



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDA ORTOLAN

CARACTERÍSTICAS PROTEICAS QUE AFETAM A QUALIDADE DO GLÚTEN VITAL  
PARA APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO

CHARACTERISTICS OF PROTEINS THAT AFFECT THE VITAL WHEAT GLUTEN  
QUALITY TO BE USED IN BREAD-MAKING

CAMPINAS

2017

FERNANDA ORTOLAN

CARACTERÍSTICAS PROTEICAS QUE AFETAM A QUALIDADE DO GLÚTEN VITAL  
PARA APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO

CHARACTERISTICS OF PROTEINS THAT AFFECT THE VITAL WHEAT GLUTEN  
QUALITY TO BE USED IN BREAD-MAKING

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in the area of FOOD TECHNOLOGY.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CAROLINE JOY STEEL

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A  
VESÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA FERNANDA ORTOLAN, E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.  
CAROLINE JOY STEEL

CAMPINAS

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 163129/2013-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Or8c      Ortolan, Fernanda, 1981-  
Características proteicas que afetam a qualidade do glúten vital para aplicação em panificação / Fernanda Ortolan. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.  
  
Orientador: Caroline Joy Steel.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
  
1. Glúten vital. 2. Qualidade proteica. 3. Panificação. I. Steel, Caroline Joy. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Characteristics of proteins that affect the vital wheat gluten quality to be used in bread-making

**Palavras-chave em inglês:**

Vital gluten

Protein quality

Bread-making

**Área de concentração:** Tecnologia de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Tecnologia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Caroline Joy Steel [Orientador]

Fernanda Maria Vanin

Flávia Maria Netto

Luiz Carlos Gutkoski

Rosiane Lopes da Cunha

**Data de defesa:** 24-04-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Tecnologia de Alimentos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

---

Profa. Dra. Caroline Joy Steel  
Universidade Estadual de Campinas  
Presidente da Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro Titular da Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Fernanda Maria Vanin  
Universidade de São Paulo  
Membro Titular da Banca Examinadora

---

Dra Elizabeth Harumi Nabeshima  
Instituto de Tecnologia de Alimentos  
Membro Suplente da Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Flavia Maria Netto  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro Titular da Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Maria Teresa Pedrosa Silva  
Clerici  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro Suplente da Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Gutkoski  
Universidade de Passo Fundo  
Membro Titular da Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Monica Ribeiro Pirozi  
Universidade Federal de Viçosa  
Membro Suplente da Banca Examinadora

A Ata da defesa da Tese com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## DEDICATÓRIA

*Dedico essa Tese à minha família, com muito amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Profa. Dra. Caroline Joy Steel pela orientação no Doutorado, que foi fundamental para o desenvolvimento do projeto e escrita da tese. Obrigada pelo apoio e encorajamento ao longo dos últimos anos.

Faço aqui um agradecimento especial ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, principalmente, à Diretora do Campus Alegrete (2013-2016), Ana Paula da Silveira Ribeiro, pelo afastamento integral das minhas atividades letivas para a minha capacitação profissional, que sem dúvidas, foi fundamental para a minha dedicação exclusiva ao desenvolvimento da tese. E ao Prof. Dr. Rodrigo Ferreira Machado, atual Diretor do Câmpus Alegrete, pela prorrogação do afastamento para fins de conclusão da tese.

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento de minha pesquisa. Aproveito para agradecer à supervisão em partes específicas do meu trabalho às Professoras Dra. Flavia Maria Netto e Dra. Rosiane Lopes da Cunha, que compartilharam comigo seus conhecimentos e enriqueceram minha tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado e suporte financeiro à tese, além das bolsas de iniciação científica fornecidas para as alunas do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Gabriela Paiva Corrêa (2014/2015) e Karoline Urbano (2015/2016). Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de iniciação científica para a aluna Karoline Urbano no ano de 2014/2015.

Agradeço muito às alunas citadas acima, Gabriela e Karoline, por toda a ajuda e dedicação que colocaram neste trabalho. Elas se mostraram pessoas e profissionais responsáveis, companheiras, dedicadas, e que encaram desafios com paciência e sabedoria. Virtudes essas que encontramos em amigos.

Um reconhecimento e agradecimento especial a todos os membros do laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Fea -

Unicamp, por sua amizade e por todo o conhecimento e sabedoria que compartilharam comigo no laboratório. Faço aqui um agradecimento especial ao Marcio, que foi Técnico Responsável durante o período experimental e grande parte do período de escrita da minha tese, por toda a sua ajuda durante a elaboração de algumas técnicas, pelas discussões pertinentes sobre resultados, mas, acima de tudo, pela sua amizade e dedicação. Também agradeço aos Professores Dra. Maria Teresa Pedrosa Silva Clerici e Dr. Yoon Kil Chang, pertencentes à área de Cereais, pelos conhecimentos, pela confiança e amizade. Embora sinta medo de esquecer alguns nomes de colegas queridos, arrisco-me a citar alguns que fizeram diferença em minha vida: Georgia, Lara, Amanda N., Thais (Pós-Doc), Eveline (Pós-Doc), Ludmilla, Mária, Thaisa, Flavio, Ulliana, Amanda R., Elisa, Adriana, Michele, Aline.

Agradeço aos amigos (especialmente, Ana Laura, Amanda R., Fernanda M., Wellington, Adriana L., Adriana M., Alexandre, Taiana) por todo apoio e carinho, e às minhas amigas de Santa Maria (Tatiana, Andressa, Lidianne, Maria Fernanda, Monique, Michele, Helena, e tantas outras), que mesmo distantes sempre estiveram ao meu lado me apoiando. Vocês são muito importantes para mim e sinto saudades!

Eu gostaria de expressar minha mais profunda gratidão à minha família, meu pai Aido, minha mãe Ivone, meus irmãos Julianio e Daniel, minhas cunhadas Angela e Francieli e meus sobrinhos Giovane e Paulo, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado. Pelo seu amor, apoio e entusiasmo em todos os aspectos de minha vida, que vocês sempre compartilharam comigo, MUITO OBRIGADA. Sem vocês eu não seria ninguém!!

Quero fazer um agradecimento muito especial ao meu marido, Augusto Adelino Ramos, do fundo do meu coração, por estar sempre comigo, por ajudar na construção desta tese, pelo seu encorajamento me fazendo acreditar e nunca desistir dos meus sonhos, e pelo seu contínuo amor. Você me ajudou a atravessar momentos difíceis, com muito amor e dedicação, colocando sempre um sorriso em meu rosto. Encontrei ao seu lado mil razões para ser feliz! MUITO OBRIGADA meu amor, você é um presente que a vida me deu. Te amo!

## RESUMO

O glúten vital (GV), extraído da farinha de trigo, é um ingrediente importante para a indústria de panificação, sendo utilizado, especialmente, para a fortificação de farinhas que são consideradas fracas para a elaboração de pães, em especial, pães ricos em fibras, através da suplementação de gliadinas e gluteninas à farinha de trigo. Porém, quando comercializado, o GV apresenta poucas informações de qualidade, principalmente, a respeito de suas proteínas, que interferem diretamente na utilização deste produto. Este trabalho teve por objetivo avaliar as proteínas de dois glútenos vitais de diferentes origens (GVA e GVB), e o efeito destas proteínas sobre as propriedades viscoelásticas da massa de farinha de trigo (FT) fortificada com 5 e 7 g/ 100g de GVA ou GVB, e a qualidade de pães elaborados com essas farinhas, durante sua vida de prateleira. Além disso, este trabalho também foi desenvolvido para avaliar a qualidade do GV comercial, correlacionando esses dados com os demais resultados obtidos neste trabalho. Os resultados mostraram pequenas diferenças nas características químicas e estruturais avaliadas de GVA e GVB, com exceção ao fracionamento das proteínas que mostrou diferenças significativas, especialmente, no teor de gliadinas encontrado, revelando que GVA apresentou quantidades semelhantes de gliadinas e gluteninas na sua constituição. Os resultados reológicos fundamentais e empíricos demonstraram que GVA, sob hidratação, formou uma rede de glúten mais elástica que GVB. Os pães elaborados com farinha de trigo fortificada com GVA ou GVB apresentaram características de firmeza menor que o pão elaborado com FT, resultando em pães mais macios, mesmo durante a vida de prateleira deste produto de 9 dias. O pão elaborado com 7 g/100 g de GVA apresentou o melhor resultado de volume específico, enquanto os demais pães oriundos da fortificação de 5 g/100 g de GVA e 5 e 7 g/100 g de GVB não apresentaram diferenças significativas nesse aspecto em relação ao pão controle (elaborado com FT). Os testes de qualidade do GV apresentaram resultados que ratificaram os resultados anteriores, e mostraram que GVA apresentou uma rede de glúten mais elástica (pelo teste de extensibilidade) e que suportou maior pressão dos gases na expansão da bola de glúten (pelo teste de expansão) que GVB. O teste de correlação mostrou relações importantes entre os testes simples do GV, e os testes reológicos da massa e de qualidade dos pães elaborados com 7 g/100 g de GV, comprovando que a qualidade viscoelástica deste produto pode ser medida de maneira mais rápida e de menor custo. Este trabalho revelou a importância de maiores informações sobre a qualidade da proteína de glúten vitais para sua comercialização como ingrediente para a panificação.

