes, suero, soya, caseína, legumbres, o con fuentes emergente, como los pseudocereales y granos ancestrales; o mezclas de ambas. Los resultados obtenidos varían según el tipo de fuente de proteína, pero se logra aumentar la calidad nutricional de las galletas, además de que normalmente se observa un aumento en la dureza, una disminución del diámetro y con resultados variables en la aceptabilidad de las galletas (Rababah *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2008; Bassinello *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2015 & Mann *et al.*, 2016).

3.4. Deterioro de las galletas en el almacenamiento

Durante el almacenamiento de los productos de panadería, entre ellos las galletas, estos empiezan a experimentar un proceso, conocido como el añejamiento o pérdida de la frescura aparente; el cual varía según el tipo de producto (Subramaniam, 2016 & Skibsted *et al.*, 2010).

En el caso de las galletas, sus características únicas, ocasionan que este proceso sea muy diferente al de los demás productos, ya que, en lugar de presentar un endurecimiento, debido a la retrogradación del almidón, las galletas sufren de un ablandamiento de su textura, por absorción de humedad. Además de que las galletas son los únicos productos de panadería con una vida útil larga y una actividad del agua lo suficientemente baja, para que se presente primero el proceso de oxidación de grasas, que el deterioro microbiológico (Subramaniam, 2016 & Kilcast & Subramaniam, 2011).

a. Absorción de agua del ambiente

En todos los productos de panadería, hay una relación directa entre su contenido de humedad y su percepción de frescura; en el caso de las galletas, entre menos humedad presente, más frescas se consideran (Subramaniam, 2016 & Kilcast & Subramaniam, 2011).

La mayoría de las galletas se caracterizan por ser productos pequeños y delgados (<10 mm), que además presentan un bajo contenido de humedad (<5%) y actividad del

agua ($<0,5$); esto hace que su textura después del horneado sea dura y crujiente. La pérdida de cualquiera de sus características ocasiona un cambio en las galletas, que lleva al rechazo por parte de los consumidores (Subramaniam, 2016; Kilcast & Subramaniam, 2011 & Skibsted *et al.*, 2010).

Debido a su bajo contenido de humedad y a_w ; las galletas absorben la humedad presente en el ambiente, debido a la tendencia de estabilizarse o equilibrarse con él; esto provoca un ablandamiento de su textura. Es por lo que se suelen empacar con películas impermeables, para evitar la entrada de humedad y así conservar todas sus propiedades por más tiempo. Cabe mencionar que no solo la estabilización con el ambiente ocasiona este fenómeno, sino que la presencia de ingredientes sin disolver o recristalizados, ocasionan un efecto humectante, ya que estos buscan absorber agua de los alrededores (Skibsted *et al.*, 2010).

Uno de los problemas que se presenta en las galletas por el movimiento de humedad es el “checking”, el cual ocasiona quebraduras o grietas en las galletas, sin haber experimentado una fuerza suficiente para causar el daño; esto ocurre principalmente en galletas con bajo contenido de azúcar y grasa. Debido a que la humedad se mueve del centro húmedo a su cubierta seca, causando cierto estrés en la estructura de la galleta, lo que las lleva a agrietarse o quebrarse. Este problema es más importante a la hora del empaque y transporte, por lo tanto, se requiere modificar las condiciones de horneado, de modo que se utilicen temperaturas menores, por mayor tiempo (Subramaniam, 2016; Skibsted *et al.*, 2010; Kilcast & Subramaniam, 2011 & Cauvain, 2017).

b. Crecimiento de microorganismos

Generalmente los productos de panadería presentan deterioro microbiológico, debido a la formación de mohos y levaduras durante los primeros días de su almacenamiento; pero este problema no suele afectar las galletas (Subramaniam, 2016 & Kilcast & Subramaniam, 2011).

Las galletas cuentan con una actividad del agua muy baja (0,3-0,5), la cual inhibe el crecimiento de microorganismos; como se observa en la Figura 1, el a_w requerido por los mohos y levaduras para su crecimiento (0,65-0,9) están muy lejos del presente en las galletas. La presión osmótica del medio inhibe el crecimiento de cualquier tipo de microorganismo (Prakash *et al.*, 2016); es por esto que las galletas pueden tener una vida

útil mayor a los demás productos de panadería, sin requerir el uso de preservantes (Subramaniam, 2016; Kilcast & Subramaniam, 2011 & Skibsted *et al.*, 2010)

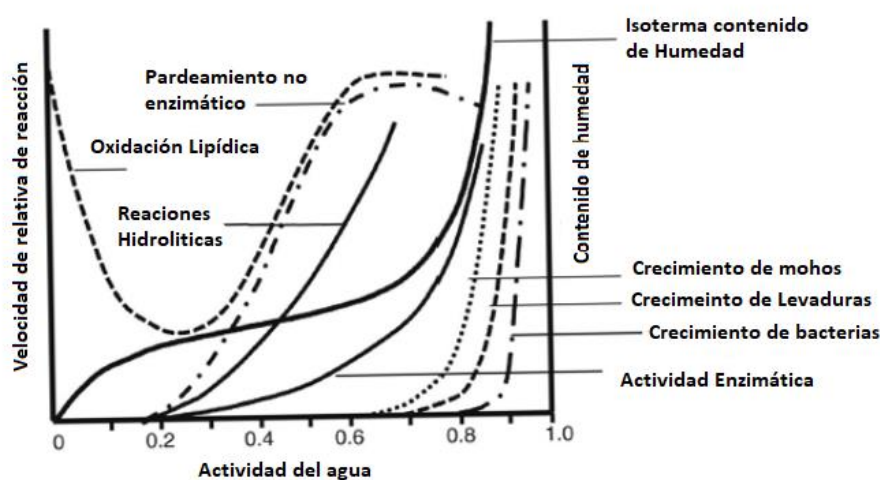


Figura 1. Representación gráfica de como la actividad del agua, afecta varios procesos degradativos de los alimentos (Prakash *et al.*, 2016)

c. Oxidación de las grasas

La oxidación lipídica ocurre cuando los dobles enlaces de los ácidos grasos son atacados por el oxígeno, hidrógeno o enzimas; el mecanismo general involucra tres pasos, la iniciación, propagación y terminación, ocasionando la formación de hidroperóxidos los cuales son compuestos inestables que se descomponen en aldehídos, cetonas y alcoholes, los cuales son volátiles provocando olores y sabores extraños en los productos. Además de los cambios sensoriales, la oxidación ocasiona pérdida de vitaminas, alteración del color, degradación de proteínas e incluso puede formar sustancias tóxicas (Subramaniam, 2016 &).

Como se mencionó anteriormente las galletas son productos de larga vida útil, bajo aw, con un alto contenido de grasas en su formulación y una gran superficie expuesta, lo que ocasiona que la oxidación de lípidos sea una posible causa de deterioro en estos productos; se puede observar en la Figura 1, que la actividad del agua en la cual se ubican las galletas es propicia para que se lleven a cabo estas reacciones (Hu & Jacobsen, 2016).

Para evitar este tipo de reacciones se deben de utilizar grasas saturadas o antioxidantes en la formulación, entre ellos el BHA y BHT. De igual forma el empaque es muy importante, por lo tanto, se debe utilizar uno que minimice el contacto con el oxígeno y la luz; siendo los metalizados los más recomendados (Hu & Jacobsen, 2016).

4. Métodos de análisis

4.1. Actividad del agua (aw)

La actividad del agua es un parámetro que describe que tan “libre” está el agua dentro de los alimentos, por lo tanto, es una medida de su habilidad para actuar como solvente y contribuir a las reacciones químicas y bioquímicas que se llevan a cabo en la comida. Esto hace que el aw se defina como:

$$a_w = \frac{p}{p_\theta}$$

Donde p es la presión parcial del agua sobre el alimento en el equilibrio y p_θ es la presión parcial del agua pura en el equilibrio a la misma temperatura. El aw se puede relacionar a la humedad relativa en equilibrio del ambiente (ERH) con la siguiente ecuación:

$$a_w = \frac{ERH}{100\%}$$

La actividad del agua es una medida adimensional, que va de 0 (no hay agua o está completamente unida) a 1 (agua pura o totalmente libre) (Prakash *et al.*, 2016; Subramaniam, 2016; Robertson, 2009 & Eskin & Robinson, 2000).

El contenido de agua de un alimento tiene una relación única con su aw; en un alimento con un contenido de agua bajo, su agua está fuertemente unida a la superficie de los compuestos polares, y por lo tanto inaccesible. Conforme aumenta el contenido de agua, esta se encuentra menos asociada con la matriz y está libre para participar en los procesos degradativos (Prakash *et al.*, 2016). La diferencia entre el aw de un producto y la humedad relativa del ambiente que lo rodea determina si el alimento gana o pierde humedad durante el almacenamiento. La migración de humedad en los alimentos causa deterioro en la textura y propicia reacciones químicas de deterioro y cambia la estabilidad molecular, todo esto limita la vida útil del producto (Subramaniam, 2016).

Existen varias instrumentos o técnicas para medir el aw, entre ellos los higrómetros (de pelo o polímero, eléctrico y punto de rocío), depresión del punto de congelación, termopar psicrómetro y el método de los microclimas; su escogencia varía en la precisión y tiempo de respuesta requerido (Nollet, 2004).

4.2. Análisis de Textura de galletas y su masa

La textura se puede definir como la manifestación sensorial y funcional de las propiedades estructurales, mecánicas y superficiales de los alimentos, detectada mediante los sentidos de visión, oído, tacto y kinestésicos (Chen & Rosenthal, 2015). La textura es importante, ya que esta define las cualidades a la hora de comer, el sabor y la vida útil (Cauvain, 2012).

La textura de los alimentos se origina de su estructura, desde el nivel molecular a la microestructura hasta llegar al nivel macroscópico. La sensación de la textura de un alimento depende de cómo su estructura se deforma o quiebra, cuando es consumido; es por esto que cualquier factor, entre ellos la interacción entre ingredientes, condiciones de procesamiento, empaque y almacenamiento, que inflencie las propiedades, afectando su textura (Chen & Rosenthal, 2015).

Los productos sólidos, con bajo contenido de humedad, como las galletas, tienen baja resistencia a la deformación o fractura, por lo tanto, las pruebas de ruptura son las mejores para caracterizar este tipo de productos. Con estos análisis se logra determinar, la dureza, la cual corresponde a la fuerza máxima a la cual una muestra se rompe, quiebra o desmorona (Cruz *et al.*, 2014 & Kilcast, 2013).

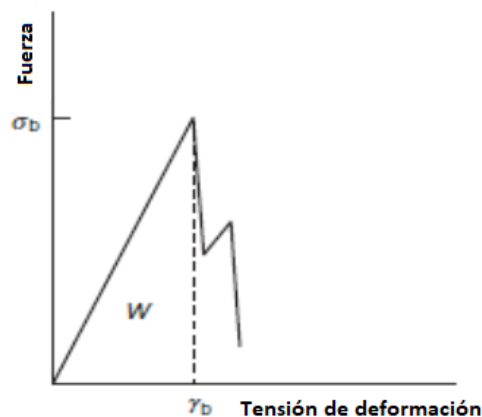


Figura 2. Gráfico típico de una prueba de ruptura para un alimento sólido (Chen & Rosenthal, 2015).

En la Figura 2, se puede observar una curva típica en una prueba de ruptura, la fuerza (estrés) aumenta rápidamente, hasta llegar a un máximo (dureza), a la cual se fractura. El área debajo de la curva es una estimación del trabajo requerido para quebrar el alimento. La fuerza y el esfuerzo al que se quiebra el alimento son dos parámetros

cuantificables, que tienen correlación directa a la experiencia sensorial de este tipo de alimento (Chen & Rosenthal, 2015).

Para determinar las características de textura de la masa cruda se requiere utilizar un método de medición diferente, el más adecuado para la masa de las galletas es el análisis del perfil de textura (TPA); en el cual se lleva a cabo una compresión, hasta que el material se empieza a romper o dañar (primer mordisco), después la fuerza se retira gradualmente, se le brinda un tiempo de relajación para volver a comprimir (segundo mordisco) hasta que el material se dañe. Una curva típica de este tipo de pruebas es la mostrada en la Figura 3 (Cruz *et al.*, 2014 & Kilcast, 2013)

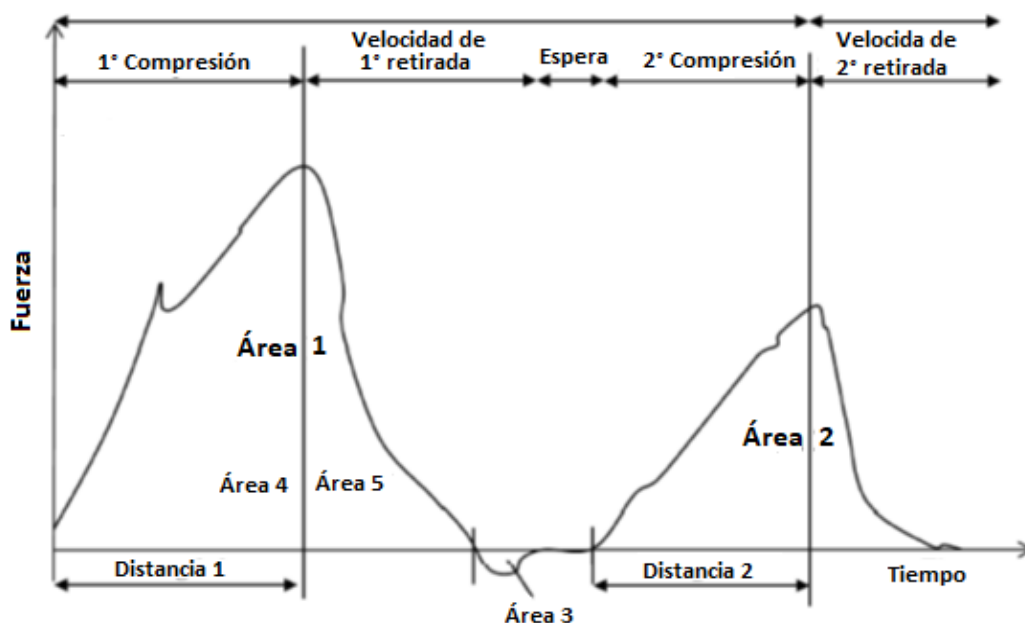


Figura 3. Gráfico típico de un TPA (Cruz *et al.*, 2014)

A continuación, se detallan los parámetros que se logran determinar con un análisis de TPA:

- Dureza o Firmeza: es la fuerza necesaria para llevar a cabo cierta deformación o la fuerza necesaria para comprimir la comida completamente con las muelas. Y para su medición se relaciona con la fuerza máxima del primer mordisco.
- Elasticidad: mide que tan bien un producto recupera su forma original después de una deformación. Y se representa como la altura que el alimento recupera durante el tiempo entre mordiscos.
- Adhesividad: es la medida del trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie de la muestra y se asume que es una medida de qué tanta

adhesividad presentara la muestra al paladar o lo dientes. Se calcula como el área negativa entre el primer y segundo mordisco (Área 3).

- Cohesividad: es la medición de las fuerzas internas que componen la muestra y la mantienen unida y qué tan bien la estructura del producto resiste una segunda deformación, con relación a cómo soportó la primera compresión (A_2/A_1).
- Masticabilidad: es la medida de la energía requerida para masticar un producto semisólido, hasta que esté listo para tragar (dureza* cohesividad* elasticidad).
- Gomosidad: es la medida de la energía requerida para desintegrar una muestra hasta que esté lista para tragar (dureza*cohesividad) (Cruz *et al.*,2014 & Yahia, 2019)

4.3.Dimensiones de las galletas

Durante el horneado se da la formación de CO₂ y vapor, la masa experimenta expansión para finalmente transformarse en una masa sólida. La expansión de las galletas durante el horneado depende del contenido de agua en la masa, que este libre para actuar como solvente y la fuerza de la masa. Una buena galleta permite la expansión sin que su estructura sufra deformación o colapsarse. Por lo tanto, se utilizan como parámetros de calidad, las mediciones de ancho (A), altura (H) y se calcula el factor de expansión de las galletas, como la razón entre ambos parámetros (A/H) (Kilcast, 2013).

4.4.Medición de color

El color es el resultado de la radiación visible produciendo un estímulo en la retina, la cual es transmitida al cerebro, a través del nervio óptico. El color es un parámetro de calidad de los alimentos, ya que es el primer punto de contacto con los consumidores, incluso antes de que entre en la boca. La percepción del color nos permite detectar ciertas anomalías o defectos presentes en el alimento. Debido a que el color tiene esta asociación con factores de calidad como la frescura, madurez y seguridad alimentaria, tiene un rol muy importante en la aceptación por parte de los consumidores (Kilcast, 2013 & Best, 2017).

Para la medición de color la Comisión Internacional de l'Eclairge (CIE), definió el color en valores triestímulos, X(rojo), Y(azul), y Z(verde); los cuales denotan una mezcla de colores primarios. Según esto se han establecido varios espacios de color, en los cuales

cada color se define como un punto en un sistema continuo tridimensional. Los instrumentos de medición como los colorímetros, espectrofotómetro y espectrorradiómetro, se basan en estos sistemas para realizar sus mediciones (Kilcast, 2013; Choudhury, 2014 & Yada, 2018).

El sistema CIE Lab como se observa en la Figura 4, establece la L^* como luminosidad, la cual está ubicada en el eje vertical, con valores que van de 100 para blanco, hasta 0 para negro. El eje horizontal a^* , va de valores positivos para el rojo, hasta los negativos para el verde. Y el eje horizontal b^* , de valores positivos para el amarillo, hasta los negativos para el azul (Kilcast, 2013; Best, 2017; Choudhury, 2014 & Yada, 2018).

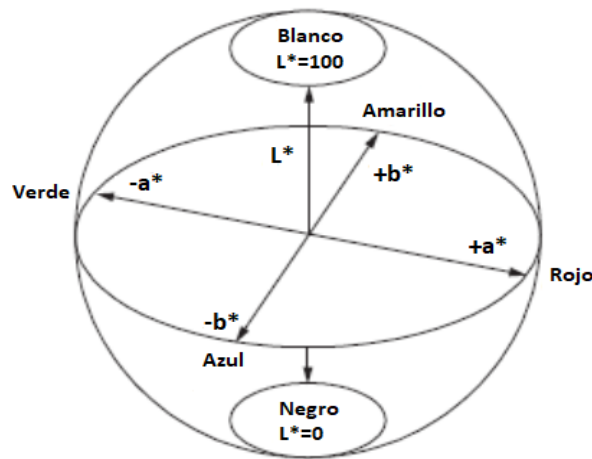


Figura 4. Espacio de color CIE Lab (Yada, 2018).

Se han desarrollado espacios, los cuales calzan mejor con las definiciones establecidas por las personas, entre ellos está el HSL, el cual define los colores en tono, saturación y luminosidad; para ello se basa en los parámetros L^* , a^* y b^* antes mencionados. El tono corresponde a la medición de la distancia (ángulo) del color en medición con respecto al eje del rojo, se calcula como el arco tangente de (b^*/a^*) . Al expresarlo como un ángulo tiene una amplitud de 360° , siendo el color rojo representado entre $350-360^\circ$ y $0-35^\circ$; anaranjado ($35-70^\circ$), amarillo ($70-105^\circ$), verde ($105-195^\circ$), azul ($195-285^\circ$) y el violeta ($285-350^\circ$). La saturación es la medición de la cantidad del color, definido como la raíz de a^2+b^2 . La luminosidad se relaciona con la intensidad radiante por unidad de área, por la sensibilidad espectral asociada a la sensación de brillo de la visión humana (L^*) (Kilcast, 2013 & Choudhury, 2014).

4.5. Análisis sensorial (agrado de los consumidores)

La evaluación sensorial es la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar la reacción a las características de los alimentos y materiales, tal y como son percibidas por los sentidos de vista, olfato, gusto, tacto y oído (Nollet & Toldra, 2015).

Para que un producto sea exitoso comercialmente, los deseos y demandas de los consumidores con respecto a las propiedades sensoriales deben ser satisfechos, en primera instancia; es por lo que los análisis sensoriales son muy utilizados para el desarrollo de nuevos productos (O'Sullivan, 2017).

Hay dos enfoques principales para las pruebas con consumidores, la medición de la preferencia o la aceptación. En las pruebas de preferencia, los consumidores deben elegir un producto, con respecto a otro o más. Por su parte para la aceptación los consumidores califican su agrado del producto en una escala. Usualmente se aplica una de aceptación de varios productos y después se acomodan por agrado según las calificaciones obtenidas (Nollet & Toldra, 2015).

En las pruebas de aceptación, los consumidores brindan una calificación de su agrado general, mediante una respuesta hedónica, donde se evalúa qué tan agradables son las características como el sabor, olor y textura; y en última instancia su impresión general del producto (Andersen *et al.*, 2019 & O'Sullivan, 2017).

Para este análisis se deben utilizar consumidores, sin ningún tipo de entrenamiento sensorial, preferiblemente que consuma el producto o al menos lo conozca. Entre mayor sea el número de participantes (≥ 100), mayor es la confiabilidad de los datos obtenidos (O'Sullivan, 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Localización

Las actividades necesarias para la ejecución de este proyecto se realizaron en las instalaciones de la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio (San Pedro, Montes de Oca, San José). La estabilización del salvado de arroz y elaboración de las galletas se llevó a cabo en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). La extracción de la proteína del salvado de arroz y los análisis fisicoquímicos de ambos productos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y en el Laboratorio de Química del CITA. Las pruebas sensoriales se efectuaron en el Laboratorio de Sensorial de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Por su parte los análisis microbiológicos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del CITA.

2. Materia Prima

Las materias primas requeridas en la elaboración de las galletas libres de gluten que se analizaron en este proyecto de investigación se enlistan en el Cuadro I.

Cuadro I. Información de las materias primas utilizadas para la elaboración de galletas libres de gluten.

Ingredientes	Marca	Ingredientes
Harina de Arroz	JINCA FOODS	Harina de Arroz
Harina de Yuca	JINCA FOODS	Harina de Yuca
Margarina	Numar	Aceite vegetal refinado, agua, sal, monoglicéridos (emulsificantes), sólidos lácteos, betacarotenos (colorante natural y provitamina "A"), lecitina de soya, benzoato de sodio y sorbato de potasio al 0,1% máx. (preservantes).
Azúcar blanco	Doña María	Sacarosa 99,5% min.
Polvo de Hornear	Rumford	Almidón de maíz, bicarbonato de sodio y Fosfato monocalcico.
Huevo	Nutri Huevo	Huevos
Esencia de Vainilla	Vainol	Agua purificada, azúcar, alcohol (etanol 95%), color caramelo natural, vainillina y etilvainillina.
Esencia de Naranja	Vainol	Agua, alcohol (etanol 95%), aceite esencial de naranja.

3. Pruebas preliminares

3.1 Selección del método de extracción de la proteína

Se realizó una revisión bibliográfica de los diferentes métodos de extracción de proteínas del arroz y el salvado. Se hizo evidente que los métodos alcalinos y enzimáticos son los más estudiados y utilizados a nivel industrial (Amagliani *et al.*, 2017 a; Phongthai *et al.*, 2016 a). Por su parte el método alcalino es sencillo de implementar y los reactivos son seguros y económicos, además de presentar gran capacidad para ser escalado a nivel industrial (Mann *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012).

Con la información recopilada se realizó una comparación de los métodos, y esto determinó que todos presentaban una metodología similar, con pequeñas diferencias en los reactivos y su concentración o las condiciones de los diferentes procesos a realizar. Esto llevó a integrar un procedimiento con los pasos para obtener un buen rendimiento, pero que al mismo tiempo fueran compatibles con el material y equipo del laboratorio y Planta Piloto del CITA. Se realizaron diferentes pruebas con el salvado con el objetivo de mejorar las condiciones de la extracción, lo cual llevó a leves modificaciones del método (Figura 5).

3.2 Elección del pH del extracto de proteína del salvado de arroz

Durante las pruebas preliminares se observó que el extracto obtenido presentaba diferencias de rendimiento, consistencia y color, al cambiar del pH de 4 a 7 (Figura 5). La neutralización se utiliza principalmente para obtener un extracto con un pH más acorde para su posterior utilización en alimentos y para separar los compuestos no proteicos presentes en el extracto, pero durante este proceso también se da la pérdida de gran parte la proteína soluble, ya que la máxima solubilidad de esta se encuentra en el rango de pH de 4-7 (Amagliani *et al.*, 2017a).

Esto condujo a que se realizaran pruebas con ambos extractos (pH 4 y 7), para evaluar si los compuestos no proteicos y la proteína soluble tienen un efecto en la funcionalidad del extracto.

Se elaboraron galletas con diferentes grados de sustitución de la mezcla de harinas (1%, 10% y 15%) con ambos extractos y un control, las galletas fueron degustadas y analizadas con respecto a su textura, por 8 personas familiarizadas con el consumo de

estos productos. Se obtuvo que no se observaron diferencias entre las galletas con extractos con diferentes pH, en ninguna de las sustituciones.

Debido a estos resultados se decidió realizar un análisis proximal de los extractos, para seleccionar el extracto que presentara el mayor contenido de proteína; los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo (Figura 21).

Con base en los resultados obtenidos se eligió el extracto de proteína de pH 4, el cual además de presentar el mayor contenido de proteína, también requiere menos reactivos y recursos, para obtener un mayor rendimiento.

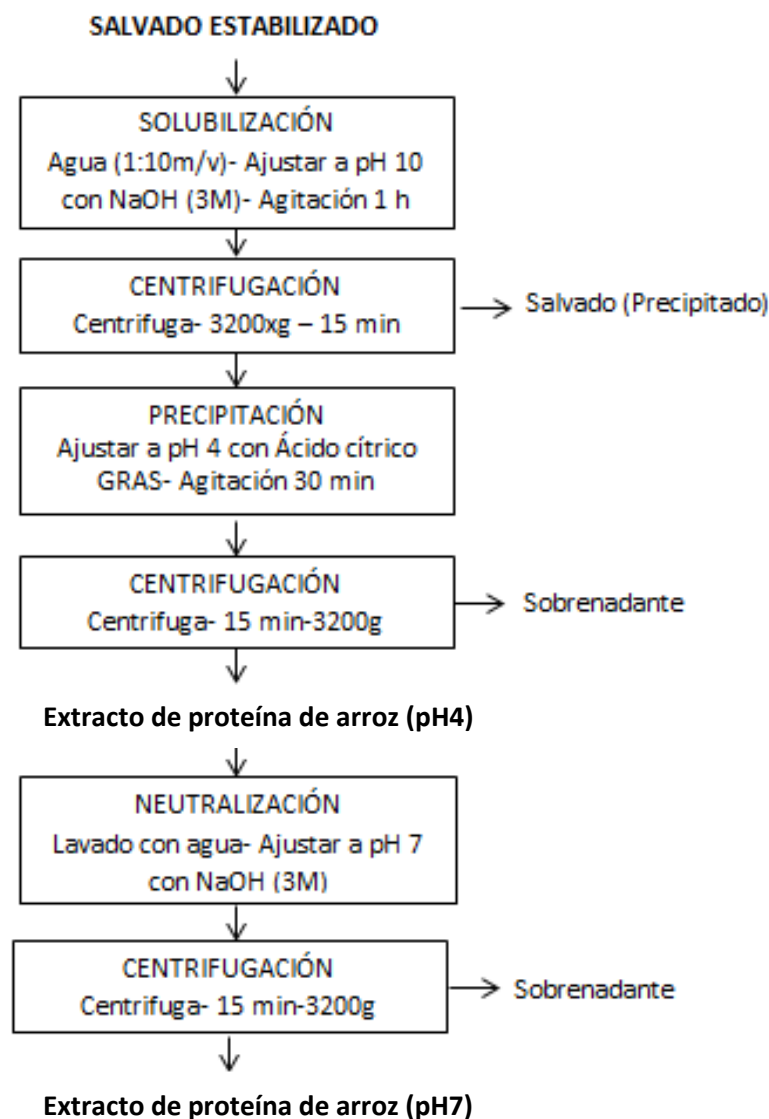


Figura 5. Método alcalino de extracción de la proteína del salvado de arroz

3.3 Elección de los porcentajes de sustitución:

De la prueba preliminar con ambos extractos (pH 4 y 7) se evaluaron las sustituciones de 1%, 10% y 15%; con respecto a su textura sensorial, color, sabor, fracturabilidad y facilidad de desmoldado de las galletas. En el caso de la sustitución de 1% no se lograron observar diferencias en los parámetros analizados, con respecto al control, por lo tanto, se decidió no seguir estudiando esta sustitución.

Las demás sustituciones (10 y 15%) presentaron mejoras en la textura, sin afectar el sabor de las galletas, por lo tanto, se eligieron ambos porcentajes. Se decidió no seguir aumentando el porcentaje, ya que con el 15% se empezó a sentir el sabor del salvado.

Estas galletas fueron almacenadas a temperatura ambiente en bolsas de polipropileno y se observaron diferencias en la crujencia y sabor al mes en las galletas control; sin que se observara crecimiento de ningún hongo o levadura, por lo que se decidió llevar a cabo un estudio de almacenamiento por un plazo un poco mayor, para estudiar los cambios que se presentaban en todas las galletas durante el tiempo de almacenamiento.

Una vez terminada la extracción del extracto de proteína del salvado de arroz (EP) para las pruebas definitivas del proyecto, se decidió hornear galletas con las sustituciones elegidas e inclusive mayores; y se encontró que concentraciones mayores presentaban buenas características de textura, por lo tanto, se decidió realizar modificaciones en la formulación para ayudar a enmascarar el sabor del EP, para esto se utilizó chocolate amargo, esencia de limón y naranja. Las galletas obtenidas con el chocolate amplificaban el sabor extraño, por lo tanto, se eliminó como opción; por su parte ambas esencias ayudaban a enmascarar el sabor, principalmente la de naranja, es por esto que se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de la esencia de naranja y vainilla hasta lograr una galleta con sabor balanceado y con esta formulación se decidió aumentar las sustituciones a 15%, 25% y 30%.

4. Proceso de obtención del extracto de proteína del salvado de arroz

4.1 Estabilización del salvado

En este proyecto se requiere en primera instancia estabilizar el salvado para evitar su rancidez, debido al alto contenido de grasa. Para esto se colocó en una marmita y se adiciono etanol al 95% en una relación 1:5 m/v, la mezcla se deja a temperatura ambiente con agitación ocasional durante 2 horas, posteriormente se llevó a cabo un prensado de la mezcla en la prensa hidráulica. El salvado estabilizado se secó en el secador Excalibur de la Planta Piloto del CITA, utilizando una temperatura de 30°C hasta alcanzar una humedad menor al 11%.

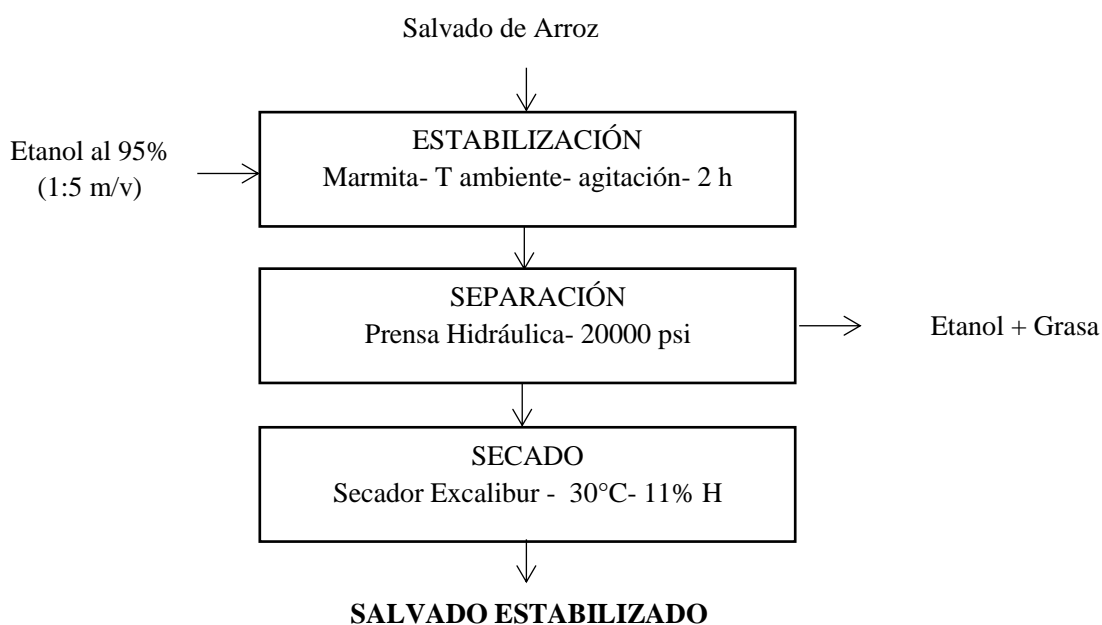


Figura 6. Proceso de estabilización del salvado de arroz para la posterior extracción de la proteína

4.2 Extracción de la proteína del salvado de arroz

Para realizar la extracción se solubilizó el salvado estabilizado en agua destilada en una relación 1:10 m/v, a la mezcla se le ajustó el pH a 10 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) grado alimentario a 3 mol/L. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante una hora con agitación constante, terminado el tiempo se procedió a centrifugar

la mezcla a 3200x g por 15 minutos y se recolectó la solución proteica, a la cual se le ajustó el pH a 4-4,5 con una solución de ácido cítrico grado alimentario al 3 mol /L. Para asegurar la precipitación de la proteína se dejó en agitación por 30 min; y se procedió a centrifugar a 3200x g por 15 minutos. Se separó el sobrenadante y se obtiene una pasta la cual corresponde al extracto de proteína del salvado de arroz a pH 4. Se procedió a congelar a -40°C, para luego liofilizarlo. El liofilizado obtenido se almacenó en bolsas metálicas a temperatura ambiente hasta su uso en los diferentes análisis requeridos.

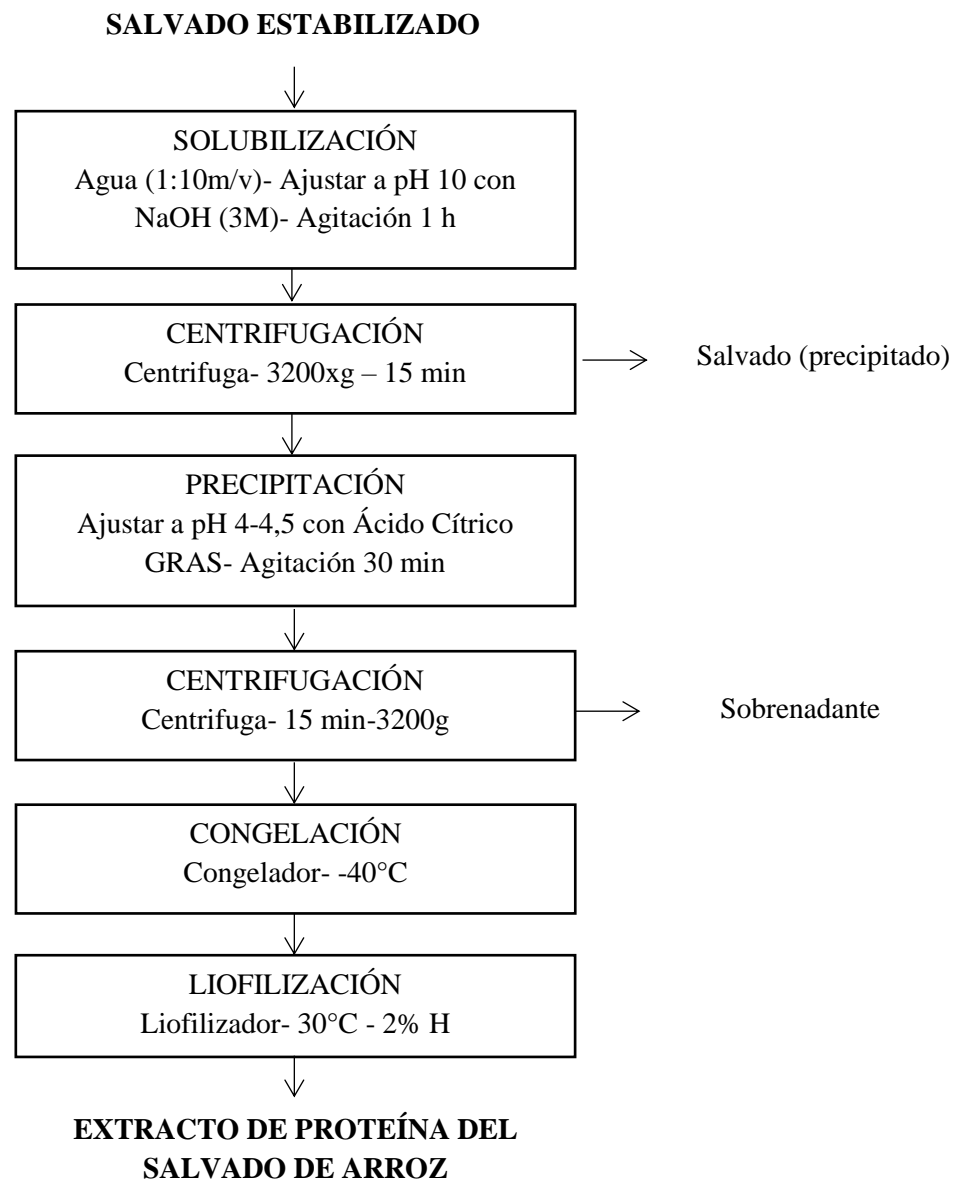


Figura 7. Proceso de obtención del extracto de proteína del salvado de arroz

4.3 Análisis del extracto de proteína del salvado de arroz (EP) y su funcionalidad

El EP obtenido se analizó por métodos fisicoquímicos para determinar su funcionalidad, los cuales se encuentra especificados en el apartado 8.1. Además, se enviaron muestras al Laboratorio de Química del CITA para realizar análisis proximal de la composición del extracto. Este análisis proximal estuvo compuesto por: Porcentaje de Proteína (979.09 AOAC), Porcentaje de Humedad (925.09 AOAC), Porcentaje de Cenizas Totales (923.03 AOAC), Porcentaje de Grasa (920.85 AOAC), Fibra Dietética (985.29 AOAC) y se determina el contenido de carbohidratos por diferencia (AOAC Internacional).

5. Proceso de elaboración de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

5.1 Formulación base de las galletas

La formulación base que se utilizó en este proyecto corresponde a una variación de la formulación de mayor aceptación propuesta por Susana Mora (2013) en su proyecto de investigación. En el siguiente cuadro se presenta la formulación de las galletas, la cual se denominó tratamiento control en este proyecto.

Cuadro II. Formulación base de las galletas libres de gluten

Ingrediente	Porcentaje Panadero (%) *
Harina Yuca	50,0
Harina de Arroz	50,0
Manteca	30,0
Azúcar	30,0
Polvo de hornear	0,6
Huevo	8,9
Esencia de Vainilla	6,2
Agua	8,7
Esencia de Naranja	7,9

* El porcentaje panadero las cantidades de todos los ingredientes se calculan a partir del peso de la harina, que representará el 100%.

5.2 Descripción del proceso de elaboración de las galletas control

El proceso de elaboración de las galletas libres de gluten se muestra en la Figura 8. Se inicia con el pesado de todos los ingredientes antes mencionados, para luego proceder a mezclar los ingredientes secos (harina de yuca y arroz, azúcar y polvo de hornear) en la batidora por 3 minutos o hasta obtener una mezcla homogénea. A esta se le adicionó los ingredientes faltantes, y se dejaron mezclando por tres minutos más en la batidora, si no se logra obtener una masa compacta, se termina de amasar manualmente.

La masa obtenida se dejó en reposo en refrigeración por 12 a 15 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se procedió al moldeado, el cual se realizó con ayuda de una laminadora, en la cual se adelgazó la masa hasta obtener una lámina de 4 mm de grosor, para proceder a cortarla con un cortador de galletas con un diámetro de 3,7 cm. Las galletas se colocaron en una bandeja sobre papel encerado y se hornean en un horno de convección por 11 minutos a 140°C.

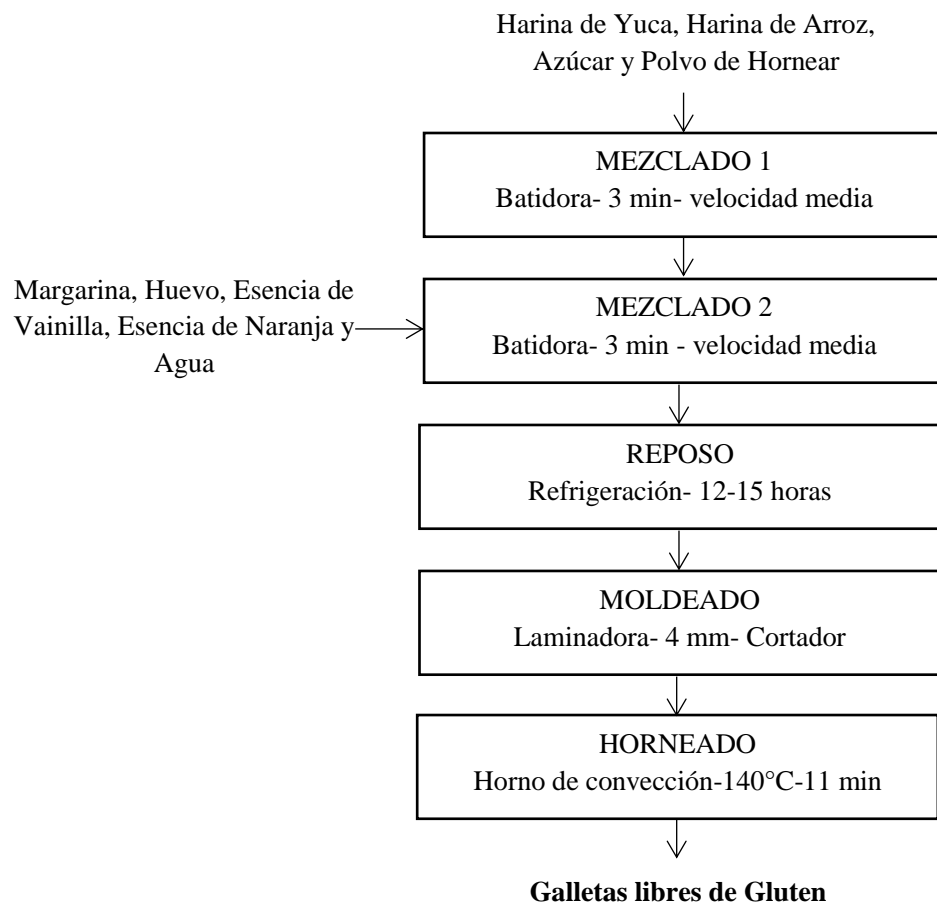


Figura 8. Proceso de elaboración de las galletas libres de gluten

5.3 Sustitución de las galletas libres de gluten con EP

Se elaboraron galletas libres de gluten, con una sustitución de la mezcla de harinas por el extracto de proteína del salvado de arroz (EP), en los siguientes porcentajes 15%, 25% y 30%, manteniendo constante el porcentaje de los demás ingredientes. El EP se adicionó al inicio del proceso con los ingredientes secos.

5.4 Análisis de las galletas libres de gluten sustituidas con el EP

Tanto a las galletas sustituidas como al control, se les determinaron sus características fisicoquímicas: porcentaje de humedad, actividad del agua (aw), color, dimensiones y una prueba de corte; además se analizaron sensorialmente, mediante una prueba de consumidores. Los procedimientos utilizados para realizar los métodos antes mencionados se encuentran en el apartado 8.2. de este documento.

6. Estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Se seleccionó la galleta con la sustitución de EP, que presentó la mayor aceptación y mejores condiciones de producción, para el estudio de almacenamiento; esto junto con la galleta control.

Las galletas se almacenaron en una cámara de vida útil de la Planta Piloto del CITA, a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando bolsas de Polipropileno (PP) de 7 cm x 15 cm, en las cuales se empacaron 4 galletas por paquete. El almacenamiento se realizó durante 45 días, que fue el tiempo determinado durante las pruebas preliminares. En los días 1, 6, 10, 15, 21, 27, 31, 37, 41 y 45, se realizaron los análisis fisicoquímicos (humedad, aw y textura) explicados en el apartado 8.2. de este documento. Así como una prueba microbiológica de recuento total de mesófilos aerobios y mohos y levadura (apartado 8.3.) el primer día del almacenamiento y otro análisis en el momento en que se detecte crecimiento de microorganismo en los productos.

7. Diseño experimental y análisis estadístico

Para la realización de este proyecto de investigación se utilizó un solo lote de salvado, ya que la variabilidad propia del salvado no forma parte de los objetivos, sino la funcionalidad de la proteína que se logra extraer. Por lo tanto, el lote completo se estabilizó, para luego proceder a realizar la extracción de la proteína en el laboratorio de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

Debido a limitaciones relacionadas con la capacidad del equipo y el tiempo que requiere el proceso de extracción, se extrajo el EP por varios días, el producto liofilizado se almacenó en bolsas metálicas, hasta obtener la totalidad del extracto. Una vez reunida todo el extracto, este se mezcló y aleatorizó para realizar las diferentes repeticiones del experimento.

7.1 Análisis del extracto de proteína del salvado de arroz

Para cumplir con el objetivo planteado, se realizaron los análisis estipulados en el apartado 8.1. de este documento, con tres repeticiones para obtener resultados que permitan obtener los promedios y errores estándar de las distintas variables respuestas (Porcentaje de Humedad, Porcentaje de Proteína, Porcentaje de Grasa, Porcentaje de Cenizas Totales, Porcentaje de Fibra Dietética, Porcentaje de Carbohidratos, Solubilidad, Absorción de Agua, Absorción de Aceite, Capacidad formación de Espuma, Estabilidad de la Espuma, Capacidad de Emulsificación y Estabilidad de la Emulsión).

7.2 Análisis de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Para evaluar el efecto del grado de sustitución del EP en las galletas libres de gluten se empleó la sustitución como un factor nominal de 4 niveles, como los que se observan en el Cuadro III. Se aplicó un diseño con bloques, siendo los bloques el día de elaboración de las tres repeticiones, ya que las condiciones en que se elaboran las galletas no van a ser las mismas y su efecto no es el que queremos estudiar.

Como variables respuesta se utilizaron el color, Aw, diámetro, altura, radio de esparcimiento, corte de galleta y agrado general de las galletas. Para su determinación se utilizaron los métodos detallados en el apartado 8.2. de este documento.

Cuadro III. Diseño experimental para evaluar el efecto del grado de sustitución del EP en las galletas libres de gluten.

Tratamiento	Grado de sustitución
1	0%
2	15%
3	25%
4	30%

Para cada variable respuesta se realizó un ANDEVA, para determinar si existen diferencias en las variables entre los tratamientos. En caso de presentarse diferencias, se aplicó un análisis de Tukey para la variable y así identificar entre cuales tratamientos hay diferencias. Mientras que para la prueba de agrado se realizó un análisis Bonferroni, para poder definir la galleta que presenta el mayor agrado, para ser utilizada en el tercer objetivo, con un $\alpha=0,05$ (95% de confianza).

7.3 Estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre las galletas libres de gluten se empleó un diseño con bloques, siendo los bloques el día de elaboración de las tres repeticiones, ya que las condiciones en que se elaboran las galletas no van a ser las mismas y su efecto no es el que queremos estudiar. Se utilizó un arreglo factorial 2^{10} , donde el factor nominal corresponde al tipo de muestra, con sus dos niveles, el control y la muestra con la sustitución de EP de mayor agrado. Por su parte el factor continuo, corresponde al tiempo de almacenamiento, con 10 puntos de medición (1, 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36, 41 y 45 días). Se realizaron tres repeticiones del experimento.

Como variables respuesta se midió el aw, humedad y corte de galleta. Para su determinación se utilizaron los métodos establecidos en los apartados 8.2. y 8.3. de este documento. Para cada variable respuesta se realizó un ANDEVA, para determinar si existen diferencias en las variables respuesta entre los tratamientos. En caso de presentarse diferencias, se aplicó un análisis de Tukey para la variable y así identificar entre cuales tratamientos hay diferencias, con un $\alpha=0,05$ (95% de confianza).

8. Métodos de Análisis

A continuación, se presentan los diferentes análisis, que se realizaron tanto al extracto de proteína del salvado de arroz (EP) como a las galletas libres de gluten, para lograr los objetivos de esta investigación.

8.1 Análisis del extracto de proteína del salvado de arroz

a. Solubilidad de la Proteína

Se utilizó una variación del método de Zhang (2012), en el cual se realizó una disolución al 1% (m/v) de la proteína del EP, a la cual se le ajustó el pH a 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, y 11,0 usando 0,1 mol/L HCl o NaOH. Las suspensiones se dejaron en agitación magnética a temperatura ambiente por 30 min, terminado el tiempo se centrifugaron a 3000xg por 30 minutos. Luego se determinó el contenido de nitrógeno en el sobrenadante con el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La solubilidad de la proteína se determinó como:

$$ISN(\%) = \frac{\text{Contenido total de proteina en el sobrenadante}}{\text{contenido total de proteina en la muestra}} \times 100\%$$

b. Capacidad de absorción de agua y aceite

Se utilizó el método de Zhang (2012), para la determinación se pesaron 0,5g del polvo del EP y se mezcló con 20 mL de agua destilada o aceite de soya en tubos de centrifuga. Se mezclaron ocasionalmente por 30 minutos, para después centrifugarla a 3000xg por 30 minutos; el sobrenadante es decantado cuidadosamente para evitar la pérdida de proteína. Se expresó como:

$$CAA = \frac{\text{Masa de } \frac{\text{agua}}{\text{aceite}} \text{ absorbida}}{\text{Masa de la proteina}}$$

c. Capacidad de formación de espuma y su estabilidad

Se utilizó el método de Zhang (2012) con unas modificaciones, se prepararon 20 mL de una disolución al 2% (m/v) de la proteína del EP (pH 3,0, 5,0, 7,0 y 9,0) en un tubo de centrifuga graduado, la cual se homogenizo, con un homogeneizador de alta

velocidad, por 3 minutos a 10000 rpm. El volumen de la espuma se midió inmediatamente después de batir (Formación de Espuma (FE) y después de 30 min a temperatura ambiente (Estabilidad de la espuma (EES)). Se expresó como:

$$FE = \frac{\text{Volumen después de batir} - \text{volumen antes de batir}}{\text{volumen antes de batir}} \times 100$$

$$EES = \frac{\text{Volumen después de 30 min} - \text{volumen antes de batir}}{\text{volumen despues de batir} - \text{volumen antes de batir}} \times 100$$

d. Capacidad de emulsificación y su estabilidad

Se utilizó el método turbidimétrico de Zhang (2012), en el cual se homogenizó, con un homogeneizador de alta velocidad, a 10,0 rpm por un minuto, 8 mL de aceite de soya y 24 mL de una solución 0,1% (m/v) de la proteína del EP (pH 3,0, 5,0, 7,0 y 9,0) para formar una emulsión. Se pipeteo 50 μ L de la emulsión del fondo del contenedor, a los 0 y 10 minutos después de homogenizar y se mezclaron con 5 mL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%. Se procedió a medir la absorbancia de la emulsión a 500 nm con un espectrofotómetro UV-VIS.

La absorbancia medida inmediatamente después de la homogenización (A_0) corresponde a la actividad emulsificante del EP y la estabilidad de emulsificación (EEm) se expresó como:

$$EEm = \frac{A_0 \times \Delta t}{\Delta A}$$

Donde ΔA es el cambio en la absorbancia de A_0 en el intervalo de tiempo definido Δt .

8.2 Análisis de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

a. Porcentaje de humedad

Se utilizó el método de la AOAC, en el cual se colocó una muestra de 2g de galleta previamente homogenizados, en una cápsula, seca y de masa conocida. La muestra en la cápsula se colocó en una estufa de convección a una temperatura de $103 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante un plazo de 5 horas. Se determinó la masa de muestra seca obtenida por diferencia y se determinó el porcentaje de humedad de la muestra.

b. Color

Para la medición instrumental de color se utilizó el colorímetro Colourflex, Hunter Lab Flex, con una iluminación D-65 y un ángulo de observación de 10° . El cual se calibró previo a las mediciones con los patrones blanco y negro. Se utilizó la escala CIE Lab, expresando el color en términos de L^* , a^* y b^* . En las capsulas se agregó la muestra de galleta, previamente maceradas, las cuales se empaquetaron para lograr uniformidad.

c. Actividad de agua (a_w)

Se utilizó el método empleado en el Laboratorio de Química del CITA de la AOAC 978.18. Para dicho método se requirió el uso del equipo AquaLab 4TE. En el cual la galleta se homogenizo y se colocó en el porta muestras del equipo, de manera que no se sobrepase la mitad de la capacidad de este. Y se deja al equipo estabilizarse con la muestra, para tomar la medición.

d. Dimensiones de las galletas

Se utilizó el método 10-50D de la AACC (2000). Se seleccionaron seis galletas de un lote, las cuales se colocaron una a la par de la otra y se midió el diámetro total; luego se rotaron en un ángulo de 90° y se midió tres veces más. El promedio de esas cuatro mediciones se dividió entre seis para determinar el diámetro promedio de una galleta. Para determinar la altura de la galleta se apilaron las seis galletas y se midió la altura; dos veces más se modificó el orden de apilamiento, para luego determinar el promedio de las tres mediciones y dividirlo entre seis para determinar la altura promedio de la galleta. El radio de esparcimiento se calculó dividiendo el diámetro entre la altura.

e. Análisis de textura

- De las galletas:

Se utilizó una variación del método aplicado en la tesis de Mora (2013) para las galletas libres de gluten. Para la medición se utilizó el Texturómetro TA.XTPlus, con el cual se aplicó a las galletas una prueba de corte con el aditamento de guillotina, empleando su lado no filoso; esto para evaluar la dureza de las galletas. Se aplicaron las siguientes condiciones para la realización de las pruebas.

Cuadro IV. Condiciones empleadas durante la prueba de textura de galletas

Variable	Condición
Velocidad Pre-Prueba (mm/s)	1,5
Velocidad de la Prueba (mm/s)	3,0
Velocidad Post-prueba (mm/s)	10,0
Modo de objetivo	Distancia
Distancia (mm)	2,0
Tipo de Gatillo	Auto(fuerza)
Fuerza del Gatillo (g)	20,0
Tipo de Prueba	Compresión

- De la masa:

Para la medición se utilizó el Texturómetro TA.XTPlus, con el cual se llevó a cabo un análisis del perfil de textura (TPA), para esto se colocó una bolita de masa de 65 gramos en un recipiente cilíndrico de 50 mm de diámetro interno; la masa se aplasto y dejó plana con un beaker; para la medición se utilizó un cilindro de 25 mm de diámetro. Mediante el análisis del TPA se obtuvieron los resultados de los siguientes parámetros: dureza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad.

Se aplicaron las siguientes condiciones para la realización de las pruebas.

Cuadro V. Condiciones empleadas durante la prueba de textura de la masa de las galletas

Variable	Condición
Velocidad Pre-Prueba (mm/s)	2,0
Velocidad de la Prueba (mm/s)	1,0
Velocidad Post-prueba (mm/s)	1,0
Modo de objetivo	Distancia
Distancia (mm)	10,0
Tiempo de espera entre compresiones (s)	20,0
Tipo de Gatillo	Auto(fuerza)
Fuerza del Gatillo (g)	10,0
Tipo de Prueba	TPA

f. Análisis sensorial de las galletas

Se realizó una prueba de agrado de las cuatro muestras, las cuales corresponden, al control y las tres formulaciones sustituidas con el EP. Se utilizó una escala hedónica de nueve puntos para determinar el agrado de los consumidores con respecto a las diferentes galletas presentadas; esto con el objetivo de determinar si hay diferencias en el agrado de las muestras al adicionar diferentes concentraciones del extracto. A los consumidores se les pidió solo comer la mitad de la galleta, ya que después de terminar las cuatro muestras, se les presentó información sobre el beneficio del consumo de proteínas y se les indicó cuales galletas estaban sustituidas con proteínas; y se les volvió a aplicar la prueba de agrado. La prueba se les realizó a 112 panelistas consumidores de galletas y se utilizó un nivel de significancia de 0,05.

8.3 Estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

a. Recuento de mohos y levaduras

Se utilizó el método que se aplica en el Laboratorio de microbiología del CITA, el cual se basa en el método de la Norma Oficial Mexicana (1994). Se inició con la homogenización de la muestra, de la cual se pesaron 25g en una bolsa estéril. Se adicionó 225 mL de agua peptonada estéril (APE) a la bolsa y se agitó en el Stomacher durante un minuto, esto corresponde a la dilución 10^{-1} . Utilizando micropipetas se tomó 1 mL de la mezcla anterior y se diluyó en 9 mL de APE (dilución 1:10). Se realizó el mismo procedimiento hasta obtener una dilución de 10^{-5} . Con cada dilución se utilizó un Vortex para la agitación y homogenización. De la dilución 10^{-1} se distribuyó 1 mL en 3 placas Petri (0,3 mL, 0,3 mL y 0,4 mL, en cada una). Para el resto de las diluciones, por triplicado se midió 0,1 mL y se esparció con un asa de Drigalski estéril en placas Petri con agar papa dextrosa acidificado a pH 3,5 para cada una de las diluciones. Las placas rayadas se incubaron a 25 ± 2 °C por 5 días. Después del tiempo de incubación se hizo un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), presentes en cada placa.

b. Recuento de Mesófilos aerobios

Se utilizó el método que se aplica en el Laboratorio de microbiología del CITA, el cual se basa en el método de Salfinger & Tortorello (2015). Se inició con la homogenización de la muestra, de la cual se pesaron 25g en una bolsa estéril. Se adicionó 225 mL de agua peptonada estéril (APE) a la bolsa y se agitó en el Stomacher durante un minuto, esto corresponde a la dilución 10^{-1} . Utilizando micropipetas se tomó 1 mL de la mezcla anterior y se diluyó en 9 mL de APE (dilución 1:10). Se realizó el mismo procedimiento hasta obtener una dilución de 10^{-5} . Con cada dilución se utilizó un Vortex para la agitación y homogenización. Usando una micropipeta se depositó 1 mL de cada dilución en cada una de 2 placas de Petri estériles identificadas. Y se adicionó aproximadamente 15 mL del Agar Estándar para recuento en placas (AST) mantenido a (45 ± 1 °C) a cada placa. Se mezcló inmediatamente la dilución de la muestra con el agar, con suaves movimientos formando un ocho. Se procedió a esperar a que el agar se solidificara, para luego invertir las placas e incubarlas a (35 ± 1 °C) por (48 ± 1 horas). Después del tiempo de incubación se hizo un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC), presentes en cada placa.

1. Caracterización del extracto de proteína del salvado de arroz

1.1. Composición química del extracto de proteína

El objetivo de esta investigación es caracterizar el extracto de proteína (EP) obtenido del salvado de arroz; y estudiar su efecto en la elaboración de galletas libres de gluten. Es por esto que en primera instancia se realizó un análisis proximal del extracto obtenido, en el Cuadro VI se presentan los resultados obtenidos.

Cuadro VI. Composición química del extracto de proteína del salvado de arroz.

Componente (g/100g)	Extracto de proteína del salvado de arroz
Humedad	1,72 ± 0,22
Proteína	45,12 ± 0,05
Grasa	43,19 ± 0,61
Ceniza	2,30 ± 0,13
Carbohidratos	7,97 ± 0,05
Fibra Dietética	5,86 ± 0,53

El EP al ser un producto liofilizado presenta una humedad muy baja, lo cual nos permitió conservarlo durante la duración del proyecto de investigación. Cabe resaltar que todos los extractos con los cuales se comparará a continuación el EP, también se encuentran liofilizados y presentan porcentajes de humedad muy bajos.

El componente más importante del extracto desde el punto de vista funcional es la proteína, el cual se encuentra en un rango muy común de los resultados obtenidos para el tipo de extracción realizada. En el caso de Yadav (2011) reportó un 37,6% y lo comparó con otras investigaciones donde sus resultados variaban entre los 23 a 41 %; lo mismo ocurre con Zhang (2012) el cual reportó un 32,9%. Por su parte Phongthai (2016b) reportó una concentración de 68,07%. También está la investigación de Kaur (2007) donde obtuvo diferentes resultados variando de los 52,46 a los 58,92 % dependiendo del tipo de variedad de salvado de arroz utilizado, un punto muy importante para tomar en cuenta a la hora de comparar los resultados.

En algunas investigaciones como las de Mannn (2016) y Jiamyangyuen (2005) tratan de optimizar el proceso de extracción, al variar distintas condiciones; por lo tanto, obtienen concentraciones de proteínas que varían entre 50 a 80%, siendo las mayores las de pH 9,5. Algo muy importante es que la concentración de proteína no se ve aumentada al utilizar pH más alcalinos (pH >11). Es por lo que, en nuestra investigación para la extracción se utilizó el pH en un rango de 9,5 a 10; para maximizar la extracción, pero también para evitar condiciones que no solo extraigan la proteína, sino también que propicien reacciones que forman compuestos no deseados (Amagliani *et al.*, 2017b).

La grasa es otro de los componentes principales del EP, la cual aporta una gran cantidad de compuestos bioactivos, como son los tocotrienoles (una forma de vitamina E), gama-orizanol, beta-sitosterol; los cuales le brindan propiedades antioxidantes, quimiopreventivas, hipolipemiantes, anti-aterogénicos y antidiabéticos. Además, esta grasa se está utilizando como alternativa de grasa alimentaria para mejorar la calidad de los productos de panadería (Gul *et al.*, 2015). Su presencia en el extracto se debe a que el proceso de estabilización no permitió extraer un mayor contenido; debido principalmente al escalamiento que se realizó cuando se llevó a cabo la prueba final; ya que en los análisis preliminares la estabilización se realizó en el laboratorio, con cantidades pequeñas de salvado y con centrifuga como método de separación; por su parte en Planta Piloto se trabajó con varios kilos al mismo tiempo y con una prensa hidráulica. Es importante resaltar que el proceso realizado en Planta Piloto si logró estabilizar el salvado, ya que el etanol utilizado además de extraer la grasa parcialmente pudo ayudar a descomponer la estructura molecular de la lipasa (Rios *et al.*, 2018), la cual es la principal causante del enranciamiento del salvado.

En la mayoría de las investigaciones se centran en determinar el contenido de proteína presente en el extracto y no en sus otros componentes, es por esto que hay pocos valores de contenido de grasa reportados. Se debe resaltar que en estas investigaciones utilizan salvado desengrasado, ya sea obtenido de una empresa de extracción de aceite de salvado o aplicando métodos de laboratorio como el Soxhlet, con reactivos como el hexano o éter de petróleo, por lo tanto, en esos casos reportan contenidos de grasa inferiores al 4% (Zhang *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015 & Yadav *et al.*, 2011). En nuestra investigación por razones de inocuidad se trabajó con alcohol al 95%.

Debido a las condiciones alcalinas utilizadas durante la extracción, como se observa en el Cuadro VI no solo se extrajo la proteína sino también cenizas, carbohidratos y fibra dietética. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Phongthai (2016b) 3,08%, 6,37 % y 6,91% en el mismo orden antes mencionado o los de Rafe (2014) 1,78%, 4,65% y reportan un 14,2 de fibra cruda. La variabilidad en estos resultados se puede deber a las variedades de arroz del que se obtuvo el salvado, así como su procesamiento y grado de molienda. La fibra por su parte suele extraerse en condiciones alcalinas, con la ventaja de poseer propiedades reológicas que benefician a los productos libres de gluten (Rafe *et al.*, 2014).

1.2. Funcionabilidad del extracto de proteína

Además de la caracterización química realizada al extracto de proteína del salvado de arroz, también se llevaron a cabo pruebas para determinar sus propiedades funcionales.

a. Absorción de agua y aceite

La absorción de agua y aceite por parte de las proteínas es muy importante en los procesos de panadería, bebidas y embutidos.

Cuadro VII. Absorción de agua y aceite del extracto de proteína del salvado de arroz.

Parámetro	Extracto de proteína del salvado de arroz
Absorción de Agua (g/g)	1,255 ± 0,004
Absorción de Aceite (g/g)	2,6 ± 0,1

En cuanto al valor de absorción de agua del EP en estudio; se observó que este valor es menor al reportado por otros investigadores, los cuales señalan valores en el rango 1,74 a 5,60 g/g; hay que tomar en cuenta que a pesar de que estos resultados son de extracto de salvado de arroz, todos presentan procesos distintos de obtención y la principal diferencia está en el contenido de grasa, ya que este componente comúnmente ronda los 2-5% en estos concentrados (Rafe & Sadeghian, 2017; Chandi & Sogi, 2007; Phongthai *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012 & Patsanguan *et al.*, 2014). Es por esto que se puede considerar que la grasa se interpone entre la proteína y el agua evitando su interacción (Sciarini *et al.*, 2013), también influye el tamaño de las moléculas de proteína,

si son pequeñas no tienen la misma capacidad de atrapar el agua en su estructura como las de mayor tamaño (Phongthai *et al.*, 2016).