## ABSTRACT

The vital gluten (VG), extracted from wheat flour, is an important ingredient in the baking industry and is used especially for the wheat flour fortification that are considered weak for the bread preparation, especially those rich in fiber, by supplementation of gliadins and glutenins on wheat flour. However, when marketed, the VG has few quality information, especially about their proteins, which directly interferes in the use of this product. This work aimed to evaluate the proteins of commercial vital glutens (VGA and VGB), and the effect of these proteins on the viscoelastic properties of dough obtained from wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of VGA and VGB, and the quality of breads elaborated with these flours, during its shelf life. Furthermore, this work has also been developed to assess the quality of the commercial VG through simple tests, correlate such data with other results of this study. The results showed small differences in the chemical and structural characteristics evaluated for VGA and VGB, except for the proteins fractionation that showed significant differences, especially in the content of gliadins found, revealing that VGA presented similar amounts of gliadins and glutenins in their constitution. Results from the fundamental and empirical rheological tests showed that VGA, upon hydration, has formed a more elastic gluten network than VGB, nevertheless VGB showed better viscoelastic properties than the dough prepared with control wheat flour (CFW). Breads made with wheat flour fortified (VGA and VGB) showed lower firmness characteristics than bread made with WFC, resulting in softer crumb bread, even during its shelf life. The bread prepared with 7 g/100 g VGA showed the best result of specific volume, while the others come from bread fortification with 5 g/100 g VGA and 5 and 7 g/100 g VGB did not differ in this respect in relation to the control bread (prepared with WFC). Simple tests showed results that have ratified the previous results and showed that VGA presented a more elastic gluten network (by the extensibility test) and that sustained higher gas pressure in the gluten ball expansion (by expansion test) than VGB. The correlation test showed important relationships between the simple tests of VG, and the rheological tests of the dough and quality parameters of the breads made with 7 g/100 g VG, proving that the viscoelastic quality of this product can be measured faster and with lower cost. This work revealed the importance of details on the protein quality of vital glutens for its commercialization.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                                            | 15 |
| 2. DOCUMENTOS PUBLICADOS E/OU A PUBLICAR .....                                                                       | 19 |
| ARTIGO I. ....                                                                                                       | 19 |
| I. Protein Characteristics that Affect the Quality of Vital Wheat Gluten to Be Used in Baking: A Review.....         | 20 |
| Abstract .....                                                                                                       | 20 |
| I.1. Introduction.....                                                                                               | 20 |
| I.2. Vital wheat gluten .....                                                                                        | 22 |
| I.2.1. Gluten.....                                                                                                   | 22 |
| I.2.2. Gluten proteins.....                                                                                          | 24 |
| I.2.2.1. Gliadins .....                                                                                              | 24 |
| I.2.2.2. Glutenins .....                                                                                             | 25 |
| I.2.3. The gluten network in the bread-making .....                                                                  | 26 |
| I.2.3.1. The role of gluten proteins in the mixing process.....                                                      | 26 |
| I.2.3.2. The role of gluten proteins in proofing .....                                                               | 29 |
| I.2.3.3. The role of gluten proteins in baking .....                                                                 | 31 |
| I.3. Chemical composition of commercial vital wheat gluten.....                                                      | 32 |
| I.4. Vital wheat gluten uses .....                                                                                   | 32 |
| I.5. Vital wheat gluten production.....                                                                              | 34 |
| I.5.1. Fractionation of wheat flour.....                                                                             | 35 |
| I.5.2. Drying step.....                                                                                              | 36 |
| I.6. Vital wheat gluten quality assessment .....                                                                     | 37 |
| I.7. Conclusions.....                                                                                                | 42 |
| References .....                                                                                                     | 42 |
| ARTIGO II. ....                                                                                                      | 55 |
| II. Características químicas e estruturais de proteínas de glúten vital de diferentes origens para panificação ..... | 56 |
| Resumo.....                                                                                                          | 56 |
| II.1. Introdução.....                                                                                                | 56 |
| II.2. Materiais e Métodos .....                                                                                      | 59 |
| II.2.1. Materiais .....                                                                                              | 59 |
| II.2.2. Métodos .....                                                                                                | 59 |
| II.2.2.1. Obtenção de glúten não vital .....                                                                         | 59 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.2.2.2. Composição química e aminoacídica .....                                      | 59 |
| II.2.2.2. Fracionamento sequencial das proteínas .....                                 | 60 |
| II.2.2.3. Avaliação das interações químicas .....                                      | 60 |
| II.2.2.3.1. Solubilidade proteica em diferentes solventes.....                         | 60 |
| II.2.2.3.2. Avaliação dos grupos SH/SS.....                                            | 61 |
| II.2.2.4.Eletroforese.....                                                             | 61 |
| II.2.2.5. SEC-HPLC .....                                                               | 62 |
| II.2.2.6. Análise por espectroscopia no FTIR.....                                      | 63 |
| II.2.2.7. Avaliação microscópica da superfície – MEV .....                             | 63 |
| II.2.3. Análise estatística .....                                                      | 64 |
| II.3. Resultados e Discussão.....                                                      | 64 |
| II.3.1. Composição química e aminoacídica .....                                        | 64 |
| II.3.2. Composição relativa das frações proteicas .....                                | 65 |
| II.3.3. Avaliação das interações químicas .....                                        | 68 |
| II.3.4. Perfil das proteínas por tamanho molecular .....                               | 71 |
| II.3.4.1. SDS-PAGE .....                                                               | 71 |
| II.3.4.2. SEC-HPLC .....                                                               | 73 |
| II.3.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....               | 74 |
| II.3.6. Avaliação microscópica da superfície da rede de glúten.....                    | 76 |
| II.4. Conclusões.....                                                                  | 77 |
| Referências .....                                                                      | 77 |
| ARTIGO III.....                                                                        | 83 |
| III. Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride ..... | 84 |
| Abstract .....                                                                         | 84 |
| III.1. Introduction .....                                                              | 84 |
| III.2. Materials and methods .....                                                     | 86 |
| III.2.1. Material .....                                                                | 86 |
| III.2.2. Methods.....                                                                  | 86 |
| III.2.2.1. Sample codes.....                                                           | 86 |
| III.2.2.2. Gluten reconstitution and wet gluten preparation .....                      | 87 |
| III.2.2.3. Rheological measurements.....                                               | 88 |
| III.2.2.3.1. Calculation of power law parameters.....                                  | 88 |
| III.2.3 Statistical analysis .....                                                     | 88 |
| III.3. Results and discussion.....                                                     | 89 |

|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.3.1. Fundamental rheological measurements .....                                                        | 89  |
| III.3.1.1. Strain sweep .....                                                                              | 89  |
| III.3.1.2. Frequency sweep .....                                                                           | 91  |
| III.3.1.3. Temperature sweep .....                                                                         | 95  |
| III.3.2. Empirical rheological measurements .....                                                          | 97  |
| III.4. Conclusions .....                                                                                   | 100 |
| References .....                                                                                           | 100 |
| ARTIGO IV. ....                                                                                            | 105 |
| IV. Technological characteristics of vital wheat gluten from different origins used for bread making ..... | 106 |
| Abstract .....                                                                                             | 106 |
| IV.1. Introduction.....                                                                                    | 106 |
| IV.2. Material e Methods .....                                                                             | 108 |
| IV.2.1. Material .....                                                                                     | 108 |
| IV.2.2. Methods.....                                                                                       | 108 |
| IV.2.2.1. Chemical composition.....                                                                        | 108 |
| IV.2.2.2 Empirical rheological tests.....                                                                  | 109 |
| IV.2.2.2.2. $\alpha$ -amylase activity .....                                                               | 109 |
| IV.2.2.2.3. Farinograph parameters.....                                                                    | 109 |
| IV.2.2.2.4 Alveograph parameters .....                                                                     | 109 |
| IV.2.2.2.5 Thermomechanical properties .....                                                               | 109 |
| IV.2.2.3. Baking test .....                                                                                | 110 |
| IV.2.2.4. Pan bread quality tests.....                                                                     | 111 |
| IV.2.2.4.1. Bread quality tests on the production day (day 1).....                                         | 111 |
| IV.2.2.4.2. Quality testing of bread during shelf life (days 1, 4 and 9).....                              | 111 |
| IV.2.2.5. Statistical analysis .....                                                                       | 112 |
| IV.3. Results and Discussions .....                                                                        | 112 |
| IV.3.1. Chemical composition.....                                                                          | 112 |
| IV.3.2 Technological analysis.....                                                                         | 113 |
| IV.3.2.1. Wet and dry gluten contents and gluten index .....                                               | 113 |
| IV.3.2.2. Falling Number .....                                                                             | 115 |
| IV.3.2.3. Farinograph parameters.....                                                                      | 115 |
| IV.3.2.4. Alveograph parameters .....                                                                      | 115 |
| IV.3.2.5. Thermomechanical properties.....                                                                 | 116 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IV.3.3. Baking test and evaluation of bread quality .....                                                                     | 118 |
| IV.3.3.1. Physical-chemical analyses of bread on production day (day 1) .....                                                 | 118 |
| IV.3.3.2. Physical-chemical analyses of bread during its shelf life (days 1, 4 and 9).....                                    | 121 |
| IV.3.3.3. Image analysis of bread crumb .....                                                                                 | 122 |
| IV.4. Conclusions .....                                                                                                       | 124 |
| References .....                                                                                                              | 125 |
| ARTIGO V.....                                                                                                                 | 130 |
| V. Testes simples utilizados como ferramentas para avaliação de glúten vital.....                                             | 131 |
| Resumo.....                                                                                                                   | 131 |
| V.1. Introdução.....                                                                                                          | 131 |
| V.2. Material e Métodos.....                                                                                                  | 134 |
| V.2. 1. Material .....                                                                                                        | 134 |
| V.2.2. Métodos .....                                                                                                          | 134 |
| V.2.2.1. Preparo do glúten.....                                                                                               | 134 |
| V.2.2.2. Lavagem manual do glúten .....                                                                                       | 134 |
| V.2.2.3. Teores e índice de glúten.....                                                                                       | 135 |
| V.2.2.4. Teste simples de extensibilidade .....                                                                               | 135 |
| V.2.2.5. Teste de expansão.....                                                                                               | 135 |
| V.2.3. Análise estatística .....                                                                                              | 136 |
| V.3. Resultados e Discussão .....                                                                                             | 136 |
| V.3.1. Características tecnológicas dos glúten vitais medidas por testes simples .....                                        | 136 |
| V.3.1.1. Avaliação da quantidade e da qualidade do glúten.....                                                                | 136 |
| V.3.1.2. Avaliação da extensibilidade por teste simples .....                                                                 | 137 |
| V.3.1.3. Avaliação da qualidade pelo teste de expansão.....                                                                   | 140 |
| V.3.2. Correlação entre os testes simples e parâmetros tecnológicos dos glúten vitais.....                                    | 141 |
| V.4. Conclusões .....                                                                                                         | 143 |
| Referências .....                                                                                                             | 144 |
| 3. DISCUSSÃO GERAL .....                                                                                                      | 148 |
| 3.1. Características químicas e estruturais dos glúten vitais .....                                                           | 148 |
| 3.2. Reologia fundamental x reologia empírica .....                                                                           | 151 |
| 3.3. Características tecnológicas das massas e dos pães elaborados com fortificação da farinha de trigo com glúten vital..... | 154 |
| 3.4. Testes simples para avaliar a qualidade tecnológica do glúten vital .....                                                | 159 |
| 3.5. Teste de correlação.....                                                                                                 | 161 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 4. CONCLUSÃO GERAL .....   | 163 |
| 5. REFERÊNCIAS GERAIS..... | 164 |
| ANEXOS.....                | 187 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O glúten vital é um concentrado proteico que contém, no mínimo, 60 % (base seca) de proteína na sua constituição (BRASIL, 2005). É extraído da farinha de trigo, em um processo de separação do amido e demais constituintes solúveis por via úmida. No processo de extração do glúten vital, ocorre a formação de uma massa pela hidratação da farinha de trigo associada ao trabalho mecânico. Após a etapa de mistura, a massa é lavada com água para retirada dos compostos solúveis e do amido, restando, principalmente as proteínas insolúveis (gliadinas e gluteninas), que formam a rede de glúten, responsáveis pela sua viscoelasticidade (MARCHETTI et al., 2012).