La absorción de agua se ve reducida y la absorción de aceite aumentada en los concentrados de proteína liofilizados (Nadathur *et al.*, 2016). Los valores encontrados en este estudio se encuentran en el rango de valores reportados por otros investigadores (1,85 – 9,18 g/g) (Chandi & Sogi, 2007; Zhang *et al.*, 2012; Patsanguan *et al.*, 2014 & Phongthai *et al.*, 2016); y muy cercano al reportado por Patsanguan (2014) para su concentrado con extracción por microondas (2,45 g/g). A pesar de esto el valor no es tan elevado, lo cual se puede deber a la gran cantidad de grasa que compone el extracto la cual puede interactuar con la proteína y evitar la absorción de otros aceites.

b. Solubilidad de la proteína del EP

La solubilidad de las proteínas es medida mediante el índice de solubilidad del nitrógeno (ISN), el perfil de solubilidad de las proteínas presentes en el EP, se muestra en la Figura 9. Como se observa esta propiedad es dependiente del pH al cual se encuentra el extracto, siendo su mínimo el pH 4 y 5, esto se debe a la cercanía al punto isoeléctrico de las proteínas del salvado del arroz (pH 4,5). La solubilidad de la proteína aumenta gradualmente después del pH 6 y por debajo del pH 3, esto se ve relacionado con que las glutelinas son las proteínas mayoritarias en el salvado, y estas son solubles en condiciones alcalinas. La solubilidad máxima se presenta a pH 11, esto se puede deber no solo a lo antes mencionado, sino a un incremento de desnaturalización e hidrólisis de la proteína debido a la condición tan alcalina. El comportamiento mostrado por el EP es el mismo al estudiado en otras investigaciones realizadas como la de Rafe (2017), Zang (2019), Phongthai (2016), Wang (1999) y Zhang (2012); en algunos casos los valores reportados son mayores a los obtenidos en esta investigación debido a la utilización de enzimas para extraer la proteína, lo que permite la formación de péptidos más pequeños que se solubilizan con mayor facilidad.

La solubilidad de la proteína es de gran importancia para sus posibles aplicaciones, es por esto que la capacidad de formación de espuma y emulsificación se estudiaron a diferentes pH, para tratar de comprender el comportamiento de la propiedad según las condiciones de solubilidad en las que se encuentra la proteína.

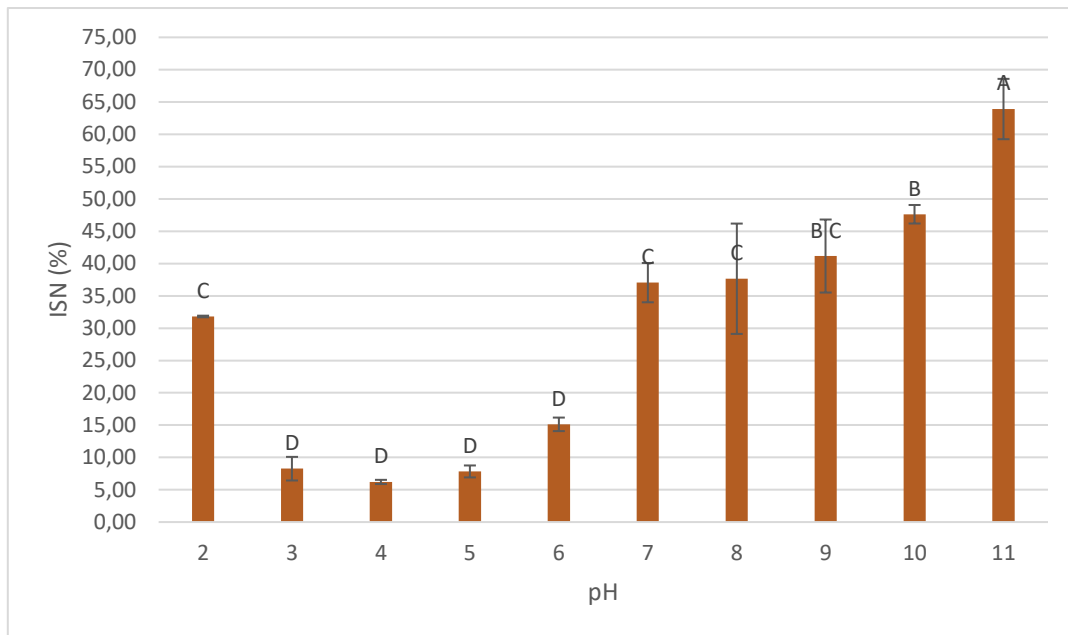


Figura 9. Comportamiento de la Solubilidad de la proteína del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$.

c. Capacidad de formación de espuma y su estabilidad.

La capacidad de formación de espuma es una de las propiedades más reconocida en las proteínas, los resultados obtenidos para el EP se muestran en la Figura 10; además del huevo el cual es un estándar de comparación en esta propiedad (Wang *et al.*, 1999).

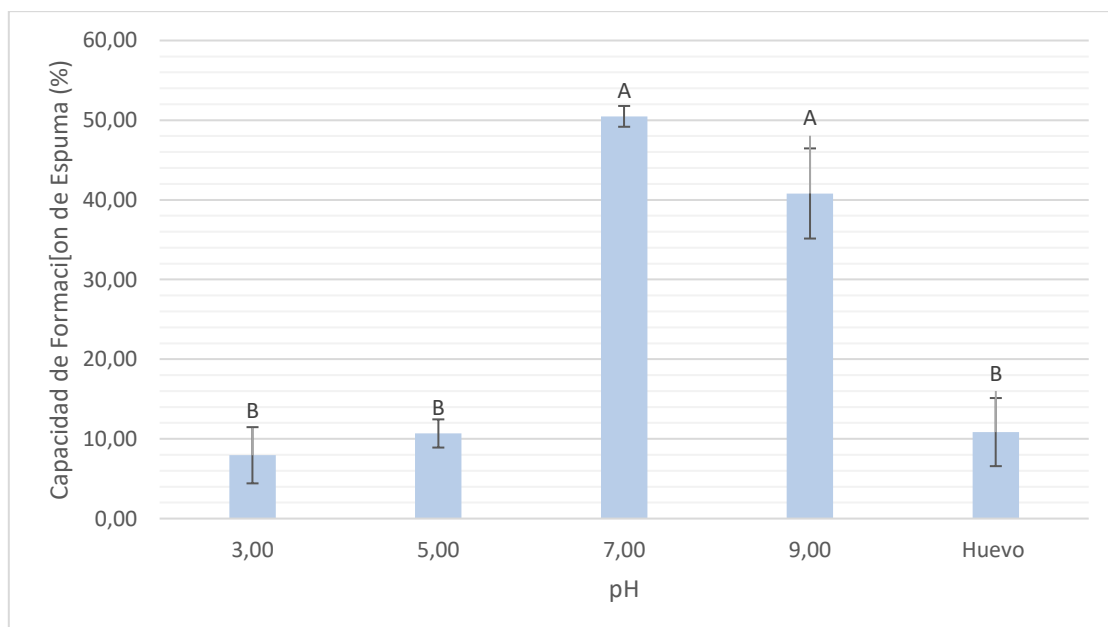


Figura 10. Comportamiento de la capacidad de formación de espuma del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$.

Como se puede observar el pH tiene un papel muy importante en esta propiedad, siendo el pH 5 y 3 los que presentan menor capacidad de formación de espuma esto debido a que la baja solubilidad (cerca al punto isoeléctrico) de la proteína le dificulta moverse a la interfase y formar la espuma (Phongthai *et al.*, 2016).

Cuando se realizaron estas pruebas se observó que la espuma formada (pH 3 y 5) está compuesta principalmente por burbujas grandes y débiles. En cambio, el huevo a pesar de formar poca espuma es compacta con burbujas sumamente pequeñas, que dan una apariencia muy densa.

Por su parte las burbujas formadas para los pH 7 y 9 no tenían una apariencia tan densa como las del huevo, pero si presentaban burbujas pequeñas y compactas, las cuales se formaron en mayor cantidad, como se observa en la Figura 10. Para formar una burbuja, las proteínas tienen un papel muy importante, donde se disuelven en la fase acuosa y forman una capa cohesiva, la cual envuelve el aire (Rafe & Sadeghian, 2017). Una buena solubilidad de la proteína, le brinda mayor flexibilidad, permitiendo así exponer sus componentes hidrofóbicos, para poder interactuar en la interfase agua/aire y lograr disminuir la tensión superficial (Phongthai *et al.*, 2016), es por esta razón que son más densas y pequeñas.

A pesar de que a pH 9 la proteína del EP es más soluble, esta presenta menor capacidad de formación de espuma que las de pH 7, lo cual se puede deber a que las condiciones tan alcalinas, propician la hidrólisis de la proteína, causando un exceso de carga, la cual disminuye esta propiedad (Zhang *et al.*, 2012). Además, como se mencionó con anterioridad, a pH alcalinos se propicia la hidrólisis de la proteína formando péptidos más pequeños, los cuales no cuentan con estructuras secundarias y terciarias capaces de interactuar en la interfase (Phongthai *et al.*, 2016).

El comportamiento del extracto con respecto a su formación de espuma es el mismo que presenta Phongthai (2016), en el caso de Zhang (2012) reportan valores muy altos (60-100%), y en cambio Rafe (2017) reporta valores pequeños (15-25%) con poca variabilidad por el cambio de pH.

Por su parte la estabilidad de la espuma formada depende de que tan cohesiva y elástica sea la capa formada por la proteína para retener el aire. (Rafe & Sadeghian, 2017); los resultados obtenidos para esta propiedad se muestran en la Figura 11.

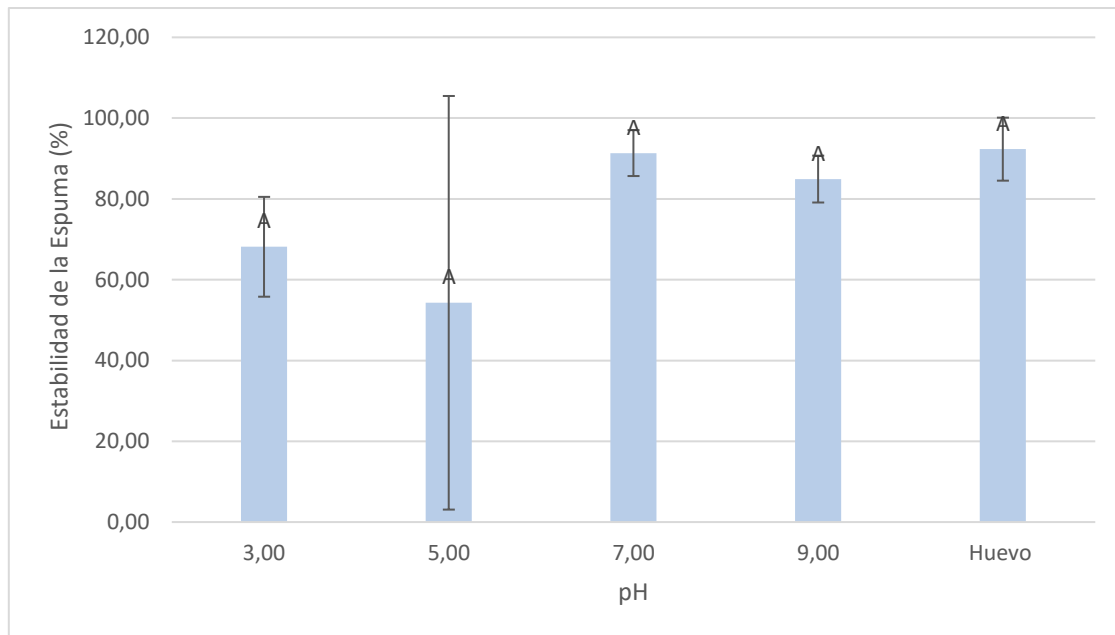


Figura 11. Comportamiento de la estabilidad de la espuma del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$; con $1-\beta=0,16$.

La estabilidad de la espuma mostrada por el EP a pH 7 y 9 no se encontró significativamente diferente a la del huevo, lo cual se puede deber a que las espumas formadas presentaban burbujas pequeñas y muy compactas; cabe mencionar que para el extracto las burbujas con el tiempo se veían secas, pero estas mantenían su forma.

Esta propiedad se vio disminuida en los pH ácidos debido a la formación de burbujas grandes, algunas se explotaban con gran facilidad y otras mantenían su integridad, lo que provocó la gran variedad en los resultados.

Los resultados obtenidos para esta propiedad no se comparan a los reportados por otros investigadores; Phongthai (2016) encontró la estabilidad máxima a pH ácido y para los otros no logró superar el 50%. En el caso de Zhang (2012) la estabilidad de sus concentrados no superó el 2%. Por su parte Hou (2017) solo estudió el comportamiento en condiciones alcalinas ($> \text{pH } 12$) y en estas la estabilidad se encontraba cerca al 100%.

d. Capacidad de emulsificación y su estabilidad

El efecto de la emulsificación depende de disminuir la tensión en la interfaz del agua y aceite; y al mismo tiempo controlar la difusión y agregación de gotas de aceite, al formar una capa de absorción (Hou *et al.*, 2017). El estudio de esta propiedad funcional se llevó a cabo midiendo la capacidad y estabilidad de la emulsión, los resultados

obtenidos se observan en las figuras 12 y 13. Es muy importante mencionar que los resultados obtenidos se ven afectados por una variabilidad inherente al método, como es el caso de la posición de donde se toma la alícuota, del grado de dispersión en el agente tensoactivo, por mencionar algunos.

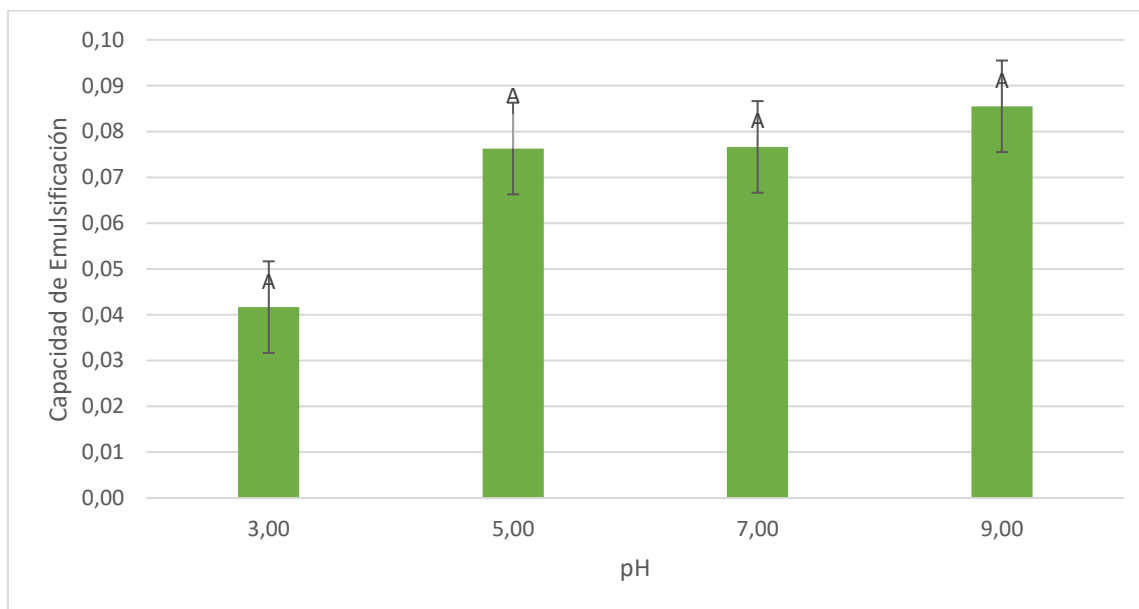


Figura 12. Comportamiento de la capacidad de la emulsión del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$, con $1-\beta=0,28$.

Como se observa en la figura 12, el pH no tiene un efecto tan determinado como en otras propiedades, lo cual se puede deber a la variabilidad causada por el método análisis antes mencionado. Aun así, se observa que el pH conforme se hace más alcalino la capacidad de emulsión aumenta levemente, lo cual concuerda con lo observado por Zhang (2012), Phongthai (2016) y Zang (2019), esto debido a que la capacidad de emulsificación es dependiente de la difusión de los péptidos a la interfase del agua-aceite; y esto lo logra la proteína con mayor facilidad cuando se encuentra disuelta a pH alcalinos.

Además de la solubilidad de la proteína se deben de tener en cuenta factores como el tamaño de los péptidos, siendo los de menor tamaño los que pueden solubilizarse con mayor facilidad e interactuar en la interfase. Otro factor que puede afectar la capacidad de emulsión de la proteína, son los aminoácidos expuestos para interactuar entre el aceite y el agua, ya que si son muy hidrofílicos pueden disminuir la propiedad de emulsión, ya que no tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial (Zhang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 1999 & Hou *et al.*, 2017).

La estabilidad de la emulsión es el resultado que más se vio afectado por la variabilidad del método utilizado, como se puede observar en la figura 13. Al comparar con otros investigadores, los resultados obtenidos son muy altos; en el caso de Wang (1999) reportó valores no mayores a 5 minutos; por su parte Zhang (2012) señaló una estabilidad que ronda los 20-25 min y lo mismo sucede con Hou (2017) con valores entre 15-25 min; los resultados más cercanos son los obtenidos por Phongthai (2016) con valores entre 10 y 130 minutos.

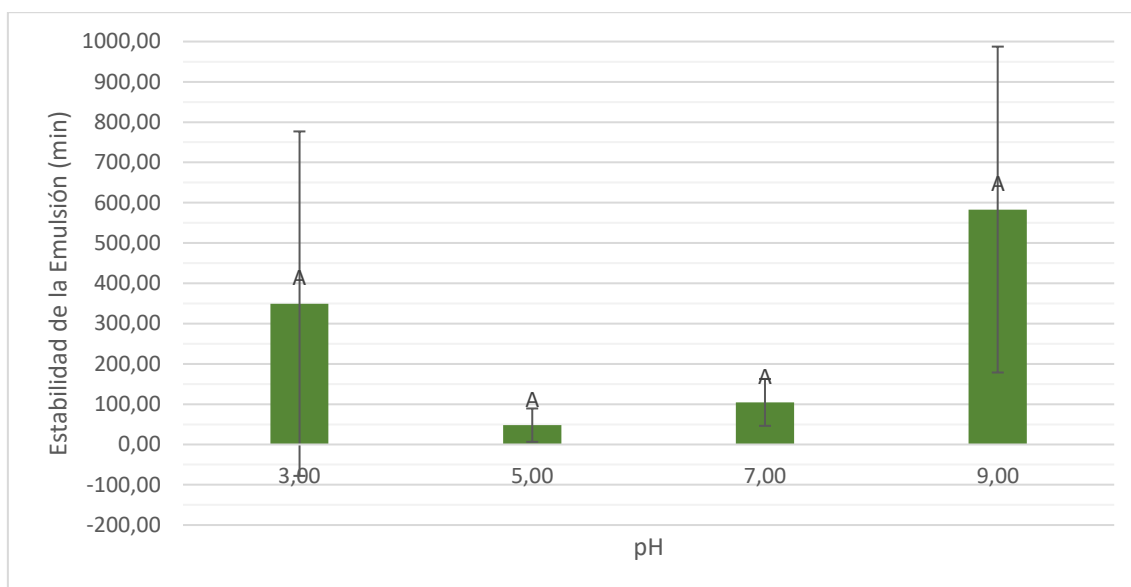


Figura 13. Comportamiento de la estabilidad de la emulsión del EP, dependiendo del pH de la solución. Letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$, con $1-\beta=0,08$.

La estabilidad de la emulsión a pH 5, se puede deber a que al estar tan cerca del pI (~4,5), no hay cargas alrededor de los glóbulos, las cuales causen repulsión entre ellos y retarden la coalescencia de estos (Phongthai *et al.*, 2016 & Zang *et al.*, 2019). Y conforme se alejan del pI aumentan las cargas que permiten estabilizar en mayor medida la emulsión como se observa a pH 3 y 9.

El comportamiento del EP durante estos análisis también se puede relacionar a la presencia de otros componentes en el extracto, principalmente la grasa, la cual también forma parte en las interacciones de la proteína con los componentes en análisis; principalmente con el agua. Cada uno de los concentrados con los cuales se comparó el EP presentan composiciones distintas las cuales brindan sus características propias; el objetivo de este estudio es caracterizar el EP obtenido, principalmente el comportamiento de su parte proteica.

2. Estudio del efecto de la sustitución de EP en galletas libres de gluten

2.1. Dimensiones de las galletas

Para la elaboración de las galletas estudiadas en este proyecto, se utilizó una laminadora y un molde, por lo tanto, todas las galletas de cada sustitución listas para hornear presentaban un grosor de 4 mm y un diámetro de 37 mm. Según las mediciones realizadas después del horneado, el diámetro ($p=0,0033$) y la altura ($p=0,0176$), sí presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos, a diferencia del factor de expansión ($p= 0,0543$); aunque la probabilidad se encuentra muy cercano a ser significativo. En el Cuadro VIII se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro VIII. Dimensiones de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Tratamiento	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Factor de Expansión
Control	36,6 ± 0.2 a	5,1 ± 0,3 a	7,1 ± 0,3
EP al 15%	36,2 ± 0,3 ab	4,6 ± 0,1 b	7,8 ± 0,2
EP al 25%	35,5 ± 0,5 bc	4,6 ± 0,2 b	7,6 ± 0,4
EP al 30%	35,1 ± 0,1 c	4,6 ± 0,1 b	7,7 ± 0,1

Promedio en columnas con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$ (Promedios sin letras no presentaron diferencias significativas).

Se observa la disminución del diámetro de las galletas conforme aumenta el contenido de EP, ya que las proteínas suelen formar masas más viscosas las cuales dificultan su expansión (Inglett *et al.*, 2015), esto unido a que las proteínas tienen una temperatura vítrea de transición menor que hace que las galletas se endurezcan antes, disminuyendo su expansión (Mancebo *et al.*, 2016). Este comportamiento lo reportó Yadav (2011) en sus galletas con concentrado de proteína del salvado de arroz; al igual que Park (2015) con galletas de Okara y soya; Mishra & Chandra (2012), Younas (2011) y Sharif (2009) con galletas sustituidas con salvado de arroz.

Los investigadores antes mencionados también encontraron que, en sus galletas, al aumentar el contenido de proteína presentaban la tendencia al aumento en la altura, relacionado principalmente con la alta viscosidad de la masa. Como se observa en el Cuadro VIII, esto es contrario a lo obtenido por las galletas en estudio.

La altura de las galletas aumentó con respecto al establecido por la laminadora, lo cual se debe a la liberación de dióxido de carbono por parte del polvo de hornear, que

causa la formación de burbujas que expanden el volumen de las galletas (Inglett *et al.*, 2015). Este efecto se vio más pronunciado en las galletas control, en las cuales se formaba una gran burbuja que aumentaba la altura de la galleta, pero por debajo se observaba el hueco dejado al reventarse la burbuja. El EP con el cual se sustituyó las galletas, permitió estabilizar las burbujas que se formaron en la masa durante el proceso de horneado, lo cual ocasionó que estas mantuvieran tamaños pequeños, aumentando su estabilidad y evitando que se colapsasen en una sola burbuja de gran tamaño, como es el caso del control. En la Figura 14 se puede observar que en las galletas sustituidas no es común la problemática de la burbuja grande.



Figura 14. Vista de la parte baja de las galletas libres de gluten sustituidas con EP (en orden de izquierda a derecha, control, 15%, 25% y 30% de EP).

En las galletas, es deseado y considerado una medida de calidad un alto factor de expansión (Baumgartner *et al.*, 2018), en la mayoría de los estudios de galletas libres de gluten, este valor se encuentra entre 5 y 10. Las galletas sustituidas presentan valores mayores al control, pero no significativamente diferentes a este o entre sí. Esto se puede deber a las características de la masa; ya que en nuestra investigación a todas las masas se les agregó la misma cantidad de agua y en el caso de las masas sustituidas, estas al tener un componente con baja capacidad de absorción de agua (1,25 g/g), lo cual ocasiona la formación de una masa más elástica y viscosa; en cambio las galletas control solo cuentan con harina de yuca y arroz, las cuales presentan una capacidad de absorción de agua aproximada de 2,30 g/g, según los valores reportados por Naranjo (2019); lo cual ocasiona que la masa control sea compacta y hasta quebradiza; por lo tanto, esta última no tenía la posibilidad de expandirse durante el horneado, solo crecer. Lo cual lo rectifica

Park (2015) al establecer que el factor de expansión no solo se ve disminuido por el aumento de proteína, sino por la disminución de la humedad en la masa. Por lo tanto, las galletas sustituidas se ven beneficiadas por las distintas propiedades del EP, las cuales le permiten complementar la harina para la elaboración de galletas (Kaur *et al.*,2014). La singularidad de mayor factor de expansión, debido a una menor altura lo presentaron también las galletas de proteína de guisante de Mancebo (2016) y Inglett (2015) en sus galletas compuestas por amaranto y avena.

2.2. Color de las galletas

El color de las galletas es muy importante debido a que afecta la percepción que los consumidores tienen sobre la calidad de estas, incluso antes de probarlas. En el Cuadro IX, se presentan los resultados obtenidos donde la luminosidad ($p=0.0814$) ni la saturación se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, a diferencia del tono ($p=0.0005$). Como complemento en la figura 15 se muestran las galletas elaboradas.

Cuadro IX. Parámetros de color de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Tratamiento	Luminosidad	Tono	Saturación
Control	36 ± 5	78 ± 1 a	20 ± 2
EP al 15%	28 ± 6	$74,7 \pm 0,6$ b	19 ± 2
EP al 25%	28 ± 4	$74,1 \pm 0,8$ b	19 ± 1
EP al 30%	26 ± 8	$73,8 \pm 0,6$ b	19 ± 2

Promedio en columnas con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$ (Promedios sin letras no presentaron diferencias significativas).

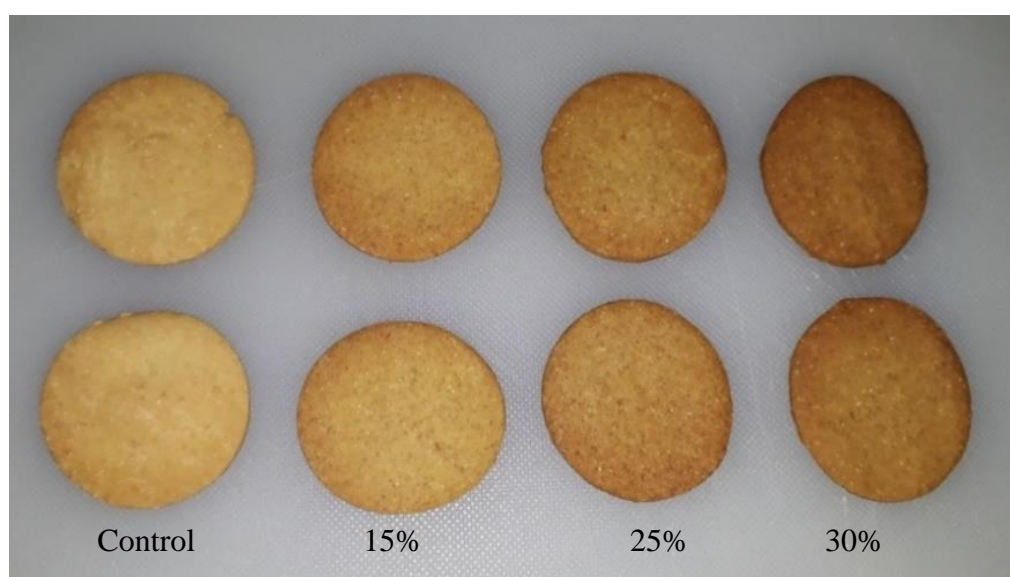


Figura 15. Galletas libres de gluten sustituidas con extracto de proteína del salvado de arroz

A pesar de que no hay diferencias significativas entre la luminosidad o saturación de los diferentes tipos de galletas, se puede observar que conforme la sustitución con el EP aumenta la galleta se vuelve más oscura (menor L*, más saturación), esto se debe en primera instancia a que el extracto de proteína por sí mismo cuenta con una coloración oscura (café) en comparación con las harinas (Phongthai *et al.*, 2016); esto adjunto a la formación de pigmentos oscuros producto de la reacción de Maillard entre los azúcares reductores presentes y la proteína añadida; y la reacción de caramelización también pudo contribuir (Duta & Culetu, 2015; Jan *et al.*, 2016; Bumgartner *et al.*, 2018; Sarabhai & Prabhasankar, 2015).

El tono por su parte sí mostró diferencias significativas, siendo el control el que cuenta con colores más cercanos a los 90° (coloración amarilla) y las sustituciones se encuentran en el rango 72,5°- 74,7° el cual se relaciona con las tonalidades cafés (Bassinello *et al.*, 2011 & Singh & Mohamed, 2007); lo cual se complementa con lo antes mencionado de las reacciones causadas por la presencia de la proteína.

2.3. Porcentaje de Humedad y Actividad del agua de las galletas

Después de llevarse a cabo el horneado de las galletas, se les realizó un análisis de humedad y actividad del agua, los resultados obtenidos para ambos parámetros se encuentran en el Cuadro X.

Cuadro X. Porcentaje de humedad y actividad del agua de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Tratamiento	Porcentaje de Humedad (%)	Actividad del Agua
Control	2,0 ± 0,3	0,199 ± 0,002
EP al 15%	2,2 ± 0,1	0,19 ± 0,03
EP al 25%	2,3 ± 0,1	0,23 ± 0,02
EP al 30%	2,4 ± 0,3	0,23 ± 0,01

Promedio en columnas con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$ (Promedios sin letras no presentaron diferencias significativas).

En los resultados obtenidos para estos parámetros no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (humedad $p=0,1462$ y $a_w p=0,0588$); aun así, se puede observar un leve aumento en ambos conformes se sustituye la harina con el EP, lo cual puede ser causado por los cambios en la matriz macromolecular de la galleta al realizar la sustitución (Chung *et al.*, 2014) Estos resultados están conforme a lo

reportado por Mishra & Chandra (2012), Rababah (2006), Younas (2011), Chung (2014) y Inglett (2015) en sus galletas sustituidas con varios ingredientes con alto valor proteico.

La presencia de la proteína en la galleta puede causar un relativo aumento en retención de agua en las mismas, pero esto no significa que está completamente ligada a ella, por lo tanto, el aw presentado por las galletas con proteína es mayor, ya que puede ser que los enlaces que forma con el agua no son lo suficiente fuerte para mantenerla totalmente inmovilizada (Skibsted *et al.*, 2010).

El agua es un importante aspecto para la conservación de los productos, debido a que se ve relacionado con el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras; las cuales requieren aw mayores a 0,85 para poder causar algún tipo de deterioro en los productos (Inglett *et al.*, 2015). En el caso de las galletas en estudio presentan una humedad y aw muy bajos lo que le brinda una alta estabilidad microbiológica. En el experimento se evaluaron estos parámetros durante el tiempo.

2.4. Textura de las galletas

La textura de las galletas es un parámetro indispensable para evaluar la calidad; para este estudio se midió la dureza, la cual corresponde a la medida de la fuerza máxima requerida para quebrar la galleta (Jan *et al.*, 2016; Mancebo *et al.*, 2015 & Chung *et al.*, 2014). En este parámetro se observaron diferencias significativas ($p=0,0506$) entre los tratamientos, pero sin una tendencia clara como se observa en el Cuadro XI.

Cuadro XI. Dureza de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Tratamiento	Dureza (N)
Control	31 ± 3 ab
EP al 15%	27 ± 5 b
EP al 25%	40 ± 10 a
EP al 30%	32 ± 2 ab

Promedio en columnas con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha= 0,05$ (Promedios sin letras no presentaron diferencias significativas).

Al aumentar el contenido de EP adicionado a la masa de las galletas se observa un leve aumento en la dureza de estas lo cual se puede deber a que se aumenta la interacción de la proteína entre ellas y con el almidón, mediante la formación de puentes de hidrógeno (Martins *et al.*, 2017; Inglett *et al.*, 2015; Sarabhai & Prabhasankar, 2015 & Chung *et al.*, 2014).

En el caso de la disminución en la dureza de la galleta con 15% de sustitución, se puede deber a los cambios internos de la estructura de esta (Mancebo et al., 2016), los cuales desestabilizan la estructura compacta y homogénea presentada en la galleta control (Duta & Culetu, 2015) y aún el contenido de proteína no es el suficiente para causar los efectos antes mencionados.

Los resultados obtenidos se asemejan a los reportados por Singh & Mohamed (2007), donde la textura de las galletas no presentó grandes diferencias o una tendencia clara al variar el grado de sustitución con soya y gluten a sus galletas. También es importante que la dureza obtenida por las galletas libres de gluten con EP es comparable a las obtenida por galletas de trigo (20-30N) con contenido óptimo de grasa y azúcar (Sarabhai & Prabhasankar, 2015).

Hay que resaltar que la sustitución con el EP no causó cambios en la textura de las galletas, ya sea ablandándolas o endureciéndolas significativamente; ya que esto puede provocar rechazo por parte de los consumidores. Además de que permite mantener la consistencia evitando que las galletas se desmoronen durante su manipulación, lo cual es muy importante para su posterior transporte y comercialización.

2.5. Textura de la masa cruda para las galletas

Cuando se realizaron las pruebas definitivas con las galletas, se observaron diferencias en las masas elaborados para las distintas sustituciones; pero una vez horneadas los cambios no eran significativos en muchos de los parámetros analizados, ya sea entre las sustituciones o con el control. Es por lo que se decidió realizar un análisis extra a la masa, lo que llevó a una prueba de la textura mediante el método de TPA, los resultados obtenido se encuentran en el cuadro XII.

Cuadro XII. Parámetros de textura de la masa de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Parámetro	Control	EP al 15%	EP al 25%	EP al 30%
Dureza (N)	64 ± 14 a	21 ± 8 b	10 ± 2 b	10 ± 2 b
Adhesividad (N.s)	-49 ± 17 a	-15 ± 2 b	-13 ± 5 b	-16 ± 2 b
Cohesividad	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,38 ± 0,08
Elasticidad (mm)	6,9 ± 0,7 a	4,9 ± 0,6 ab	4,4 ± 0,9 b	4,9 ± 0,7 ab
Gomosidad (N)	18 ± 5 a	6 ± 1 b	3 ± 1 b	3,8 ± 0,8 b
Masticabilidad (N.m)	0,12 ± 0,05 a	0,03 ± 0,01 b	0,01 ± 0,01 b	0,02 ± 0,01 b

Promedio en columnas con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Tukey con un $\alpha = 0,05$ (Promedios sin letras no presentaron diferencias significativas).

Como se mencionó anteriormente las masas presentan, características distintas, principalmente el control con respecto a las sustituciones; conforme aumenta el contenido de EP se obtiene una masa más moldeable y pegajosa, en cambio el control presenta una estructura compacta. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, donde la masa sin sustitución de proteína presenta la mayor dureza ($p=0,0001$); al igual que los demás parámetros analizados.

Las interacciones entre la proteína, el almidón y el agua propicia la formación de enlaces que aumentan la consistencia de la masa, principalmente influyendo en su dureza. En el caso del EP se observa que, al ser adicionado a la masa de galletas, se debilita la masa, debido al efecto de los lípidos, los cuales cubren la proteína, evitando que se den las interacciones antes mencionadas (Sciarini *et al.*, 2013 & Zouari *et al.*, 2016).

La grasa presente también evita la interacción de la proteína con el agua, ocasionando que esta tenga menor absorción de agua que las harinas utilizadas, es por esto que, aunque a todas las formulaciones presentaban el mismo contenido de los ingredientes húmedos; la presencia del EP permite que en las masas sustituidas se presente un mayor contenido de “agua libre”, la cual ocasiona una estructura más suave, en comparación con el control (Park *et al.*, 2015).

Es muy importante mencionar que considerando aspectos tecnológico no es recomendable que la masa sea muy dura (Laguna *et al.*, 2011), en nuestro caso no se tuvo problemas con los equipos durante el procesamiento de las galletas; aun así, las masas más suaves requerían menos trabajo en la laminadora para tener el grosor deseado, pero tampoco puede ser muy floja la masa, ya que se vuelve muy pegajosa, lo que hace que su manipulación durante el procesamiento se dificulte; en nuestro caso solo la masa con 30% de sustitución presentaba los problemas de pegajosidad; además de que al ser tan débil esta masa, las galletas no mantenían su forma circular perfecta cuando se tenían que retirar después de cortadas.

Al igual que la dureza, la adhesividad presenta el mismo comportamiento en las masas estudiadas ($p=0,0051$). La adhesividad se relaciona con la fuerza requerida para separar la muestra en estudio del instrumento de medición después de la primera compresión. En nuestro caso el embolo se tenía que ingresar dentro de la masa, formando un hoyo profundo y al tratar de salir siempre se pegaba a la masa y levantaba tanto la muestra, como el cilindro que la contenía, lo que llevo a que se sostuviera el cilindro

durante la medición; lo que ocasiono que la adhesividad se relacionó más con cual masa provocaba mayor resistencia para dejar salir el embolo; es por esto que las masas sustituidas, al ser más maleables, no causaban tanta presión y permitían que el embolo se retirar sin tanto trabajo; según la literatura las masas más secas son las que tienen a ser menos adhesivas, ya que evitan la solubilización de los azucares (Pareyt et al., 2008).

Por su parte la cohesividad es un parámetro muy importante, se relaciona con qué tan buenas son las fuerzas que mantienen unida la masa y que también resiste la deformación; en este caso no hay diferencias significativas entre las masas ($p=0,0655$), pero si una tendencia a mayor cohesividad en las muestras con EP. Este parámetro es muy importante, ya que estas deben ser lo suficientemente cohesivas para poder mantenerse unidas una vez cortadas las galletas (Gupta et al., 2011). La cohesividad mostrada por las masas, se pudo apreciar desde el inicio del procesamiento, donde las formulaciones sustituidas requerían solo de 3 minutos de batido (15% de sustitución) o menos (2 minutos para 25% y 1,5 minutos para 30%) para formar la masa y, en cambio la masa control después de 3 minutos de batido se obtenían boronas y requerían de amasado manual para formar la bola de masa, la cual se quebraba fácilmente; en cambio para las masas sustituidas se obtenía la bola formada que se retiraba sin problemas del batidor plano.

La elasticidad corresponde a la altura recuperada por la masa entre las compresiones (Cruz *et al.*,2014 & Yahia, 2019), en las masas en estudio el control presentó una mayor recuperación, aun así, no se diferenció de la mayoría de las masas sustituidas ($p=0,0261$), lo cual puede ser una combinación de las interacciones de las proteínas; ya sea las que le brindan la dureza y de las que brindan la cohesividad, logrando así estabilizar su estructura después de la deformación experimentada y volver a su estado original;

La gomosidad y masticabilidad son parámetros derivados de la dureza, cohesividad y elasticidad, con los cuales se trata de determinar la energía necesaria para desintegrar la muestra, hasta estar lista para tragar (Cruz *et al.*,2014 & Yahia, 2019), es por esto que presentan un comportamiento muy parecido, principalmente a la dureza.

2.6. Agrado de las galletas por los consumidores

Para complementar el estudio de las galletas se realizó un panel de agrado por parte de consumidores, en el cual participaron 112 panelistas. A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de conglomerados, el cual permitió separar a los participantes en 4 grupos, como se observa en la figura 16.

El grupo #1 está conformado por 19 consumidores los cuales representan un 17% del total de los panelistas; el segundo grupo es el mayor y está conformado por 42 consumidores (38%); el grupo # 3 y segundo en importancia lo integran 33 personas para un 29% del total y por último se encuentra el grupo #4 el cual está conformado por 18 participantes (16%).

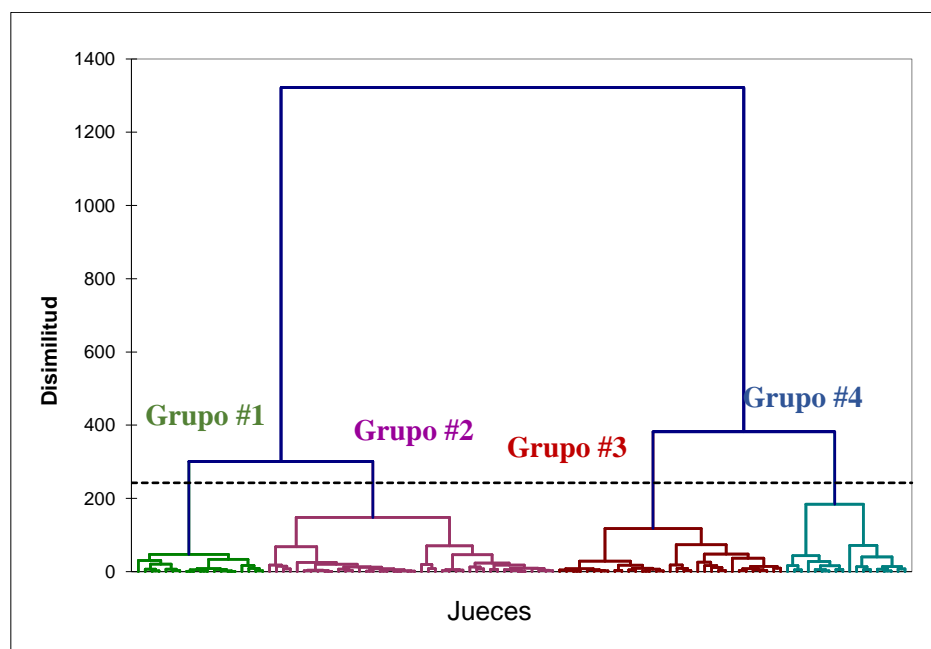


Figura 16. Análisis de conglomerados para la prueba de agrado de galletas sustituidas con EP, brindando y no información de las propiedades de las proteínas

A los participantes se les aplicó la prueba de agrado de las cuatro galletas (repetición #1), pero una vez terminada se les indicó cuales galletas contenían un mayor contenido de proteína y se le brindó información de los beneficios del consumo de proteínas en la dieta; con esto se volvió a realizar la prueba de agrado (repetición #2).

A los resultados obtenidos para los diferentes grupos se les aplicó un análisis de varianza para determinar su comportamiento y si existe una interacción entre las

repeticiones y los tratamientos estudiados. En el Cuadro XIII se observan los resultados obtenidos en el análisis.

Cuadro XIII. Resultados del análisis de varianza del agrado de consumidores de las galletas libres de gluten sustituidas con EP.

Grupo	Probabilidad > F			
	Repetición* Tratamiento	Juez	Repetición	Tratamiento
#1	0,149	0,005*	0,132	0,013*
#2	0,527	<0.0001*	0,253	<0.0001*
#3	0,383	0,156	0,003*	<0.0001*
#4	0,891	<0.0001*	0,124	<0.0001*

* valores con asteriscos presentan diferencias significativas

Como se puede observar en el cuadro XIII en ninguno de los grupos analizados se presenta interacción, lo que significa que en todos los tratamientos se presentó el mismo comportamiento sin importar la repetición, y como se observa en la Figura 17, el agrado de las galletas aumentó ligeramente cuando se les informaba a los consumidores que las galletas tenían un mayor contenido de proteína.