Devido à alta umidade, o glúten úmido é seco, reduzindo seu conteúdo de água para níveis abaixo de 10 %. A secagem é uma etapa crítica no processo de extração, pois a temperatura pode levar à modificação estrutural das proteínas do glúten seco e perda de suas propriedades viscoelásticas (DAY et al., 2006). Para ser comercializado, o glúten vital é moído e acondicionado em embalagens, que podem ser plásticas ou de papel.

O glúten seco é chamado de “glúten vital de trigo”, produto que, após sua hidratação, consegue recuperar suas propriedades viscoelásticas, que dependem da farinha de trigo que o originou. Entretanto, em virtude do processo de obtenção do glúten vital, suas proteínas não conseguem recuperar totalmente suas características de extensibilidade e elasticidade quando hidratado. A modificação estrutural das proteínas do glúten vital pode ser mecânica (pelo processo de mistura da massa) ou térmica (pelo processo de secagem do glúten úmido). Além disso, quando o glúten obtido do processo de extração não recupera suas características viscoelásticas após hidratação, é chamado de “glúten não vital de trigo”, que pode ser utilizado apenas para aumento da absorção de água e teor proteico em produtos alimentícios e não alimentícios.

Muitos são os usos de glúten vital na indústria alimentícia (pães de forma, pães ricos em fibra, análogos de carne) e não alimentícia (biofilmes, ração para animais). Porém, o principal mercado deste produto é as indústrias de panificação e padarias. Na indústria de panificação, o glúten vital é utilizado para fortificar farinhas de trigo consideradas fracas na elaboração de massas alimentícias e pães, em especial, aqueles que necessitam de farinhas fortes para suportar o processo e/ou a adição de outros ingredientes em sua formulação, como por exemplo, pães ricos em fibras ou panetones. Nos moinhos, o glúten vital pode ser empregado para garantir a padronização das farinhas produzidas a partir de trigos de diferentes origens e/ou qualidades. Geralmente, a sua adição ocorre dentro de uma faixa de 2

a 10 g/100 g (base farinha) (DAY et al., 2006), sendo 5 g/100 g a quantidade mais frequentemente utilizada.

Quando comercializado, o glúten vital apresenta poucas informações sobre a sua qualidade. Nos laudos, são apresentados resultados de análises físico-químicas (teores de umidade, proteína total, cinzas e gordura), microbiológicas (bolores e leveduras, *Escherichia coli* e *Salmonella*), propriedades funcionais (capacidade de se ligar a água) e descrição de sua aparência (cor e odor). No entanto, a indústria de panificação requer maiores informações a respeito das proteínas que constituem o glúten vital.

Sabe-se que a qualidade viscoelástica deste produto está associada às suas proteínas, gliadinas e gluteninas (DELCOUR et al., 2012), que interagem entre si, formando a rede de glúten, capaz de reter os gases formados nas etapas de fermentação e forneamento, além de fornecer estrutura e textura aos produtos finais.

As proteínas do glúten são misturas complexas de proteínas heterogêneas, que apresentam características de solubilidade e características viscoelásticas únicas dentre as proteínas vegetais. As gliadinas são proteínas monoméricas com massa molecular que varia de 30.000 a 80.000 Da, e conferem propriedades de viscosidade e de formação de espuma à massa; são, portanto, responsáveis pela extensibilidade da rede de glúten (WIESER, 2007; DELCOUR et al., 2012; WANG et al., 2015). As gliadinas podem ser classificadas de acordo com a sua mobilidade eletroforética e sequência de aminoácidos em  $\alpha/\beta$ -,  $\omega$ -,  $\gamma$ -gliadinas e gliadinas de alta massa molecular (*high-molecular-weight* - HMW) (DELCOUR et al., 2012). As gliadinas, de um modo geral, apresentam estrutura globular.  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ -gliadinas e HMW-gliadinas são proteínas ricas em aminoácidos sulfurados e apresentam ligações dissulfeto (SS) intramoleculares, enquanto as  $\omega$ -gliadinas, pobres em aminoácidos sulfurados e não formam pontes dissulfeto, porém apresentam maior massa molecular (46.000 a 74.000 Da) que as  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas (WIESER, 2007).

As gluteninas são proteínas poliméricas, compostas de agregados proteicos, com ligações dissulfeto (SS) intramoleculares, além da existência de ligações SS intermoleculares entre suas subunidades individuais, resultando em proteínas de alta massa molecular (de  $1 \times 10^5$  a vários milhares de Da) (WIESER, 2007; DELCOUR et al., 2012). De acordo com a massa molecular, são classificadas em subunidades de gluteninas de alta massa molecular (*high-molecular-weight* – HMW-GS) e de baixa massa molecular (*low-molecular-weight* – LMW-GS). As gluteninas são responsáveis pela elasticidade da rede de glúten, oferecendo resistência à extensão às massas obtidas com farinha de trigo (WANG et al., 2015). Tanto as gliadinas quanto as gluteninas são consideradas proteínas hidrofóbicas, isto é, insolúveis em

água e soluções diluídas de NaCl; por isso, facilmente separadas da farinha de trigo, mesmo através de lavagem manual (DELCOUR et al., 2012).

A rede de glúten é formada pela interação entre gliadinas e gluteninas quando hidratadas e submetidas ao trabalho mecânico. A interação entre essas proteínas ocorre por ligações covalentes (ligações dissulfeto e ligações cruzadas de tirosina) ou ligações não covalentes (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, e interações eletrostáticas). O modo como essas interações ocorrem resulta em uma rede com características viscoelásticas adequadas para a panificação. Portanto, os tipos de gliadinas e gluteninas presentes no glúten, bem como a quantidade dessas proteínas influenciam na qualidade da rede de glúten que será formada. Desta forma, uma avaliação química, estrutural e funcional das proteínas que constituem os glúten vitais comerciais é importante para a definição da qualidade viscoelástica deste produto.

A indústria de panificação, usualmente, utiliza testes de panificação para avaliar a qualidade do glúten vital adquirido. O resultado mais utilizado para medir a vitalidade é a alteração no volume do pão elaborado com farinha de trigo fortificada com glúten vital (GUERRIERI; CERLETTI, 1996). Este é um procedimento complexo para o uso industrial de rotina, já que o glúten da própria farinha pode interferir na qualidade do pão (WADHAWAN; BUSHUK, 1989), além do grande tempo para realização desta análise. Outros ensaios para avaliar a vitalidade são a absorção de água pelo glúten e a extensibilidade do glúten hidratado, porém, estas análises não fornecem todas as informações necessárias para a avaliação de sua qualidade (DUA et al., 2009).

Inúmeros testes físico-químicos e tecnológicos podem ser utilizados para avaliar a qualidade do glúten vital. Dentre esses testes, os mais comuns são o teor de proteínas e os testes de reologia empírica, que envolvem as análises de farinografia, alveografia, extensografia, teores e índice de glúten através do Glutomatic<sup>®</sup>, e, mais recentemente, o uso de Mixolab, equipamento que mede as características termomecânicas das massas. Além disso, os testes reológicos fundamentais têm sido utilizados em estudos científicos para a avaliação do comportamento elástico da rede de glúten.

Alguns problemas associados aos testes de qualidade envolvem a grande demanda de tempo para a sua realização, bem como a exigência de pessoal treinado para trabalhar com os equipamentos específicos e também a complexidade na interpretação dos resultados. Por isso, testes tecnológicos simples podem ser usados para avaliar a qualidade viscoelástica do glúten vital, reduzindo o tempo tornando mais fácil a interpretação dos resultados, auxiliando a indústria de panificação na definição da quantidade de glúten vital a ser utilizado em

diferentes tipos de produtos, o que tem sido um desafio. Desta forma, são necessárias informações químicas, físico-químicas e tecnológicas sobre a natureza do glúten vital, pois, ele é comercializado sem uma descrição detalhada da sua qualidade. Por isso, o objetivo geral desta Tese foi avaliar as características das proteínas de glúten vitais comerciais de diferentes origens que afetam a qualidade viscoelástica deste produto quando utilizado na panificação, em especial na elaboração de pão de forma. Os objetivos específicos deste trabalho estão inseridos dentro dos artigos apresentados na Tese de Doutorado, apresentados abaixo:

- ✓ Artigo 1 - Realizar uma ampla revisão sobre as proteínas que constituem o glúten vital, dando ênfase aos efeitos dessas proteínas no processo de panificação, e verificar quais análises podem ser realizadas para avaliação de sua qualidade viscoelástica.
- ✓ Artigo 2 - Caracterizar os glúten vitais comerciais em relação à composição química, composição aminoacídica, tipos de proteínas que os constituem e estrutura proteica, comparando-os com glúten não vital, produzido em escala laboratorial.
- ✓ Artigo 3 - Estudar as propriedades viscoelásticas da rede de glúten dos glúten vitais comerciais através de testes reológicos fundamentais, e também, avaliar o efeito de glúten vital de diferentes origens nas propriedades reológicas fundamentais da massa de farinha de trigo fortificada em diferentes dosagens, e comparar os resultados da reologia fundamental com os resultados de extensografia (teste de reologia empírica).
- ✓ Artigo 4 - Caracterizar farinhas fortificadas com diferentes dosagens dos glúten vitais comerciais do ponto de vista tecnológico, pelo uso de testes reológicos empírico, e também pelo desenvolvimento e avaliação de pães durante sua vida de prateleira.
- ✓ Artigo 5 - Utilizar testes simples para prever a qualidade viscoelástica dos glúten vitais comerciais, e correlacionar os resultados obtidos com parâmetros tecnológicos das massas e dos pães produzidos com farinha de trigo fortificada com 7 g/100 g de glúten vital, para definir se os testes simples podem prever o comportamento viscoelástico de glúten vitais comerciais.

## **2. DOCUMENTOS PUBLICADOS E/OU A PUBLICAR**

### **ARTIGO I.**

---

#### **Protein Characteristics that Affect the Quality of Vital Wheat Gluten to Be Used in Baking: A Review**

Ortolan, Fernanda; Steel, Caroline Joy

Accepted on February 1st, 2017, and available online on March 2nd, 2017 in  
Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety

doi: 10.1111/1541-4337.12259

(Anexo 1)

## **I. Protein Characteristics that Affect the Quality of Vital Wheat Gluten to Be Used in Baking: A Review**

Ortolan, Fernanda; Steel, Caroline Joy

### **Abstract**

The use of vital wheat gluten in the baking industry and wheat flour mills aims to improve the rheological characteristics of flour considered unsuitable to obtain products such as sliced bread, French bread, high-fiber breads, and other products that require strong flours. To improve characteristics such as flour strength, dough mixing tolerance, and bread volume, vital wheat gluten is added to flour at levels that can vary from 2 to 10% (flour basis), with 5% being a commonly used dosage. However, the vital wheat gluten commercialized in the market has few quality specifications, especially related to the characteristics of the proteins that constitute it and are responsible for the formation of the viscoelastic gluten network. Information on protein quality is important, since variations are observed in the technological quality of vital wheat gluten obtained from different sources, which could be associated to damage caused to proteins during the obtainment process. Several tests, either physical-chemical analyses or rheological tests, are carried out to establish gluten quality; however, they are sometimes time-consuming and costly. Although these tests give good answers to specify gluten quality, flour mills and the baking industries require fast and simple tests to evaluate the uses and/or dosage of vital gluten addition to wheat flour. This review covers the concepts, uses, obtainment processes, and quality analysis of vital wheat gluten, as well as simple tests to help identify details about protein quality of commercial vital wheat gluten.

**Keywords:** vital wheat gluten, gluten proteins, chemical properties, protein structure, technological quality.

### **I.1. Introduction**

Vital wheat gluten is marketed as an ingredient for the bakery industry and is usually added to weak wheat flour of poor bread-making quality (Weegels and others 1994a; Esteller and others 2005; Marchetti and others 2012) to improve its viscoelastic properties, or it is incorporated in bread formulations where the gluten from wheat flour is diluted, as flour including bran. Usually, the vital wheat gluten commercialized is not classified according to its protein profile or quality. However, it is expected that gluten quality influences dough

quality (Marchetti and others 2012), since the technological characteristics from different vital glutens can vary widely between them (Weegels and others 1994a).

Even though the vital wheat gluten added to wheat flour improves bread quality characteristics, it does not always retain its technological properties from the wheat flour from which it was obtained (Miller and Hoseney 1999; van der Zalm and others 2011). Additionally, the determination of chemical, physical, and technological properties of vital gluten can improve its specifications to reach better bread-making performance when added to flours.

Vital gluten can be produced from different extraction methods, starting with the separation of wheat flour into starch and gluten, its main constituents, and ending with a drying step (van der Borgh and others 2005). There are many process factors that influence the quality of the vital gluten obtained, such as the partial or total development of gluten network in the dough-mixing step, which could have a deleterious effect on the gluten viscoelasticity. Therefore, the gluten-drying step seems to be the most critical (Wadhawan and Bushuk 1989; Guerrieri and Cerletti 1996; Marchetti and others 2012), due to two facts: (i) protein denaturation when temperatures above 70 °C are used to dry the vital gluten (Guerrieri and others 1996) and (ii) quick microbiological deterioration of gluten when kept in a wet state (van der Zalm and others 2011), as a result of endogenous and exogenous proteolytic action, making it inappropriate for application in the industry.

The processing conditions can be varied, leading to alterations in vital wheat gluten quality, but these variations are not only a result of the production process, but also of the wheat variety selected to produce vital gluten (Marchetti and others 2012). A cultivar suitable for processing must have high protein content and be economically viable for the entire wheat production chain. On the other hand, considering protein content as the only quality parameter for the choice of wheat grain or wheat flour is not suitable, as sometimes high protein content in the grain does not reflect in flour with good bread-making quality. A suitable flour for bread-making should present gluten strength (W) with a minimum value of  $220 \times 10^{-4} \text{J}$  (measured by an alveograph), stability with a minimum value about 7 min (measured by a farinograph), and a Falling Number of 220 seconds (Cocchi and others 2005; Pizzinato 1997; Roussel and Chiron 2005). When wheat flour does not present good quality for bread-making, it can be supplemented with vital gluten, in order to improve its viscoelastic properties.

Vital wheat gluten manufacturers supply this product with few quality descriptors; quality parameters normally presented are related to product appearance (color and odor), chemical composition (moisture, protein, ash, and lipid contents), water-binding capacity, and

microbiological aspects (total plate count, coliforms, yeasts, and molds, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella*).

The milling and bakery industry commonly uses practical baking tests to evaluate vital wheat gluten quality (Guerrieri and Cerletti 1996). Therefore, more information on the chemical, physicochemical, and technological properties of vital gluten is necessary, because, currently, it is sold with no description of its quality. Besides that, simple tests should be developed to reduce costs and time to evaluate gluten technological quality.

Knowledge of the relationship of vital wheat gluten chemical and structural characteristics with technological properties may permit establishing criteria for its selection for use in bakery products. This review describes concepts, uses, and obtainment processes of vital wheat gluten, as well as analyses that permit assessing this relationship, focusing on the quality of gluten proteins.

## **I.2. Vital wheat gluten**

Vital wheat gluten is a protein concentrate (approximately 80% protein) obtained from wheat flour (Tedrus and others 2001; Majzoobi and Abedi 2014), and it can be used to fortify flours considered weak for bread-making (Bietz and Lookhart 1996). It is a beige to light-brown powder.

According to the International Wheat Gluten Association (IWGA), gluten can be marketed in two forms: “nonvital” and “vital”. Nonvital wheat gluten is gluten that has been subjected to irreversible denaturation and, therefore, cannot be “revived” (Tedrus and others 2001). It is usually used for protein enrichment, but not for its viscoelastic properties. On the other hand, vital wheat gluten, when in contact with water, can be rapidly hydrated and recover its viscoelastic properties (elasticity and extensibility), due to gliadins and glutenins, which form the gluten network.