El parámetro de la repetición solo presentó diferencias en el agrado de las galletas en los integrantes del grupo #3, como se observa en la figura 17, hay un mayor agrado de las galletas al conocer que estas presentan mayor contenido de proteínas. En los otros grupos también se observa que el agrado es mayor en la segunda repetición aun así esta variación es causada por el error y no por efecto de la información proporcionada. En el caso de los grupos #2 y #3 se observa que el agrado de la galleta control no se vio afectado, ya que esta no presentaba proteína añadida. El comportamiento de los datos se puede deber a que las personas están escépticas de los beneficios que pueden brindar estos productos y de que si son realmente necesarios (Banovic *et al.*, 2018) o los consumidores están menos dispuestos a sacrificar el sabor, por los beneficios nutricionales (Osborn & Morley, 2016).

Los resultados obtenidos se reportan en la gráfica mostrada en la figura 17, a pesar de que no existe interacción entre los tratamientos y la repetición. Como se observa en el cuadro XIII, los tratamientos sí presentaron diferencias significativas entre sí, es por esto que la gráfica se muestra con los triángulos amarillos el promedio de su agrado y el resultado de la prueba de Bonferroni con 5% de significancia.

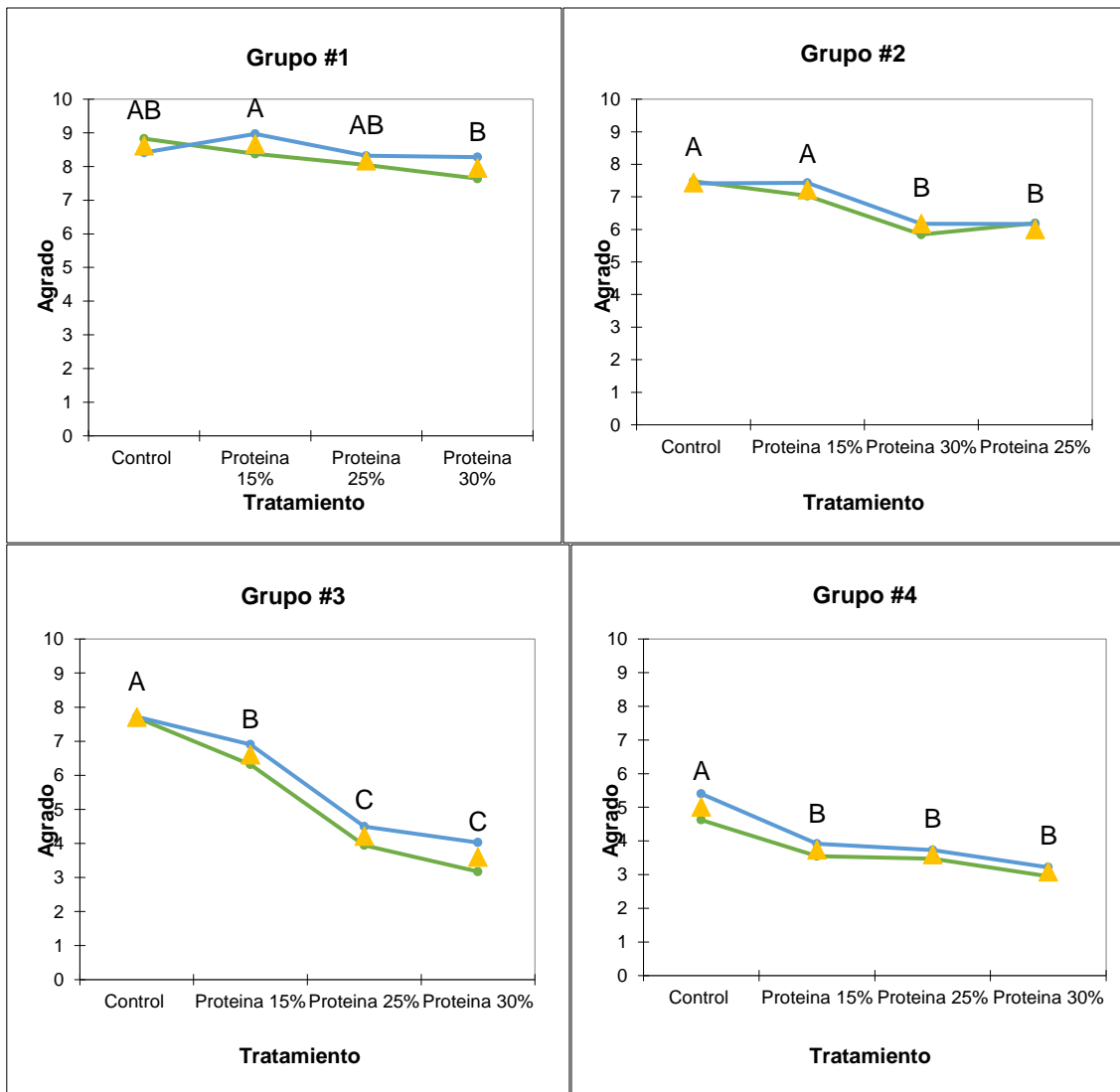


Figura 17. Comportamiento del agrado de los consumidores en los diferentes grupos de conglomerados, dependiente de si no se le ofrece información (línea verde) o si se le informa sobre la proteína en la galleta (línea azul), además del promedio de ambos (Triángulo amarillo), con letras distintas indican diferencia significativa para la prueba de Bonferroni con un $\alpha = 0,05$.

En el grupo #1 y #2 a los consumidores les agradó las galletas, principalmente en el primero donde los resultados obtenidos no bajan de 8, para este grupo el aumento del EP hasta un 25% no causa diferencias en su agrado por la galleta y hasta prefieren la galleta con 15% más que el control. El grupo #2 muestra una disminución en el agrado de las galletas con las sustituciones más altas; este comportamiento se observa claramente en el grupo #3, donde el control y 15% son bien evaluadas, pero las otras formulaciones presentan valores bajos en su agrado. Es importante mencionar que el grupo #4 está integrado por personas que no presentan agrado hacia las galletas en general, ya que ni siquiera a la galleta control le otorgaron valores altos.

Este rechazo por las galletas con mayor sustitución de proteína se debe a la aparición de un sabor amargo y poco familiar para los consumidores. Este sabor es muy común en los alimentos fortificados con proteínas; ya que los péptidos que se forman durante la obtención de hidrolizados exhiben las 5 sensaciones de sabor, siendo el amargo uno de los principales y el que se intensifica cuando se da la formación de péptidos de tamaño mediano. Estos sabores son bien aceptados por niños pequeños que están formado su paladar, pero los adultos los rechazan, es por esto que se utilizan otros ingredientes para enmascararlo, como son los azúcares, sales de sodio, azúcar alcohol y ácidos orgánicos o se encapsula el hidrolizado, con lo cual los agentes de acarreo enmascarar el amargo. También antes de aplicar a cualquier producto se pueden llevar a cabo otros procesos enzimáticos o precipitaciones cromatográficas, para remover los péptidos formados (Iwaniak *et al.*, 2016 & Breternitz *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en este estudio presentan el mismo comportamiento del reportado por Yadav (2011) en el cual conforme se aumentaba la sustitución de la harina con EP el agrado disminuía, solo las galletas con un 5% de sustitución presentaron un agrado comparable al control y las de 10% presentaban un agrado moderado. Por su parte Mann (2016) logró el mayor agrado en las galletas con apenas un 1% de sustitución y para las demás sustituciones consideró que el sabor poco familiar del extracto causara una disminución en la aceptación por parte de los consumidores. En los estudios de Mishra (2012), Younas (2011) y Saeed (2009) elaboraron galletas con el salvado y presentaron el mismo comportamiento donde las galletas con sustituciones de 10% y 15% presentaban los mejores resultados de agrado, pero aun así siendo menor al control. Los investigadores no consideraban solo el sabor poco familiar o amargo, como la razón de desagrado; sino también el aumento de color en las sustituciones mayores.

2.7. Contenido teórico de proteína de las galletas

Se calculó el contenido de proteína de las galletas de forma teórica para determinar si estas cumplen con los requerimientos del Reglamento Técnico Centroamericano de etiquetado nutricional (2012); para esto se utilizaron los resultados obtenidos del contenido de proteína del EP; así como lo reportado por las etiquetas nutricionales de los distintos ingredientes, en caso de que no se reportaran se utilizó como base los datos

mostrados en la Tabla de composición de alimentos de Centroamérica (2007). Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro XIV.

Cuadro XIV. Contenido de proteína teórico de las galletas libres de gluten sustituidas con EP

Tratamiento	Contenido de Proteína en 100 g
Control	3,47
EP al 15%	8,03
EP al 25%	10,99
EP al 30%	12,45

Como se puede observar, con la adición del EP, se logra aumentar considerablemente el contenido de proteína en las galletas. Con este aumento se logra declarar las galletas sustituidas con el 15% como fuente de proteína; y se podría comercializar utilizando etiquetas como adicionado o enriquecido o fortificado con proteína del salvado de arroz.

Por su parte las galletas con las mayores sustituciones logran superar los 10g en 100 g de galleta, por lo tanto, su descripción nutricional es alto en proteína; pero también se pueden utilizar términos como buena o excelente fuente o rico en proteína; lo cual puede atraer a los consumidores, principalmente a los deportistas.

3. Estudio de efecto del almacenamiento de galletas libres de gluten sustituidas con extracto de proteína

3.1. Elección de la galleta para el estudio de almacenamiento.

La elección de la galleta para llevar a cabo el estudio de almacenamiento se realizó tomando en cuenta principalmente los resultados obtenidos de la prueba de agrado de los consumidores, en el cual las galletas sustituidas con 15% de proteína presentaron el mayor agrado entre las galletas sustituidas e incluso en algunos casos su agrado es igual o mayor al de la galleta control; la cual presentó la mayor aceptación durante la prueba.

Es importante resaltar que las galletas sustituidas con 15% presentan características que no se diferencian a las obtenidas con mayor grado de sustitución, como es el caso del grosor, color, humedad y actividad del agua. En cambio, presentan una masa más moldeable que el control; pero sin los problemas de pegajosidad que presentan las masas mayor grado de sustitución.

Es por lo que el estudio de almacenamiento se realizó con las galletas con 15% de sustitución, así como el control, al que no se le adiciono EP, con el objetivo de determinar si el uso del extracto de proteína del salvado de arroz varía las características de las galletas en el tiempo.

En el Cuadro XV se pueden observar los resultados obtenidos de las probabilidades asociadas de los distintos análisis aplicados a las galletas durante su almacenamiento. Por su parte ninguno de los parámetros presentó una interacción significativa, lo que quiere decir que ambos tratamientos presentaron el mismo comportamiento durante el tiempo de almacenamiento; cómo se puede observar en las Figuras 18, 19 y 20; debido a que en ambos tratamientos se observa un aumento en los parámetros estudiados durante el tiempo. Considerando el factor tiempo los parámetros de humedad, aw y dureza fueron cambiando durante el almacenamiento lo que causó diferencias significativas.

Cuadro XV. Resultados del análisis de varianza de las características fisicoquímicas y reológicas para el estudio de almacenamiento de las galletas libres de gluten.

Variable Respuesta	Probabilidad > F			
	Día*Tratamiento	Lote	Día	Tratamiento
Porcentaje Humedad	0.6293	<0.0001*	<0.0001*	0.9612
Aw	0.9414	<0.0001*	<0.0001*	0.0012*
Dureza	0.3059	0.0001*	<0.0001*	<0.0001*

* valores con asteriscos presentan diferencias significativas

El efecto que presentaron los tratamientos con respecto a los distintos análisis efectuados durante el almacenamiento se describe a continuación.

3.2. Porcentaje de Humedad

Como se puede observar este es el único de los parámetros estudiados que no presentó diferencias significativas, lo cual se puede observar claramente en la Figura 18, donde ambos tratamientos presentaron una humedad muy parecida durante el almacenamiento, ya que el EP no logra retener mayor contenido de humedad durante el horneado; en comparación con solo las harinas presentes en el control.

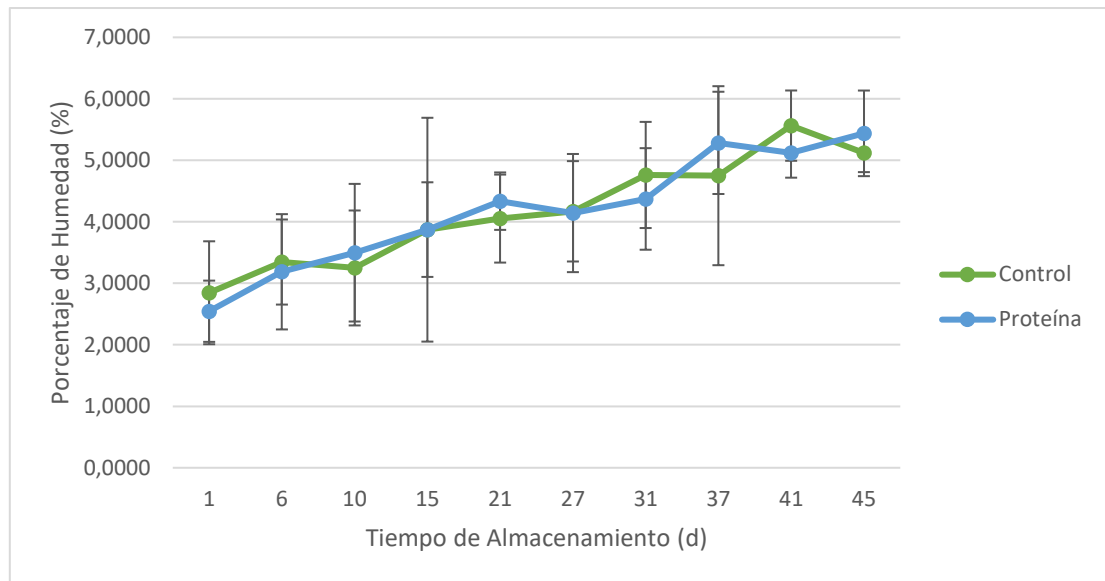


Figura 18. Comportamiento del porcentaje de humedad de las galletas control y sustituidas con proteína (15%), durante el tiempo de almacenamiento.

El aumento de la humedad durante el tiempo de almacenamiento se puede deber a que el empaque utilizado permitió la transferencia de gases, a pesar de ser el utilizado en varios estudios de este tipo, por lo tanto, cuando la galleta se expone a un ambiente más húmedo, al compararlo con su interior, se inicia un proceso de absorción de la humedad.

El almacenamiento realizado a estas galletas se llevó a cabo durante 45 días debido a los resultados de las pruebas preliminares, según los resultados reportados por Romani (2016) los primeros 40 días son en los que se da el mayor aumento de humedad en las galletas, debido a una rápida difusividad del agua en la matriz porosa de la galleta; pero luego de este tiempo, el proceso de absorción se mantiene constante.

3.3. Actividad del agua

En el caso de la actividad del agua, las galletas control y sustituidas con proteína sí presentan diferencias significativas durante el almacenamiento, lo cual se puede observar en la Figura 19, donde la galleta con EP presenta un a_w ligeramente mayor que el del control, lo cual puede deberse a que el EP utilizado como sustitución en las galletas, presenta una capacidad de absorción de agua leve.

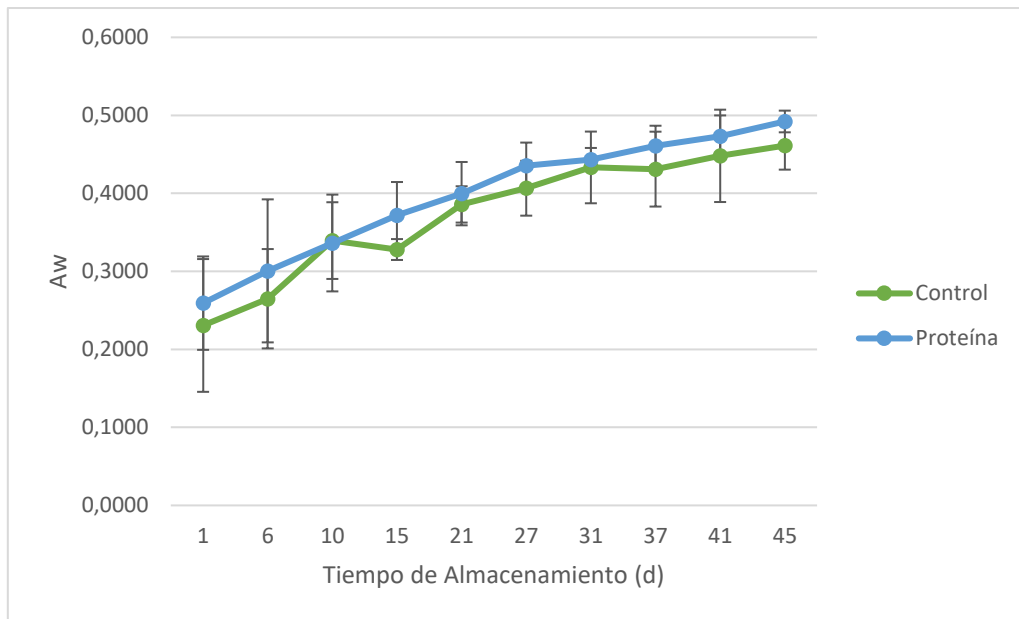


Figura 19. Comportamiento de la actividad del agua de las galletas control y sustituidas con proteína (15%), durante el tiempo de almacenamiento.

Como se mencionó anteriormente durante el almacenamiento las galletas aumentaron su contenido de humedad y si no logra unirse a ningún componente de la galleta, se podría considerar como agua libre, provocando su aumento. Al igual que con la humedad el aw de las galletas estudiadas por Romani (2016) y Secchi (2011) presentaron un aumento constante de aw en los primeros 30 días del almacenamiento, para luego permanecer relativamente constante hasta el día 90.

Cabe resaltar que a pesar del aumento de aw durante el almacenamiento este en ningún momento llegó al valor crítico de 0,6 en el que es posible el crecimiento de microorganismo, es por esto podríamos considerar a las galletas microbiológicamente estables (Tavares et al., 2016; Park *et al.*, 2015).

3.4. Textura

La dureza de las galletas sí presentó diferencias significativas entre los tratamientos estudiados durante el almacenamiento. La galleta control requirió una mayor fuerza para quebrarla, en comparación con la galleta sustituida, debido a que la interacción proteína-almidón no es lo suficientemente fuerte a esta concentración en cambio, causa interferencia en la matriz, debilitándola.

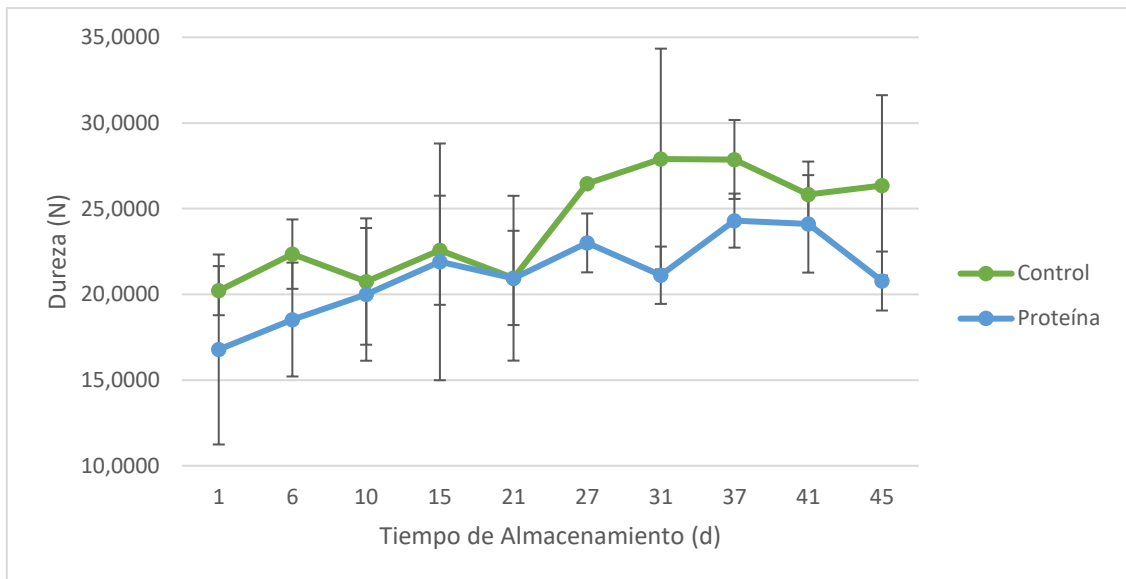


Figura 20. Comportamiento de la dureza de las galletas control y sustituidas con proteína (15%), durante el tiempo de almacenamiento.

Durante el almacenamiento de las galletas, todos los parámetros están relacionados, al absorber humedad del ambiente la galleta aumenta su humedad y aw; lo cual al mismo tiempo causa modificaciones en su textura; no presenta ablandamiento como es usual; en cambio se observa un endurecimiento de las galletas, ya que el proceso de migración de agua causa cambios estructurales. Si el agua dentro de la galleta se encuentra ligada a la proteína o fibra, evitan que esta ayude a la modificación del almidón presente (Chung *et al.*, 2014). En investigaciones recientes se ha presentado la hipótesis de que en lugar de la retrogradación del almidón es la recristalización de la sacarosa y la redistribución de la humedad la que causa el endurecimiento de las galletas (Pestorić *et al.*, 2017 & Belcourt & Labuza, 2007).

Mantener la textura de las galletas durante el almacenamiento, es un factor esencial en la calidad de estas, el cual afecta la aceptación por parte de los consumidores (Marques *et al.*, 2016); por lo que el comportamiento de las galletas es muy prometedor donde el cambio observado es leve y a diferencia de los otros parámetros se presenta una tendencia a la estabilización.

3.5. Análisis microbiológicos

Al inicio de cada lote de producción de las galletas se realizó un análisis microbiológico de estas, el cual se puede observar en el siguiente cuadro; los resultados reportados se encuentran como estimados (E), ya que a la hora de realizar la lectura de resultados se encontraron esparcidos que cubrían aproximadamente la mitad de las placas; además de que a la hora de montar las muestras estas se contaminaron con esporas de hongos de otros analistas presentes en el laboratorio.