### **I.2.1. Gluten**

According to the Codex Alimentarius, “gluten is a protein fraction of wheat, rye, barley, or their crossed varieties and derivatives thereof, being insoluble in water and NaCl 0.5 mol L<sup>-1</sup>” (Codex Alimentarius 2008). In 2013, the U.S. Food and Drug Administration defined gluten as “proteins that occur naturally in these same grains and can cause adverse health effects in people with celiac disease” (FDA 2013). However, there are other definitions that establish gluten as a protein network formed from covalent (disulfide bond) and non-covalent interactions between gliadin and glutenin chains present in flour from wheat, rye,

and barley grains. The main non-covalent interactions involved in gluten network development are hydrogen bonds, ionic bonds and hydrophobic interactions (Wang and others 2017; Wieser 2007). The development occurs during the mixing of flour and water, associated with mechanical energy to give a cohesive dough with viscoelastic characteristics used for the preparation of bakery products such as breads and some types of biscuits, as well as pasta products (Shewry and Tatham 1997; Shewry and Halford 2002; van der Borgh and others 2005; Xu and others 2007; Wieser 2007; Koehler and others 2010; Delcour and others 2012; Melnyk and others 2012; McCann and Day 2013; Khatkar and others 2013; Singh and Singh 2013; Majzoobi and Adebí 2014; Tuhumury and others 2014; Zhou and others 2014).

Making up 80–90% of the proteins in the flour, these proteins consist of gliadins and glutenins, which are hydrophobic. Gliadins are considered soluble in alcohol-water solutions (typically 60-70% v/v of ethanol), while glutenins are soluble in this medium in the presence of another chemical compound such as dilute acid, ionic detergents (sodium dodecyl sulfate - SDS), urea, or/and  $\beta$ -mercaptoethanol or dithiothreitol (disulfide-reducing agents). This fact occurs because of its intermolecular disulfide bonds (Payne and others 1984; Shewry and others 2002; van der Borgh and others 2005; Wieser 2007; Delcour and others 2012; Wang and others 2015). Gliadins and glutenins are synthesized in the endosperm within the wheat grain and are similar in their amino acid contents, although they are different in the amino acid sequence (Ewart 1967; Shewry and others 2002; Mamone and others 2005; Wieser 2007). According to Ewart (1967), gliadins have more proline, glutamine (+ glutamic acid), isoleucine, and phenylalanine, while glutenins have more glycine, lysine and tryptophan than gliadins. Nevertheless, there are major chemical and physical differences between gliadins and glutenins which have important effects on their functional characteristics (Osborne 1907; Callejo and others 1999; Delcour and others 2012; Robertson and others 2013; Majzoobi and Adebí 2014). These protein groups are responsible for the gluten network development that provides the structure of bakery products, due its viscoelastic characteristics (Shewry and Tatham 1997; Shewry and Halford 2002; van der Borgh and others 2005; Xu and others 2007; Wieser 2007; Koehler and others 2010; Delcour and others 2012; Melnyk and others 2012; McCann and Day 2013; Khatkar and others 2013; Singh and Singh 2013; Majzoobi and Adebí 2014; Tuhumury and others 2014). The technological importance of wheat is associated with its capacity to develop an extensible and cohesive dough (Wang and others 2015), from wheat flour, water, and other ingredients incorporated in the bread baking process. The viscoelastic properties of gluten are related to protein quantity and quality. These properties influence bakery product quality, such as expansion, shape, and texture. Both

quality and quantity of gluten proteins affect processing quality (Singh and Singh 2013). Variation in protein content alone is not responsible for the differences in dough properties and suitability for the production of different end-products (Zhu and Khan 2002). Gluten protein quality is fundamental in bread-making, as dough processing performance depends on its viscoelastic properties. These properties are a consequence of the type of gliadins and glutenins (insoluble proteins) present in the flour.

Gliadins assume the role of acting as plasticizers for glutenin, and thus increase the viscosity of the dough (Delcour and others 2012) and decrease the high level of elasticity conferred by glutenin. Therefore, an appropriate balance between gliadin and glutenin is a determinant in gluten rheology (Melnik and others 2012).

## I.2.2. Gluten proteins

### I.2.2.1. Gliadins

Gliadins are the main prolamins found in wheat. Most of them are monomeric proteins, and they represent a heterogeneous group due to variations in the primary amino acid sequence, enabling a classification of these proteins into 3 subunits (Shewry and Halford 2002; Mamone and others 2005; Wieser 2007; Delcour and others 2012; Khatkar and others 2013; Majzoobi and Adebati 2014; Tuhumury and others 2014): *Gliadins poor in sulfur amino acids (S-poor)*: this group is represented by  $\omega$ -gliadin, monomers with a molecular weight from 30,000 to 75,000; *Gliadins rich in sulfur amino acids (S-rich)*: this group is represented by  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -gliadin monomers with a molecular weight from 30,000 to 45,000; and *High-molecular-weight gliadins (HMW-gliadins)*: polymers that are often classified into the fraction of low-molecular-weight glutenin, although they are soluble in alcohol. The monomeric chains are connected by disulfide bonds, and their molecular weights vary from 100,000 to 500,000 (Wieser 2007).

Since gliadins are classified into 3 distinct subunit groups, they may present small structural differences amongst them. According to Wieser (2007), Lagrain and others (2008), and Delcour and others (2012),  $\omega$ -gliadins contain higher proline and glutamine contents in their structure, and fewer cysteine residues, thus preventing the formation of disulfide bonds. The  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -gliadins present lower amounts of proline and glutamine, and cysteine residues are all involved in intramolecular disulfide bonds (SS).

Studies on the secondary structure of gliadins (Shewry and Tatham 1997; Wieser 2007) have reported that in the N-terminal domain, where there are repeated sequences of amino acids, there is a predominance of the  $\beta$ -turn structure, and in the C-terminal domain,

where no repeated sequence of amino acids occurs, there are predominantly  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures.

Gliadins, upon hydration, behave as a viscous liquid, providing dough extensibility (Khatkar and others 2013). A balance between extensibility and elasticity (or resistance to extension) (Melnik and others 2012) is of interest for the gluten network functionality in bread. Song and Zheng (2008) claim that greater amounts of gliadin in wheat flour may contribute to decreases of mixing time and dough stability, as a consequence of a weakening of the protein network, resulting in weak doughs, suitable for biscuit production, for example.

#### I.2.2.2. Glutenins

Glutenins are classified, due to their solubility, as glutelins, and consist of *high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS)* and *low-molecular-weight glutenin subunits (LMW-GS)* (Lagrain and others 2008).

The LMW-GS have molecular weights from 30,000 to 45,000 and are classified as B, C, and D types, according to their mobility profile on polyacrylamide gel electrophoresis (Mamone and others 2005). According to Delcour and others (2012), the main difference among them is the first amino acid residue that forms its primary structure, and it can be serine, methionine, or isoleucine.

The HMW-GS are classified into 2 types according to their molecular weight: x-HMW-GS type with molecular weights from 83,000 to 88,000 and y-HMW-GS type with molecular weight from 67,000 to 74,000. The HMW-GS have higher amounts of cysteine residues, when compared to other gluten-forming proteins (such as gliadin and LMW-GS), which enables the formation of intra- and intermolecular disulfide linkages with LMW-GS. Wellner and others (2005), studying the secondary structure of glutenins, indicated a predominance of the  $\alpha$ -helix structure in the C- and N-terminal domains due to the presence of cysteine residues in these regions. In contrast, in the central areas, there was a predominance of the  $\beta$ -spiral structure due to the presence of residues of glutamine, proline, and glycine, favoring a more rigid structure of the HMW-GS (Delcour and others 2012). Although the HMW-GS are in smaller amounts within the gluten proteins family (~10 %) (Wieser 2007), they are crucial in gluten functionality in bakery processes.

The distribution of glutenins in terms of molecular weight and the presence of intermolecular disulfide bonds are important characteristics to determine dough properties and performance in the baking process. According to Shewry and others (2001), Don and others (2003a, 2003b), Wieser (2007), Kontogiorgos (2011), Beck and others (2012), and Tomić and

others (2013), the so-called polymers “glutenin macropolymer” (GMP) make a higher contribution to the technological quality of wheat flour and are strongly related to the elasticity of the dough (dough strength) and bread volume (Domenek and others 2004; Melnyk and others 2012; Schiedt and others 2013). GMP consists of very large structures of both high-molecular-weight and low-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS and LMW-GS, respectively) (Don and others 2003a), linked by intramolecular and intermolecular disulfide bonds (Jekle and Becker 2013).

### I.2.3. The gluten network in the bread-making

#### I.2.3.1. The role of gluten proteins in the mixing process

Many studies have been undertaken to explain the gluten network formation during dough development. Researchers have tried to develop models to explain their hypotheses involving gluten since the 1960s, and work has focused on wheat proteins (Beckwith and Wall 1966; Ewart 1977a; Ewart 1977b; Tatham and others 1985; Gupta and others 1993; Belton 1999, 2005; MacRitchie 2014a). For the gluten network development, the native proteins of wheat flour must be hydrated by water addition and by mechanical work, in order to modify the initial conformation of gliadin and glutenin chains (Belton 2005; Wieser 2007; Tatham and Shewry 2012; Schiedt and others 2013). In this context, a sequential process that involves the insoluble proteins and their interactions occurs. During the step of mixing flour and water, various phenomena occur simultaneously, involving different components of the dough, in particular proteins and starch (Salvador and others 2006; Singh and others 2011). The macromolecular behavior of the dough is linked to wheat flour composition (Schiedt and others 2013).

Wheat flour dough is a viscoelastic material, its characteristics mainly depend on the properties of the flour, the quantity of water added, the air incorporated into it, and the mixing conditions (Salvador and others 2006). When adding the water to the flour, the protein molecules unfold, favoring the heterogeneous distribution of the water around the long protein chains, especially around the polar amino acids and the charged ionizable groups (Schiedt and others 2013).

With mixing, a complex protein network begins to be formed; however, the energy applied breaks structural interactions faster than they can be rearranged, changing the water binding capacity, and leading to increased free water in the system and the alignment of the protein chains (Bock and Damodaran 2013). At the same time, there is a more uniform distribution of starch granules. Furthermore, air is incorporated into the dough during mixing

in the form of bubbles, contributing to the rheological changes (Schiedt and others 2013). The prior denaturation of proteins that occurs during the events mentioned above leads to the formation of a structure that allows exposure of hydrophobic groups and favors hydrophilic interactions necessary to stabilize the structure of the network formed.

Gluten has enough time to develop, and its structure remains stable for a while. When the mixing time exceeds this period, there is a phenomenon known as depolymerization of proteins (Schiedt and others 2013), the network is unstable, promoting excessive loss of water and making it unfit for the production of products such as bread.

The chemical composition, as well as intra- and intermolecular interactions of gliadins and glutenins favor the stabilization of the generated polymer, reflecting functional and structural properties of the gluten in the breadmaking products (Wieser 2007; Melnyk and others 2012; Schiedt and others 2013).

In contrast to classical protein polymer networks, wherein the bonds which are formed are almost fixed, the gluten network is transitory in nature (Schiedt and others 2013), in that the crosslinks are formed by disulfide bonds from the exchange of free SH groups and available SH groups from previously formed disulfide intra- and intermolecular bonds (gliadin and glutenin chains), and also other connections between different amino acids are possible (Joye and others 2009).

Disulfide bonds formed by cross-links between cysteine residues are the most important structural elements of the gluten network (Peña and others 2006; Tilley and others 2001; Ullsten and others 2009). In addition, tyrosine plays an important role in the protein involved in  $\beta$ -helices (Peña and others 2006). Tilley and others (2001) have pointed out that tyrosine cross-link formation (such as isodityrosine or dityrosine) is an important event in the aggregation of gluten proteins. The tyrosine cross-links depend on the quantity of HMW glutenin subunits present, particularly those of the HMW type x. These glutenin subunits are tyrosine-rich proteins, and this amino acid might mediate the formation of covalent linkages that influence the specific conformation of the gluten network (Peña and others 2006). However, tyrosine cross-links have been shown to be formed in the presence of oxidizing agents (Tilley and others 2001). Nevertheless, during dough formation, the number of cross-links formed between tyrosine residues appears to be small and of little importance in the structure of the gluten network compared to the disulfide bonds formed between cysteine residues (Peña and others 2006).

The noncovalent interactions that are formed, in particular, the connections that occur by agglomeration and aggregation of hydrophobic amino acids (van der Waals forces), or by

addition of  $\beta$ -sheets by electrostatic interactions and hydrogen bonds (Belton 1999, 2005; Wellner and others 2005; Barth 2007; Schiedt and others 2013; Wang and others 2015), serve to assist in stabilizing the gluten network. All types of bonds formed may produce different behavior after deformation, which may lead to stronger or weaker interactions in the network, providing extensibility and elasticity characteristics. At the molecular level, the elasticity has been suggested to be mediated by covalent bonds (especially disulfide bonds), inter- and intramolecular, among the individual chains of glutenins (Belton 1999; Shewry and others 2001; Veraverbeke and Delcour 2002; Don and others 2003a, 2003b; Wieser 2007; Wang and others 2015). In this context, an elongation in the deformation resistance increases due to protein-protein interactions in the extended rigid chains (Jekle and Becker 2013).

It is widely known that the strength of dough and its three-dimensional gluten network depend on the arrangement and number of disulfide bonds and sulfhydryl groups of the proteins, and that most of the changes in dough mixing properties are caused by thiol-disulfide interchange reactions of gliadins and glutenins (Shewry and others 2001; Belton 2005; Delcour and others 2012; Macritchie 2014b; Lásztity and others 2000; Wang and others 2015). Additionally, the conformation of the proteins can allow the occurrence of non-covalent interactions that can strengthen or weaken the gluten network formed (Bock and Damodaran 2013).

Several models for the structure of wheat gluten polymers have been proposed, however, these theories do not explain all functional properties of gluten. Currently, the models proposed by MacRitchie (1999) and by Belton (1999) have a large consensus in some aspects of the viscoelastic behavior of the gluten network. These models are the first step to resolving the structure-functionality relationships in the dough (Hamer and Vliet 2000).

MacRitchie (1999), based on polymer theory, suggested that the glutenin polymer can be described as an entangled polymer network and the aggregates become joined through physical entanglements. It is a physical approach to gluten structure. The gluten network structure is a superimposition of both covalent and non-covalent interactions. Hydrogen bonds, hydrophobic interactions and electrostatic interactions (salt, metal ion bridges) are relatively weak but together give greater strength (Hamer and Vliet 2000).

Another model accepted currently was named the “loop-train theory”, and it was elaborated by Belton (1999) who established that not only the disulfide bonds are involved in the gluten network formation, but also the hydrogen bonds which contribute to the interaction between gliadins and glutenins. In this model, the glutenin subunits interact through disulfide bonds at the ends of the subunits and hydrogen bonds along the repeated regions. The loops

are formed in the repeated regions where water is contained (protein-water interaction) and, when applying extension to the system, such as in the dough-mixing process, the loops disappear, and the trains are formed (protein-protein interaction) (Belton 1999). The elongation and reordering of the chains through tensile or mixing forces lead to a loss of entropy. On the other hand, this could enable the formation of new bonds within the aligned state, which could stabilize the system. If the extension is removed, and the polymer relaxes, then the loops can re-appear (Jekle and Becker 2013).

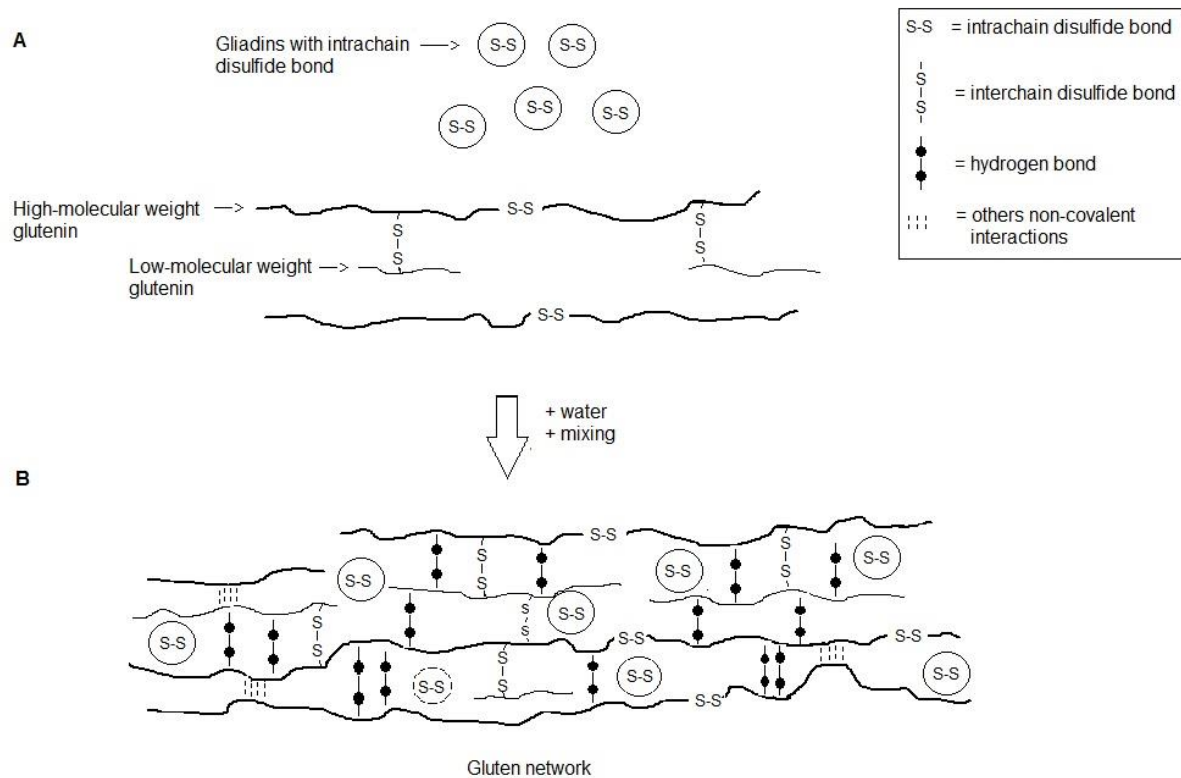
In short, while mixing the dough, the “native” links of gluten-forming proteins are broken and new bonds are formed during the preparation and the resting of the dough. The result is a protein matrix that is much stronger than the protein clusters in the flour suspension condition with water and without mechanical work (Schiedt and others 2013). Understanding the role and the contribution of the proteins from the gluten network, and the type of interactions involved in the stabilization, is a critical step in improving the dough development processes, especially from wheat flour (Schluentz and others 2000). Figures 1 shows a molecular interpretation of the gluten network formation, and Figure 2 shows the scanning electric micrograph of the gluten network.

### 2.3.2. The role of gluten proteins in proofing

Proofing is a period during which the dough is left to rest, after having been molded, and when a series of complex reactions occur, especially to produce carbon dioxide gas due the yeast action. At this stage of bread-making, starch breakdown and fermentation occur, and dough becomes a foam during the initial phase of proofing (Cauvain 2015).