Cuadro XVI. Resultados de análisis microbiológicos de las galletas control y sustituidas al 15% con EP, el primer día del almacenamiento.

Análisis	Tratamiento	
	Control	Proteína sustituida al 15%
Mohos y Levaduras (UFC/g)	6,0 x10 ¹ E	5,7x10 ¹ E
Recuento Total (UFC/g)	3,8 x10 ⁴ E	1,4 x10 ⁴ E

No se realizaron más análisis microbiológicos a las galletas, debido a que no se alcanzó el a_w crítico para el crecimiento de microorganismos de deterioro ($a_w \geq 0,6$), como se observa en la Figura 19; a esto se le puede complementar a que no se observó el crecimiento visible de ningún tipo de mohos o levaduras en las galletas durante su almacenamiento.

Generalmente los mohos y levaduras se destruyen durante el horneado (Marques *et al.*, 2016), por lo tanto, su presencia se puede deber a contaminación durante el enfriado, en ese tiempo las galletas se encuentran expuestas al ambiente y el aire es una importante fuente de contaminación de alimentos, ya que es capaz de acarrear esporas de hongos (Valle García *et al.*, 2019). Esto no se puede descartar, ya que se trabajó en una planta donde muchas otras personas estaban procesando al mismo tiempo, diferentes productos en diferentes estados de procesamiento. La presencia de bacterias en los productos se puede deber a contaminación a la hora del empaque de las galletas, debido a la manipulación (Skibsted *et al.*, 2010).

Aunque no se puede concluir de los resultados obtenidos, en el estudio realizado por Jiamyangyuen (2005) se observó que los panes sustituidos con concentrado de proteína del salvado de arroz presentaban menor crecimiento microbiano que el control.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten considerar que el Extracto de Proteína del salvado de arroz tiene potencial para ser utilizado en la elaboración de galletas libres de gluten; ya que aporta proteína, grasa y fibra de alta calidad nutricional. El EP obtenido presenta propiedades funcionales que propician su uso en las galletas, como es una buena capacidad de absorción de aceite y una capacidad de absorción de agua baja, la cual tiene la ventaja de propiciar la formación de una masa menos boronosa y más manipulable. Además, presenta una solubilidad que varía según el pH, siendo menor a pH 3,4 y 5; y aumentando progresivamente a partir de 6. La capacidad de formación de espuma y su estabilidad también se ven modificadas según el pH al que se encuentra el EP, encontrando que a pH ácidos son bajas y las burbujas formadas son grandes y débiles; mientras que a pH 7 y 9 estas propiedades son mayores incluso que la del huevo, con la formación de burbujas pequeñas y compactas. Por su parte la estabilidad de la emulsión se vio disminuida al pH cercano a su punto isoeléctrico y aumenta conforme se aleja de este.

La sustitución de la harina con EP no modifica los parámetros estudiados en las galletas respecto al control, ya que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de humedad, actividad del agua, parámetros de color y textura. Por su parte el EP causó una leve disminución en el diámetro de las galletas conforme aumentaba el grado de sustitución y contribuyó a la estabilización de las galletas sustituidas a durante el horneado. Durante la elaboración de las galletas con EP se obtiene una masa menos dura, elástica, adhesiva, gomosa y masticable que el control; lo cual facilita su procesamiento y moldeado, además las masas sustituidas requieren menos tiempo de amasado, lo cual se puede deber a que son más cohesivas. La sustitución de 15% presentó un agrado en unos casos igual o mayor que la galleta control, por parte de los consumidores.

Durante el almacenamiento las galletas sustituida con un 15% de EP no presentaron diferencias con la galleta control en su comportamiento con respecto al porcentaje de humedad, actividad del agua y textura; en todos los casos se presentó un aumento de los parámetros en el tiempo. Cabe resaltar que el aw no llegó a niveles críticos, que permiten el crecimiento de microorganismos en las galletas.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso en otros productos de panadería.
- Utilizar un empaque multicapa para el almacenamiento de las galletas para evitar la absorción de humedad y así aumentar su vida útil.
- Aumentar el número de repeticiones de los análisis de espuma y emulsión para contrarrestar la variabilidad de los métodos aplicados.
- Llevar a cabo un análisis descriptivo de las galletas, para buscar mejores formas de enmascarar el sabor del EP.
- Realizar pruebas de oxidación de grasas durante el tiempo de almacenamiento.
- Determinar el poder antioxidante del EP.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC INTERNATIONAL. 2000. Methods 10-50D and 10-52D. Approved methods of the American association of cereal chemists (10th ed.). U.S.A: AACC International.
- Adams, R. ed. 2014. The Power of protein. Functional Foods & Beverages. Food Product Design.
- Adebiyi, A.P.; Adebiyi, A.O.; Hasegawa, Y.; Ogawa, T. & Muramoto, K. 2009. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *Eur Food Res Technol.* 228:391-401.
- Amagliani, L.; O'Regan, J.; Kelly, A.L. & O'Mahony, J.A. 2016. Physical and flow properties of rice protein powders. *Journal of Food Engineering.* 190:1-9.
- Amagliani, L.; O'Regan, J.; Kelly, A.L. & O'Mahony, J.A. 2017a. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis.* 59: 18-26.
- Amagliani, L.; O'Regan, J.; Kelly, A.L. & O'Mahony, J.A. 2017b. The composition extraction, functionality and applications of rice proteins: a review. *Trends in Food Science & Technology.* 64:1-12.
- Andersen, B.V.; Brockhoff, P.B. & Hyldig, G. 2019. The importance of liking of appearance, -odour, -taste and texture in the evaluation of overall liking. A comparison with the evaluation of sensory satisfaction. *Food Quality and Preference.* 71: 228-232.
- Anderson, A.K. & Guraya, H. 2001. Extractability of protein in physically processed rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 78(9): 969-972.
- AOAC INTERNACIONAL. Official Method of Analysis, version vigente según consulta en línea. INTERNET. <http://www.eoma.aoac.org/>
- Arendt, E.K. & Dal Bello, F.(ed.). 2008. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages.* USA, Academic Press.

- Astrup, A. & Geiker, N.R.W. 2014. Efficacy of higher protein diets for long-term weight control. How to assess quality of randomized controlled trials?. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 24: 220-223.
- Bajaj, M.; Kaur, A. & Sidhu, J.S. 1991. Studies on the development of nutritious cookies utilizing sunflower kernels and wheat germ. *Plant Foods for Human Nutrition*. 41:381-387.
- Banndyopadhyay, K., Chakraborty, C. & Barman, A.K. 2012. Effect of Microwave and enzymatic treatment on the recovery of protein from Indian defatted rice bran meal. *Journal of Oleo Science*. 61(10): 525-529.
- 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.
- Barbosa-Cánovas, G.; Mortimer, A.; Lineback, D.; Spiess, W.; Buckle, K. & Colonna, P. (ed.). 2009. *Global Issues in Food Science and Technology*. USA, Academic Press.
- Bassinello, P.Z.; Freitas, D. de G.C.; Ascheri, J.L.R.; Takeiti, C.Y.; Carvalho, R.N.; Koakuzu, S.N. & Carvalho, AV. 2011. Characterization of cookies formulated with rice and black bean extruded flour. *Procedia Food Science*. 1: 1645-1652.
- Baumgarther, B.; Özkaya, B.; Saka, I. & Özkaya, H. 2018. Functional and physical properties of cookies enriched with dephytinized oat bran. *Journal of Cereal Science*. 80: 24-30.
- Belcourt, L.A. & Labuza, T.P. 2007. Effect of Raffinose on Sucrose Recrystallization and Textural Changes in Soft Cookies. *Journal of Food Science*. 72(1): 65-71.
- Best, J. 2017. *Colour Design: theories and applications*. 2 ed. U.K. Woodhead Publishing.
- Breternitz, N.R.; Bolini, H.M.A. & Hubinger, M.D. 2017. Sensory acceptance evaluation of a new food flavoring produced by microencapsulation of a mussel (*Perna perna*) protein hydrolysate. *LWT- Food Science and Technology*. 83: 141-149.

- Cauvain, S.P. (ed.).2012. Breadmaking: improving quality.2 ed. U.K. Woodhead Publishing.
- Cauvain, S.P. 2017. Baking Problems Solved. 2 ed. U.K. Woodhead Publishing.
- Chakraverty, A. & Singh, P. 2014. Postharvest Technology and Food Process Engineering. USA, CRC Press.
- Chandi, G.K. & Sogi, D.S. 2007. Funcional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*. 79:592-597.
- Chavan, U.D.; McKenzie, D.B. & Shahidi, F. 2001. Fuctional properties of protein iolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry*. 74:177-187.
- Chen, J. & Rosenthal, A (ed). 2015.Modifying Food Texture. Vol 1. U.K. Woodhead Publishing.
- Cho, S. & Almeida, M. (ed.).2012. Dietary Fiber and Health. USA, CRC Press.
- Choudhury, A.K.R. 2014. Principles of colour and appearance measurement: object appearance, colour perception and instrumental measurement. U.K. Woodhead Publishing
- Chung, H-J.; Cho, A. & Lim, S-T. 2014. Utilization of germinated and heat-moisture treated brown rices in sugar-snap cookies. *LWT- Food Science and Technology*. 57: 260-266.
- Clifton, P.M.; Condo, D. & Keogh, J.B. 2014. Long term weight maintenance aafter advice to consume low carbohydrate, higher protein diets- A systematic review and meta-analysis. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 24: 224-235.
- CODEX STAN 188-1979.2008. Norma relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerante al gluten. Roma. FAO.
- CONARROZ. 2017. Informe Estadístico Periodo 2016-2017.
- Cruz, R.M.S.; Khmelinskii, I. & Vieira, M. 2014. Methods in Food Analysis. USA, CRC Press.

- Davidson, I. (ed.). 2018. Biscuit, cookie and cracker production: process, production and packaging equipment. USA, Academic Press.
- Datta, S.K. (ed.).2008. Rice Improvement in the Genomics Era. USA, CRC Press.
- De Almeida Marques, G., Freitas, J., Alves, D. & Madeira, E. 2016. Whey protein as a substitute for wheat in the development of no added sugar cookies. LWT- Food Science and Technology. 67: 118-126.
- De Souza, D., Sbardelotto, A.F., Ziegler, D.R., Marczak, L.D.F. & Tessaro, I.C. 2016. Characterization of rice starch and protein obtained by a fast-alkaline extraction method. Food Chemistry. 191: 36-44.
- Di Pasquale, M.G. 2007. Amino Acids and Protein for the Athlete: the anabolic edge. USA, CRC Press.
- Duta, D.E. & Culetu, A. 2015. Evaluation of rheological, physicochemical, thermal, mechanical and sensory properties of oat-based gluten free cookies. Journal of Food Engineering. 162: 1-8.
- Eskin, M. & Robinson, D. S. (ed.). 2000. Food Shelf life Stability: chemical, biochemical and microbiological changes. USA, CRC Press.
- FAO. 2017. FAOSTAT, Food and agriculture data, Roma. INTERNET. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Farzana, T. & Mohajan, S. 2015. Effect of incorporation of soy flour to wheat flour on nutritional and sensory quality of biscuits fortified with mushroom. Food Science & Nutrition. 3(5): 363-369.
- Garrido, B.C., Souza, G.H.M.F., Lourenco, D.C. & Fasciotti, M. 2016. Proteomics in quality control: whey protein-based supplements. Journal of Proteomics.147: 48-55.
- Guiné, R. & Correia, P. 2016. Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products, USA, CRC Press

- Gobbetti, M.; Pontonio, E.; Filannino, P.; Rizzello, C.G.; De Angelis, M. & Di Cagno, R. 2018. How to improve the gluten-free diet: the state of the art from a food science perspective. *Food Research International*. 110: 22-32.
- Gorissen, S.H.M.; Rémond, D. & van Loon, L.J.C. 2015. The muscle protein synthetic response to food ingestion. *Meat Science*. 109: 96-100
- Gul, K.; Yousuf, B.; Singh, A.K.; Singh, P. & Wani, A. A. 2015. Rice Bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food -A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 6: 24-30.
- Gupta, M.; Singh Bawa, A. & Abu-Ghannam, N. 2011. Effect of barley flour and freeze-thaw cycles on textural nutritional and functional properties of cookies. *Food and Bioproducts Processing*. 89: 520-527.
- Han, J.; Janz, J.A.M. & Gerlat, M. 2010. Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Research International*. 43: 627-633.
- Han, S.-W.; Chee, K.-M. & Cho, S.-J. 2015. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*. 172: 766-769.
- Hensel, K. 2015. Gluten-Free without the sacrifice. *Food Technology*. 69(11):20-31.
- Hou, F.; Ding, W.; Qu, W.; Oladejo, A.O.; Xiong, F.; Zhang, W.; He, R. & Ma, H. 2017. Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. *Food Chemistry*. 218:207-215.
- Hu, M. & Jacobsen, Ch.(ed.). 2016. *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. USA, Academic Press.
- Inglett, G.E.; Chen, D. & Liu S.X. 2015. Physical properties of gluten-free sugar cookies made from amaranth-oat composites. *LWT- Food Science and Technology*. 63: 214-220.
- Iwaniak, A.; Minkiewicz, P.; Darewicz, M. & Hryniewicz, M. 2016. Food protein-originating peptides as tastants - Physiological, technological, sensory, and bioinformatic approaches. *Food Research International*. 89: 27-38.

- Jan, R.; Saxena, D.C. & Singh, S. 2016. Physico-chemical, textural, sensory and antioxidant characteristics of gluten free cookies made from raw and germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour. *LWT- Food Science and Technology*. 71: 281-287.
- Jiamyangyuen, S.; Srijsdaruk, V. & Harper, W.J. 2005. Extracción of rice bran protein concentrate and its application in bread. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 27(1): 55-64.
- Jnawali, P.; Kumar, V. & Tanwar, B. 2016. Celiac disease: overview and considerations for development of gluten-free foods. *Food Science and Human Wellness*. 5: 169-176.
- Kaewka, K.; Therakulkait, Ch. & Cadwallader, K.R. 2009. Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. *Journal of Cereal Science*. 50:56-60.
- Kaur, A.; Singh, N.; Kaur, S.; Ahlawat, A.K. & Singh, A.M. 2014. Relationships of flour solvent retention capacity, secondary structure and rheological properties with the cookie making characteristics of wheat cultivars. *Food Chemistry*. 158: 48-55.
- Kilcast, D. (ed.). 2013. *Instrumental Assessment of Food Sensory Quality: a practical guide*. U.K. Woodhead Publishing.
- Kilcast, D. & Subramaniam, P. (ed.). 2011. *Food and Beverage Stability and shelf life*. U.K. Woodhead Publishing.
- Kumagai, T.; Watanabe, R.; Saito, M.; Watanabe, T.; Kubota, M. & Kadowaki, M. 2009. Superiority of Alkali- Extracted rice protein in bioavailability to starch degraded rice protein comes from digestion of prolamins in growing rats. *Journal Nutritional Science and Vitaminology*. 55: 170-177.
- Laguna, L.; Salvador, A.; Sanz, T. & Fiszman, S.M. 2011. Performance of a resistant starch rich ingredient in the baking and eating quality of short-dough biscuits. *LWT- Food Science and Technology*. 44: 737-746.
- Lasztity, R. 1995. *The Chemistry of Cereal Proteins*. USA, Routledge.

- Loenneke, J.P.; Loprinzi, P.D.; Murphy, C.H. & Phillips, S.M. 2016. Per meal dose and frequency of protein consumption is associated with lean mass and muscle performance. *Clinical Nutrition*. XXX:1-6.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
- Lusas, R. & Rooney, L.I. (ed.). 2001. *Snack Food Processing*. USA, CRC Press.
- Ma, T.; Zhu, H.; Wang, J.; Wang, Q.; Yu, L. & Sun, B. 2017. Influence of extraction and solubilizing treatments on the molecular structure and functional properties of peanut protein. *LWT-Food Science and Technology*. 79:197-204.
- Mackenzie-Shalders, K.L., Byrne, N.M., Slater, G.J. & King, N.A. 2015. The effect of a whey protein supplement dose on satiety and food intake in resistance training athletes. *Appetite*. 92: 178-184.
- Mancebo, C.M.; Picón, J. & Gómez, M. 2015. Effect of flour properties on the quality characteristics of gluten free sugar-snap cookies. *LWT- Food Science and Technology*. 64:264-269.
- 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 Tecnology*. 67: 127-132.
- Manley, D. (ed.). 2011. *Manley's Technology of Biscuits, crackers and cookies*. UK, Woodhead Publishing
- Mann, G.S.; Bhatia, S.; Kaur, A. & Alam, M.S. 2016. Optimization of process parameters for extraction of deoiled rice bran protein and its utilization in wheat bases cookies. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*. 18(4): 243-251.
- Manzatti, N., Steel, C., Dutra, I., Carvalho, E. & Bolini, H. 2015. Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. *LWT- Food Science and Technology*. 62: 1011-1018.
- Marques, G.A.; São José, J.F.B.; Silva, D.A. & Silva, E.M.M. 2016. Whey protein as a substitute for wheat in the development of no added sugar cookies. *LWT- Food Science and Technology*. 67: 118-126.

- Martins, Z.E.; Pinho, O. & Ferreira, I.M.P.L.V.O. 2017. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. *Trends in Food Science & Technology*. 67: 106-128.
- Menchú, M.T. & Méndez, H. (ed.). 2007. *Tabla de composición de alimentos de Centroamérica*. 2da. Ed. Guatemala, INCAP/OPS.
- Mishra, N. & Chandra, R. 2012. Development of functional biscuit from soy flour & rice bran. *International Journal of Agricultural and Food Science*. 2(1): 14-20.
- Mora, S. M. 2013. Aprovechamiento de ñampí, tiquizque, yuca y arroz para la elaboración de galletas dulces libres de gluten con propiedades sensoriales y reológicas similares a las obtenidas con trigo. Tesis Lic. en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- Nadathur, S., Wanasundara, J. & Scanlin, L. 2016. *Sustainable Protein Sources*. USA, Academic Press.
- Naranjo, W. 2019. Aprovechamiento de un subproducto de la molienda seca del maíz en productos horneados libres de gluten. Tesis Lic. en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- Naqash, F.; Gani, A.; Gani, A. & Masoodi, F.A. 2017. Gluten -Free baking: Combating the challenges, a review. *Trends in Food Science & Technology*. 66: 98-107.
- Nollet, L.M.L. (ed.). 2004. *Handbook of Analysis*. 2 ed. USA, CRC Press.
- Nollet, L.M.L. & Toldra, F. 2015. *Handbook of Food Analysis*. 3 ed. USA, CRC Press
- Osborn, S. & Morley, W.(ed.). 2016. *Developing Food Products for Consumers with Specific Dietary Needs*. UK, Woodhead Publishing.
- O'Sullivan, M.G. 2017. *A Handbook for Sensory and Consumer-Driven New Product Development: Innovative Technologies for the Food and Beverage Industry*. U.K. Woodhead Publishing.
- 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*. 48:863-869.

- Park, J.; Choi, I. & Kim, Y. 2015. Cookies formulated from fresh okara using starch, soy flour and hydroxypropyl methylcellulose have high quality and nutritional value. *LWT-Food Science and Technology*. 63: 660-666.
- Patsanguan, S.; Hisaranusorn, N.; Phongthai, S. & Rawdkuen, S. 2014. Rice Bran Protein Isolates: Preparation and their Physico-Chemical and Functional Properties. *Food and Applied Bioscience Journal*. 2(3): 169-182.
- Pérez, S.R.; Osella, C.A.; de la Torre, M.A. & Sánchez, H.D. 2008. Efecto del mejoramiento proteico sobre los parámetros de calidad nutricional y sensorial de galletitas dulces (cookies). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 58(4); 403-410.
- Pestorić, M.; Sakač, M.; Pezo, L.; Škrobot, D.; Nedeljković, N.; Jovanov, P.; Šimurina, O. & Mandić, A. 2017. Physicochemical characteristics as the markers in predicting the selflife of gluten-free cookies. *Journal of Cereal Science*. 77:172-179.
- Phillips, G.O. & Williams, P.A. (ed). 2011. *Handbook of Food Proteins*. U.K. Woodhead Publishing.
- Phongthai, S.; Lim, S.-T. & Rawdkuen, S. 2016a. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. *Journal of Cereal Science*. 70: 146-154.
- Phongthai, S.; D' Amico, S.; Schoenlechner, R. & Rawdkuen, S. 2016b. Comparative study of rice bran protein concentrate and egg albumin on gluten-free bread properties. *Journal of Cereal Science*. 72: 38-45.
- Phongthai, S.; D' Amico, S.; Schoenlechner, R.; Homthawomchoo, W. & Rawdkuen, S. 2017. Effects of protein enrichment on the properties of rice flour-based gluten-free pasta. *LWT- Food Science and Technology*. 80: 378-385.
- Prakash, V.; Martín-Belloso, O.; Keener, L.; Astley, S.; Braun, S.; McMahon, H. & Lelieveld, H. (ed.).2016. *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*. USA, CRC Press.

- Rababah, T.M.; Al-Mahasneh, M.A. & Ereifej, K.I. 2006. Effect of chickpea, broad bean, or isolated soy protein additions on the physicochemical and sensory properties of biscuits. *Journal of Food Science*. 71(6): 438-442.
- Rafe, A.; Mousavi, S.S. & Shahidi, S.-A. 2014. Dynamic rheological behavior of rice bran protein (RBP): Effects of concentration and temperature. *Journal of Cereal Science*.60: 514-519.
- Rafe, A. & Sadeghian, A. 2017. Stabilization of Tarom and Domesiah cultivars rice bran: Physicochemical, functional and nutritional properties. *Journal of Cereal Science*. 74:64-71.
- Rahim, N.I.A., Morad, N.A. & Long, K. 2015. Rice bran water extraction through autoclaving and sonication: protein content and amino acid profile. *Journal of applied science and agriculture*. 10(5): 97-103.
- Rawson, E.S. & Volpe, S.L. (ed.). 2015. *Nutrition for Elite Athletes*. USA, CRC Press.
- Rios, N.S.; Pinheiro, B.B.; Pinheiro, M.P.; Bezerra, R.M.; dos Santos, J.C. & Gonçalves, L.R.B. 2018. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process Biochemistry*. 75:99-120.
- Rivera, G. ed. 2015. *Protein Innovation: a market that's here to stay*. *Natural Products Insider: Plant Based Ingredients*. 20(5): 1-5.
- Robertson, G.L. (ed.). 2009. *Food Packaging and shelf life: a practical guide*. USA, CRC Press.
- Romani, S.; Rocculi, P.; Tappi, S. & Rosa, M.D. 2016. Moisture adsorption behavior of biscuit during storage investigated by using a new Dynamic Dewpoint method. *Food Chemistry*. 195: 97-103.
- Rosell, C. M.; Bajerska, J. & El Sheikha, A.F. (ed.). 2015. *Bread and its fortification: nutrition and health Benefits*. USA, CRC Press.
- RTCA 67.01.60:10. 2012. *Etiquetado Nutricional Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para la población a partir de 3 años*. MEIC, Costa Rica.

- Saeed, G.S.M.; Arif, S.; Ahmed, M.; Ali, R. & Shih, F. 2009. Influence of rice bran on rheological properties of dough and in the new product development. *Journal of Science and Technology*. 46(1):62-65.
- Sakamoto, K.; Lochhead, R.Y.; Maibach, H.I. & Yamashita, Y. 2017. *Cosmetic Science and Technology: theoretical Principles and Applications*. Holanda, Elsevier.
- Salfinger, Y. & Tortorello, M.L. 2015. *Compendium of Methods for the Microbiology Examination of Foods*. 5 ed. USA, APHA Press.
- 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: 1301-1308.
- Sciarini, L.S.; Van Bockstaele, F.; Nusantoro, B.; Perez, G.T. & Dewettinck, K. 2013. Properties of sugar-snap cookies as influenced by lauric-based shortenings. *Journal of Cereal Science*. 58:234-240.
- Secchi, N.; Stara, G.; Anedda, R.; Campus, M.; Piga, A.; Roggio, T. & Catzeddu. 2011. Effectiveness of sweet ovine whey powder in increasing the shelf life of Amaretti cookies *LWT- Food Science and Technology*.44: 1073-1078.
- Secretaria De Salud Mexico.1994. Norma oficial mexicana nom-111-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Sharif, M.K.; Butt, M.S.; Anjum, F.M. & Nawaz, H. 2009. Preparation of Fiber and Mineral Enriched Defatted Rice Bran Supplemented Cookies. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8: 571-577.
- Singh, B.; Bajaj, M.; Kaur, A.; Sharma, S. & Sidhu, J.S. 1993. Studies on the development of high-protein biscuits from composite flours. *Plant Foods for Human Nutrition*. 43: 181-189.
- Singh, M. & Mohamed, A. 2007. Influence of gluten–soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. *LWT- Food Science and Technology*. 40: 353-360.

- Sjöö, M & Nilsson, L (ed.), 2018, Starch in Food Structure, Function and Applications, 2 ed. UK, Woodhead Publishing
- Skibsted, L.H.; Risbo, J.; Anderson, M.L. (ed.). 2010. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. U.K. Woodhead Publishing.
- Stelten, S.; Dekker, I.; Ronday, E.; Thijs, A.; Boelsma, E. Peppelenbos, H. & De Van Der Schueren, M. 2015. Protein-enriched 'regular products' and their effect on protein intake in acute hospitalized older adults; a randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*. 34: 409-414.
- Subramaniam, P. (ed.). 2016. The Stability and shelf life of food. 2 ed. U.K. Woodhead Publishing.
- Sumnu, S.G. & Sahin, S (ed.). 2008. Food Engineering Aspects of Baking Sweet Goods. USA, CRC Press.
- Sun, D. 2016. Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation. 2 ed. USA, Academic Press.
- Tavares, B.O.; da Silva, E.P.; da Silva, V.S.; Soares, M.J.; Ida, E.I. & Damiani, C.2016. Stability of gluten free sweet biscuit elaborated with rice bran, broken rice and okara. *Food Science and Technology*. 36 (2): 296-303.
- Taylor IV, L.W (ed.). 2012. Nutritional guidelines for athletic performance: the training table. USA, CRC Press.
- Valle Garcia, M.; Sonnenstrahl Bregão, A; Parussolo, G.; Olivier Bernardi, A.; Stefanello, A. & Venturini Copetti, M. 2019. Incidence of spoilage fungi in the air of bakeries with different hygienic status. *International Journal of food microbiology*. 290: 254-261.
- Varzakas, T. & Tzia, C. eds. 2015. Handbook of Food Processing: Food safety, quality and manufacturing processes. USA, CRC Press.
- Wang, M.; Hettiarachchy, N.S.; Qi, M.; Burks, W. & Siebenmorgen, T. 1999. Preparation and Functional Properties of Rice Bran Protein Isolate. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 47:411-416.

- Wang, B.; Lui, Y.; Li, H. & Yang, L. 2016. Rice proteins, extracted by alkali and α -amylase, differently affect in vitro antioxidant activity. *Food Chemistry* 206: 137-145.
- Watanabe, M.; Maeda, I.; Koyama, M.; Nakamura, K. & Sasano, K. 2015. Simultaneous recovery and purification of rice protein and phosphorus compounds from full-fat and defatted rice bran with organic solvent-free process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 119(2): 206-211.
- Watanabe, M.; Yamada, C.; Maeda, I.; Techapun, C.; Kuntiya, A.; Leksawasdi, N.; Seesuriyachan, P.; Chaiyaso, T.; Takenaka, S.; Shiono, T.; Nakamura, K. & Endo, S. 2019. Evaluating of quality of rice bran protein concentrate prepared by a combination of isoelectronic precipitation and electrolyzed water treatment. *LWT-Food Science and Technology*. 99:262-267.
- Watson, R.R.; Preedy, V.R. & Zibadi, S (ed.). 2014. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health: Benefits, risks and mechanisms of whole grains in health promotion*. USA, Academic Press.
- Wrigley, C. Seetharaman, K. Corke, H. Faubion, J. 2016. *Encyclopedia of Food Grains*. Vol. 1. USA, Academic Press.
- Xiong, T.; Xiong, W.; Ge, M.; Xia, J.; Li, B. & Chen, Y. 2018. Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*. 109:260-267.
- Yada, R.Y (ed.). 2018. *Proteins in Food Processing*. 2 ed. U.K. Woodhead Publishing.
- 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.
- Yahia, E.M. 2019. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and vegetables*. UK, Woodhead Publishing
- Younas, A.; Bhatti, M. S.; Ahmed, A. & Randhawa, M.A. 2011. Effect of rice bran supplementation on cookie baking quality. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 48(2): 129-134.

- Zang, X.; Yue, Ch.; Wang, Y.; Shao, M.& Yu, G. 2019. Effect of limited enzymatic hydrolysis on the structure and emulsifying properties of rice bran protein. *Journal of Cereal Science*. 85: 168-174.
- Zhang, H.-J.; Zhang, H.; Wang, L. & Guo, X.-N. 2012. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran. *Food Research International*. 47:359-363.
- Zhao, Y., ed. 2012. *Specialty Foods: processing technology, quality and safety*. USA, CRC Press.
- Zouari, R.; Besbes, S.; Ellouze-Chaabouni, S. & Ghribi-Aydi, D. 2016. Cookies from composite wheat–sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. *Food Chemistry*. 194: 758-769.

ANEXOS

# MUESTRA	SAQ-850-1	MÉTODO EMPLEADO
DESCRIPCIÓN	Proteína Salvado de Arroz 1	
ANÁLISIS		
HUMEDAD (g/100 g)	1,78	925.09 AOAC, P-SA-MQ-002 ⁺
CENIZAS (g/100 g)	3,73	923.03 AOAC, P-SA-MQ-004 ⁺
GRASA (g/100 g)	23,99	920.85 AOAC, P-SA-MQ-005 ⁺
PROTEÍNA (N X 6,25) (g/100 g)	56,44	979.09 AOAC, P-SA-MQ-003 ⁺
FIBRA DIETÉTICA (g/100 g)	3,24	985.29 AOAC, P-SA-MQ-007 ⁺

# MUESTRA	SAQ-850-2	MÉTODO EMPLEADO
DESCRIPCIÓN	Proteína Salvado de Arroz 2	
ANÁLISIS		
HUMEDAD (g/100 g)	3,99	925.09 AOAC, P-SA-MQ-002 ⁺
CENIZAS (g/100 g)	3,35	923.03 AOAC, P-SA-MQ-004 ⁺
GRASA (g/100 g)	31,70	920.85 AOAC, P-SA-MQ-005 ⁺
PROTEÍNA (N X 6,25) (g/100 g)	50,73	979.09 AOAC, P-SA-MQ-003 ⁺
FIBRA DIETÉTICA (g/100 g)	4,64	985.29 AOAC, P-SA-MQ-007 ⁺

Figura 21. Resultados obtenidos del análisis proximal de los extractos de proteína del salvado de arroz de diferentes pH (4 y7) de las pruebas preliminares de este proyecto, realizado por el laboratorio de química del CITA. Proteína Salvado de arroz 1 (pH 4) y proteína salvado de arroz 2 (pH 7)

Cuadro XVII. Promedio de los lotes de la capacidad de absorción de agua y aceite del EP.

Absorción de	Lote #1	Lote #2	Lote #3
Agua (g/g)	1,26	1,25	1,25
Aceite (g/g)	2,73	2,61	2,57

Cuadro XVIII. Promedios de los lotes de la solubilidad de la proteína del EP.

pH	Índice de Solubilidad del Nitrógeno (%)		
	Lote #1	Lote #2	Lote #3
2	31,92	31,81	31,70
3	6,71	9,93	8,14
4	6,53	5,97	6,12
5	7,43	7,29	8,77
6	15,92	14,11	15,34
7	35,73	35,28	40,14
8	29,01	42,94	41,00
9	36,51	46,44	40,55
10	49,08	47,06	46,75
11	67,13	65,34	59,26

Cuadro XIX. Promedios de lotes de la estabilidad y capacidad de formación de espuma y emulsificación, de la proteína del EP, a diferentes pH.

Propiedad Funcional	Condición	Lote #1	Lote #2	Lote #3
Estabilidad de la Espuma (%)	pH 3,00	55,56	75,00	73,89
	pH 5,00	53,33	9,52	100,00
	pH 7,00	85,57	93,75	94,71
	pH 9,00	79,30	89,36	86,08
	Huevo	90,30	100,00	86,67
Capacidad de Formación de Espuma (%)	pH 3,00	6,91	5,48	11,45
	pH 5,00	8,89	11,40	11,76
	pH 7,00	51,53	49,25	50,67
	pH 9,00	40,93	45,74	35,74
	Huevo	15,19	9,03	8,33
Capacidad de Emulsificación	pH 3,00	0,035	0,037	0,053
	pH 5,00	0,120	0,061	0,048
	pH 7,00	0,064	0,044	0,122
	pH 9,00	0,086	0,075	0,096
Estabilidad de la Emulsión (min)	pH 3,00	110,572	785,001	152,916
	pH 5,00	13,202	44,499	86,164
	pH 7,00	93,383	160,434	59,386
	pH 9,00	831,776	743,790	173,503

Cuadro XX. Promedios de los lotes de galletas, con respecto a las mediciones de aw, porcentaje de humedad, dimensiones, textura y color.

Lote	Tratamiento	Aw	Por. Humedad (%)	Diámetro (cm)	Altura (mm)	Expansión	Dureza (N)	L*	Tono	Saturación
1	Control	0,2006	1,87	3,67	5,155	7,12	28,15	40,85	77,44	21,60
1	EP 15%	0,2032	2,09	3,605	4,72	7,64	21,94	25,69	75,26	18,00
1	EP 25%	0,2205	2,36	3,495	4,775	7,32	34,38	25,32	74,48	18,45
1	EP 30%	0,2265	2,25	3,505	4,645	7,55	31,32	20,97	73,36	16,92
2	Control	0,1984	2,37	3,66	5,37	6,82	33,96	32,34	77,66	19,15
2	EP 15%	0,1658	2,29	3,65	4,64	7,87	28,82	24,63	74,51	17,63
2	EP 25%	0,2522	2,29	3,555	4,445	8,00	49,94	26,31	73,26	19,17
2	EP 30%	0,2485	2,68	3,515	4,52	7,78	31,17	23,75	73,63	18,99
3	Control	0,1975	1,84	3,635	4,89	7,43	31,84	35,47	79,05	19,41
3	EP 15%	0,2063	2,19	3,595	4,565	7,88	30,02	34,13	74,34	21,33
3	EP 25%	0,2234	2,20	3,585	4,71	7,61	35,51	31,23	74,55	20,51
3	EP 30%	0,2251	2,15	3,505	4,575	7,66	33,93	34,13	74,34	21,33

Cuadro XXI. Resultados del análisis de varianza de las características fisicoquímicas y reológicas de los distintos tratamientos de galletas (Control, 15%, 25% y 30%) de EP

Variable Respuesta		gl	Suma de Cuadrados	Valor F	Prob>F
Aw	Lote	2	0,00002998	0,0461	0.9553
	Tratamiento	3	0,00427385	4,3833	0.0588
Diámetro	Lote	2	0,00138750	0,7935	0.4946
	Tratamiento	3	0,03997292	15,2399	0.0033*
Altura	Lote	2	0,03880417	0,7377	0.5171
	Tratamiento	3	0,60844167	7,7118	0.0176*
Expansión	Lote	2	0,13501667	1,1665	0.3733
	Tratamiento	3	0,79280000	4,5662	0.0543
Porcentaje de Humedad	Lote	2	0,22685000	4,7965	0.0570
	Tratamiento	3	0,18536667	2,6129	0.1462
Dureza	Lote	2	99,05652	2,6626	0.1487
	Tratamiento	3	263,90537	4,7291	0.0506*
L*	Lote	2	108,62182	3,2952	0.1082
	Tratamiento	3	182,53070	3,6915	0.0814
Tono	Lote	2	1,298867	1,7169	0.2573
	Tratamiento	3	34,814667	30,6800	0.0005*
Saturación	Lote	2	9,6902167	2,0531	0.2093
	Tratamiento	3	2,0938917	0,2958	0.8275

Cuadro XXII. Promedios de los lotes de masa de galleta, con respecto a los parámetros medidos con el TPA.

Lote	Tratamiento	Dureza (N)	Adhesividad (N.s)	Elasticidad (mm)	Cohesividad	Gomosidad (N)	Masticabilidad (N.m)
1	Control	71,73	-48,63	6,89	0,27	19,17	0,13
1	EP 15%	22,19	-13,39	5,00	0,25	5,56	0,03
1	EP 25%	12,69	-16,84	5,25	0,33	4,21	0,02
1	EP 30%	11,03	-13,90	4,24	0,31	3,42	0,02
2	Control	70,16	-63,88	7,51	0,31	21,28	0,16
2	EP 15%	27,49	-16,32	5,40	0,24	6,76	0,04
2	EP 25%	9,05	-8,30	3,62	0,27	2,40	0,01
2	EP 30%	8,26	-14,89	5,00	0,41	3,36	0,02
3	Control	49,51	-34,18	6,26	0,25	12,50	0,08
3	EP 15%	14,05	-14,99	4,40	0,31	4,54	0,02
3	EP 25%	9,15	-13,11	4,36	0,32	2,87	0,01
3	EP 30%	10,35	-17,73	5,53	0,44	4,58	0,03

Cuadro XXIII. Resultados del análisis de varianza de las características reológicas de los distintos tratamientos de la masa de galletas (Control, 15%, 25% y 30%) de EP

Variable Respuesta		gl	Suma de Cuadrados	Valor F	Prob>F
Dureza Masa	Lote	2	185,0474	2,4465	0.1671
	Tratamiento	3	5872,6286	51,7601	0.0001*
Adhesividad Masa	Lote	2	68,5153	0,4876	0.6365
	Tratamiento	3	2692,3775	12,7750	0.0051*
Elasticidad Masa	Lote	2	0,139317	0,1258	0.8840
	Tratamiento	3	10,756167	6,4763	0.0261*
Cohesividad Masa	Lote	2	0,00321667	0,7510	0.5116
	Tratamiento	3	0,02662500	4,1440	0.0655
Gomosidad Masa	Lote	2	12,55722	1,0878	0.3953
	Tratamiento	3	417,50883	24,1110	0.0010*
Masticabilidad Masa	Lote	2	0,00105000	1,2353	0.3554
	Tratamiento	3	0,02342500	18,3725	0.0020*

Cuadro XXIV. Promedio de los resultados de porcentaje de humedad de las galletas (control y 15% EP) durante el almacenamiento.

Día	Porcentaje de Humedad (%)					
	Lote #1		Lote #2		Lote #3	
	Control	Proteína	Control	Proteína	Control	Proteína
1	3,601	2,915	2,816	2,663	2,122	2,058
6	3,970	4,025	3,321	3,168	2,748	2,368
10	3,758	4,639	3,695	2,906	2,296	2,948
15	5,721	4,654	2,802	3,556	3,092	3,410
21	4,586	4,812	4,218	4,120	3,354	4,076
27	4,712	5,053	4,448	3,373	3,352	4,002
31	5,046	4,627	5,342	4,940	3,898	3,549
37	5,763	6,128	5,184	4,938	3,303	4,786
41	6,145	4,717	5,225	5,388	5,323	5,256
45	5,430	6,147	5,048	5,044	4,890	5,125

Cuadro XXV. Promedio de los resultados de actividad del agua de las galletas (control y 15% EP) durante el almacenamiento.

Día	Aw					
	Lote #1		Lote #2		Lote #3	
	Control	Proteína	Control	Proteína	Control	Proteína
1	0,2841	0,3186	0,2632	0,2424	0,1447	0,2169
6	0,2964	0,3929	0,2984	0,2680	0,2000	0,2411
10	0,3751	0,3954	0,3522	0,3265	0,2911	0,2871
15	0,3415	0,4058	0,3196	0,3787	0,3229	0,3316
21	0,3961	0,4377	0,3993	0,3948	0,3622	0,3664
27	0,4326	0,4646	0,4149	0,4138	0,3722	0,4279
31	0,4672	0,4557	0,4442	0,4449	0,3883	0,4297
37	0,4780	0,4872	0,4198	0,4489	0,3954	0,4467
41	0,5023	0,5003	0,4441	0,4628	0,3979	0,4571
45	0,4914	0,5042	0,4538	0,4926	0,4385	0,4796

Cuadro XXVI. Promedio de los resultados de los análisis microbiológicos realizados a las distintas galletas (control y 15% EP) al inicio del almacenamiento.

Análisis	Lote #1		Lote #2		Lote #3	
	Control	15%	Control	15%	Control	15%
Mohos y levaduras	100	90	70	60	10	20
Recuento Total	1,0x10 ³	AL	7,4x10 ⁴	4,2x10 ³	3,8x10 ⁴	2,3x10 ⁴

Cuadro XXVII. Promedio de los resultados de textura de las galletas (control y 15% EP) durante el almacenamiento.

Día	Dureza (N)					
	Lote #1		Lote #2		Lote #3	
	Control	Proteína	Control	Proteína	Control	Proteína
1	20,695	16,281	18,784	12,157	21,177	21,916
6	24,407	16,772	21,148	16,904	21,498	21,922
10	23,180	23,636	17,050	19,528	22,021	16,841
15	25,609	28,911	20,051	19,009	22,068	17,777
21	23,673	24,151	18,980	16,125	20,233	22,557
27	26,398	24,151	26,398	21,283	26,617	23,579
31	33,453	22,192	22,077	19,432	28,171	21,731
37	28,832	24,517	25,537	22,818	29,253	25,582
41	27,588	25,440	24,206	21,217	25,703	25,689
45	21,618	21,995	26,553	19,075	30,915	21,271

Cuadro XXVIII. Resultados del análisis de varianza de las características fisicoquímicas y reológicas de los distintos tratamientos de galletas (Control, 15%, 25% y 30% de EP), durante el almacenamiento.

Variable Respuesta		gl	Suma de Cuadrado	Valor F	Prob>F
Aw	Día	1	0,31609276	413,8386	<0.0001*
	Tratamiento	1	0,00894260	11,7079	0.0012*
	Día*Tratamiento	1	0,00000417	0,0055	0.9414
	Lote	2	0,05113682	33,4750	<0.0001*
Porcentaje de Humedad	Día	1	41,957465	181,9893	<0.0001*
	Tratamiento	1	0,000552	0,0024	0.9612
	Día*Tratamiento	1	0,054341	0,2357	0.6293
	Lote	2	15,132011	32,8173	<0.0001*
Dureza	Día	1	255,63728	35,0866	<0.0001*
	Tratamiento	1	133,30734	18,2966	<0.0001*
	Día*Tratamiento	1	7,78569	1,0686	0.3059
	Lote	2	155,40483	10,6648	0.0001*

Cuadro XXIX. Resultados del análisis de varianza de las propiedades funcionales del EP

Variable Respuesta		gl	S.C.	Valor F	Prob>F
Índice de Solubilidad del Nitrógeno (%)	Lote	2	20,595	0,9120	0,4195
	pH		10342,031	101,7730	<0.0001*
Capacidad de Formación de Espuma (%)	Lote	2	3,0303	0,1183	0,8900
	pH	4	4774,7011	93,1968	<0.0001*
Estabilidad de la Espuma (%)	Lote	2	761,4085	0,8079	0,4791
	pH	4	3270,8820	1,7353	0,2349
Capacidad de Emulsificación	Lote	2	0,00152867	0,8968	0,4563
	pH	3	0,00339825	1,3290	0,3497
Estabilidad de la Emulsión (min)	Lote	2	199487,65	1,7133	0,2579
	pH	3	543072,40	3,1095	0,1101