The yeast produces carbon dioxide gas that causes the gluten network to expand; this leaves an open cellular structure with the gases trapped in pockets. Because of this, the quality of gluten in dough is very important. It is well-known that weak wheat flour, when used in bread-making, can produce bread with low volume, because its gluten network is unable to prevent gas bubble coalescence during proofing and during the early stages of baking (Cauvain 2015). Coalescence of gas bubbles in bread doughs occurs because the viscoelastic properties of the gluten network in the dough have not been optimized or because the dough lacks sufficient protein to form a stable gluten structure. Flours with an optimum gliadin-glutenin ratio provide optimum bread quality (Barak and others 2014), due to the gas-holding capacity of the gluten network developed in the dough. Thus, the increase of dough volume during proofing refers to the gluten viscoelastic properties required. The gluten network must have sufficient extensibility for its expansion under the rising gas pressure within the dough,

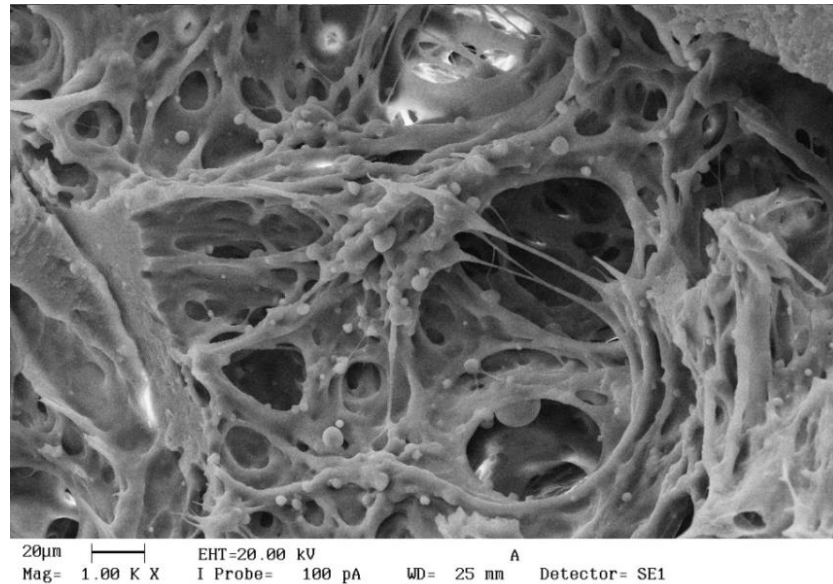
especially when the dough is subjected to biaxial extension; and the gluten network must have sufficient elasticity, related to its resistance to deformation during processing (Dobraszczyk and Roberts 1994; Dobraszczyk 2004).



**Figure 1.** Molecular interpretation of gluten network development after water addition associated with mixing. Based on Abang-Zaidel and others (2010), Shewry and others (2001, 2002), Delcour and others (2012), and Belton (1999).

At the later stages of proofing, the strain-hardening properties, which are governed by the polymeric glutenins, stabilize the foam. At elevated temperatures, these properties become even more important (Hamer and others 2009). Gliadins also play an important role on foam. The viscous gliadin has the potential to stabilize gas cells during bread-making due to its surface-active properties (Wang and others 2015). Because of their structure, different types of gliadins may give the additional degrees of freedom necessary to detect a common basis between the surface-activity demonstrated in foaming or emulsification and that shown in bread-making (Uthayakumaran and others 2001). Gliadins help to stabilize the foam where

the lipids in the dough are not able to cover the entire gas cell surface (Hamer and others 2009).



**Figure 2.** Scanning electron micrograph of the gluten network.

#### I.2.3.3. The role of gluten proteins in baking

In this step, temperature plays an important role: because of the gradual increase of temperature inside the oven, it is possible to observe a change from a foam structure to a sponge structure, due especially to protein denaturation and starch gelatinization. Heat promotes several changes in the wheat proteins, changes associated with chemical aspects (free SH groups, surface hydrophobicity), extractability (for example, in SDS solutions), modifications on the proteins conformations, and physicochemical changes (in rheological and thermal properties).

When the bread bakes, its gluten proteins coagulate (Wang and others 2015). The heat denaturation of gliadins and glutenins is the most important change that occurs during baking. The baking functionality of gluten decreases progressively during heating, with marked decreases in solubility and extractability indicating increased cross-linking and polymerization of the gluten polymer, which was attributed to increased sulphhydryl (SH)–disulfide (SS) interchange reactions (Schofield and others 1983), as indicated by their irreversibility with the addition of cysteine (Stathopoulos and others 2008a). Lefebvre and others (1994) observed the increasing permanent cross-linking between glutenin polymers. Guerrieri and others (1996) observed that heat-induced changes in surface hydrophobicity of

gluten started at 45 °C, indicating unfolding of the gluten polymer exposing hydrophobic groups and decreasing solubility. This sets the gluten, so that it is no longer elastic and determines the bread loaf size and shape. This change does not reverse when bread is cooled. The end result, after removal from the oven and cooling, should be a firm but open and light-textured loaf of bread (Dobraszczyk 2004).

### **I.3. Chemical composition of commercial vital wheat gluten**

Although this product is marketed as a “protein concentrate”, it is not composed only of proteins. Vital gluten contains approximately 73 to 82% proteins (Day and others 2006), 6 to 8% moisture, and variable amounts of minerals (0.5 to 1.5%), carbohydrates (3 to 20%, mainly starch), lipids (5 to 8%) and fibers (<1%). The starch and the fibers are trapped in the cohesive protein matrix and become more difficult to be removed with higher protein content.

The amount of starch can vary, but with extensive washing a significant reduction of the starch in the protein matrix can be observed (Miller and Hoseney 1999). The amount of extra water that is required for this washing generates a large amount of process effluent, increasing the biological oxygen demand (Day and others 2006). The non-polar lipids of the wheat flour can interact with the hydrophobic regions of the gluten proteins during the washing process, not allowing complete extraction of lipids in the washing step to obtain the vital gluten (Autran 1993; Debet and Gidley 2006). Gluten is a protein complex which is insoluble in water, although there may be small amounts of soluble proteins trapped in the gluten matrix. Despite its insolubility and its hydrophobic nature, gluten absorbs about twice its dry weight in water to form the gluten network (Day and others 2006).

### **I.4. Vital wheat gluten uses**

Vital wheat gluten is an ingredient used mainly in the baking industry (Marchetti and others 2012; Melnyk and others 2012; Majzoobi and Abedi 2014). Its use is recommended for the production of certain specialty breads (loaf bread with added fibers and/or germ and other ingredients), panettone, for which the fermentation step is long and the volume is important, or even in flour with low gluten quality or quantity (Tedrus and others 2001).

In bakery products, vital wheat gluten is used to fortify flour with lower protein content and of less than desirable quality or is inadequate for bread-making. The addition, this ingredient increases the protein content of the flour and improves its technological quality. This practice used by the baking industry, mills, and bakeries has become increasingly common in many countries. When added, vital gluten generally improves the strength of the

dough, the mixing tolerance and handling of the dough. Its viscoelastic properties provide expansion and gas retention, thereby increasing bread volume and improving bread texture and uniformity. Moreover, its water absorption capacity improves the yield of the final product, softness, and shelf-life. The concentration of vital wheat gluten on wheat flour ranges from 2 to 10% (Wadhawan and Bushuk 1989); usually 5% is used, depending on the flour quality that will be corrected, the type of end product desired, and essentially the gluten protein quality from vital wheat gluten that will be used for fortification. Figure 3 shows the effect of different concentrations of vital wheat gluten on pan bread.



**Figure 3.** Pan breads prepared with different concentrations of vital wheat gluten. Where, CB is the control bread prepared with 100% of wheat flour; 2%VG, 5%VG, and 7%VG are the breads prepared with 2%, 5%, and 7 % of vital wheat gluten on basis flour, respectively.

Sometimes, this product is used to standardize wheat flour produced by mills. This is usually done in order to satisfy specific needs of the food industry for certain flour applications, typically for the bakery and pasta industries. For pasta production, although durum wheat is the first choice, vital gluten can be used to fortify available flours. Gluten addition can reduce cooking loss and stickiness in cooked pasta, provide good cooked firmness, increase resistance to breakage, and improve heat tolerance in canned retorted products (Hesser 1989).

Vital gluten can also be used in meat products, because it has the ability to promote bonding between fat and water in emulsion systems. Due to the increasing concern about health and food safety, some consumers are looking for alternatives to animal proteins. Thus, products such as texturized wheat gluten and cereals fortified with vital gluten developed using extrusion technology (Bietz and Lookhart 1996; Schmiele 2014) are highlighted. Vital gluten is also used in the preparation of fruit purée and soy sauce, as a thickening agent, and monosodium glutamate manufacturing due to its high glutamine content, ideal for this product (Bietz and Lookhart 1996). Vital gluten may be used to replace the milk protein in certain

cheese products (if regulatory standard of identify allows), due its viscoelasticity, providing a characteristic texture and better eating quality of the cheese (Hesser 1989).

In the pet food industry, vital gluten is used in the preparation of meat analogs, due to its water absorption capacity and interaction with fat, thus also contributing to the nutritional needs of animals (Bietz and Lookhart 1996; Abang Zaidel and others 2009). For dog biscuits, the use of vital gluten contributes to improve resistance to breakage, especially during packaging and shipping (Hesser 1989).

It can also be used as a plasticizer in the formation of adhesives and films as a barrier for food and non-food products, such as cosmetics and medicines. Gluten is a renewable and biodegradable alternative. Wheat gluten protein, a renewable resource, is capable of forming a fibrous network which lends strength, elasticity, and plasticity when formed into a film (Koehler and others 2010). However, its use for this purpose must be carefully controlled. Due to the prevalence of gluten allergies and celiac disease, gluten films should only be suitable for wheat-containing foods.

Besides all these uses, new technologies are being increasingly explored to modify the structure and thus the functionality of this unique protein ingredient to provide a range of functional properties at a more modest price than demanded by its competitors such as milk and soy proteins (Day 2011).

## **I.5. Vital wheat gluten production**

The greatest world producers of wheat gluten are the USA, Canada, Australia, the Netherlands, France, and Germany (Boland and others 2005). Currently, in Asia, 2 countries are highlighted for wheat production volume and for its vital gluten producers: India and China. In the year 2015/2016, India produced 86,530 million tons of wheat, with an increasing market and production industry. On the other hand, China has emerged as a major producer, due especially to 2 factors: (i) great wheat production volume – in 2015/2016, its production was 130 million tons of wheat (ABITRIGO 2016), only a little behind the European Union countries which together totaled 160,012 million tons produced; and (ii) cheap labor and tax incentives for the creation of new industries. According to Koehler and others (2010), the production of vital gluten per year in Europe is around 600,000 tons, and the world annual estimate for gluten production was over 1,200,000 metric tons for 2015 (personal information); generally, most of its production is used by the baking industry (Wadhawan and Bushuk 1989).

Vital wheat gluten quality depends on the quality of the wheat grain used for its production. The selection of suitable hard wheat varieties which give good yield of gluten is important (Mekuria and Admassu 2011). For wet-milling to produce vital wheat gluten, flours from wheats with high protein content (Sayaslan and others 2006), 14 to 17 % (Guarienti 1996), with high-yield and good mixing quality (strong gluten aggregation) are preferred (Sayaslan and others 2006; Maningat and Bassi, 1999). In addition, sometimes this wheat grain or wheat flour quality is not available for vital gluten production, hence a small proportion of durum or soft wheat flour could be added to a hard wheat flour with no adverse effect on the separation, yield, and quality of the co-products starch and gluten (Sayaslan 2004). The use of better wheat varieties on those considered weak wheats solves the quality and scarcity problems of good quality vital wheat gluten in the global market.

To obtain vital wheat gluten, a multistep process that begins with the milling of the wheat grain has been used. The milling step is followed by aqueous separation of starch from gluten, which is insoluble in water. After this step, gluten must be dried and ground.

#### I.5.1. Fractionation of wheat flour

Wheat flour is the best raw material from which to obtain vital wheat gluten, because it facilitates the fractionation process into starch and gluten. According to van der Borgh and others (2005), flour fractionation processes can be classified on the basis of the degree of gluten protein agglomeration. The most important processes are the dough, dough-batter, batter, and other batter-based processes. Here, we describe the first step of these methods, where gluten and starch are separated from wheat flour.

*Dough process:* Vital gluten is typically produced by the Martin process. In this process, flour and water (~ 60%) are mixed and left at rest to form a dough. The dough is then washed under running water with gentle mixing, separating the gluten and starch, which is carried by the water (Weegels and others 1988; Robertson and others 1999; Day and others 2006). In this wheat flour fractionation step, the starch may be separated by different methods: by centrifugation, the use of hydrocyclones, decanters, or sieving (screening), as the starch granules have a higher density and larger size than gluten (Robertson and others 2008). The vital wheat gluten resulting from wheat flour fractionation is subjected to careful drying and subsequent grinding and, when rehydrated, it is still able to form an elastic and cohesive dough (Bietz and Lookhart 1996).

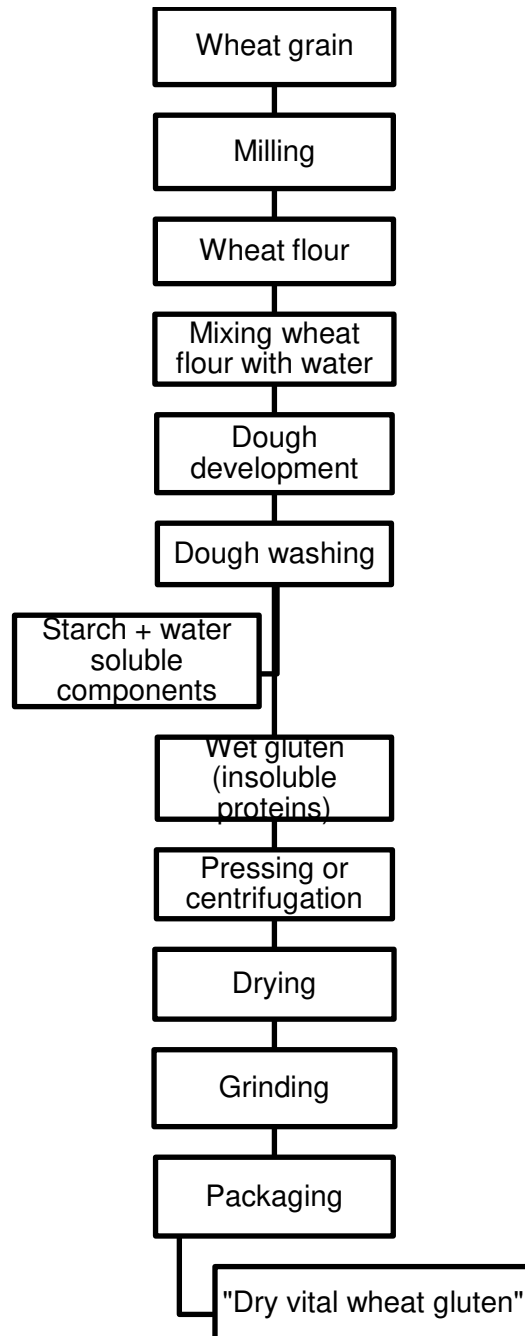
*Dough-batter process:* In this process, the first step is to form a stiff dough, and then more water is added in an attempt to dissolve the gluten matrix. The result is a batter which is then sieved or centrifuged to obtain starch and gluten (van der Borgh and others 2005).

*Batter process:* As summarized by Anderson and others (1960), in this continuous process a mixture of wheat flour and water is established (1 to 1.8) to reach an elastic batter. After this, more water is added to modify the proportion between flour and water (about 1 to 3). Starch is then washed from the batter, leaving gluten in the form of small curds. Gluten and starch are separated in a shaker screen. Gluten curds are recovered with more water added while moving them on screens.

### I.5.2. Drying step

After gluten and starch separation by aqueous processes, these products must be dried to be marketed. The drying step is necessary for the microbiological stability of the product, but it is critical for the retention of gluten functional properties, as gluten is sensitive to heat. Guerrieri and others (1996) claim that gluten can be heated up to 70°C without deleterious effect on its vitality; however, above 80°C the denaturation process can be observed. The gluten is dried in ring dryers that promote the mixing of wet gluten (~ 70% moisture) with previously dried gluten. In these types of dryers, the dried material is crushed and subjected to intermittent drying. A portion of the dried gluten is removed from the ring dryer, as a new quantity of wet gluten is introduced. The drying rate and temperature of the wet gluten must be carefully controlled, because its functional properties are easily destroyed by moist heat.

Other drying processes which can be used in the industry are drum-drying and spray-drying (Vojnovich and others 1960). At high-temperature oven-drying, freeze-drying, and vacuum-drying are used. Alternatives to drying the aqueous gluten dispersion may include ammonia or acetic acid, followed by spray-drying, but this approach is limited by its higher cost and environmental concerns. After drying, the product is ground into fine particles and marketed as vital wheat gluten. Figure 4 shows the flowchart of the vital wheat gluten production.



**Figure 4.** Flowchart of the vital wheat gluten production. Based on van der Borgh and others 2005.

### I.6. Vital wheat gluten quality assessment

Gluten quality is one of the most important criteria for judging its performance in the baking industry (Chandi and Seetharaman 2012). The vitality of gluten is generally evaluated for its ability to increase the volume and to improve the crumb texture of bread produced from standard fortified flour with vital gluten (Wadhawan and Bushuk 1989). This is the routine

test carried out by baking industries to assess the vital gluten level needed to fortify wheat flour with it (Guerrieri and Cerletti 1996; Chandi and Seetharaman 2012).

The American Association of Cereal Chemists International provides AACCI method 10-10.03 (AACCI, 2010), which is a guide to make a baking test with 100 g of flour and with short proofing time (greater or less than 90 min, depending of the yeast level used). In this test, standard recipes and standard procedures are used, and usually they are adapted to the purpose of the baking test (Sluimer 2005).

The baking performance of wheat flour (fortified or not with vital wheat gluten) can be measured by the baking test, and the main result obtained is loaf volume (Kieffer and others 1998). Besides, crumb firmness can be evaluated if texture analyses are conducted during bread shelf life.

The functional properties of gluten proteins depend on their physical and chemical properties that affect their behavior in food systems (Day and others 2006). The differences in the functional quality parameters of vital wheat gluten are determined through chemical analysis of its proteins, describing protein composition and also protein structure, or through physical tests, emphasizing viscoelastic properties of the fortified wheat flour with vital gluten.

To determine the differences in functionality of vital gluten, flour quality parameters such as farinograph parameters, and determining the volume of bread, are commonly used (Dua and others 2009). Several publications (Czuchajowska and Paszczynska 1996; Dobraszczyk and Morgenstern 2003; Song and Zheng 2007; Dhaka and others 2012; Marchetti and others 2012; MacRitchie 2014b) have described the use of alveograph, farinograph, extensograph, and Mixolab™ equipment to test the functionality of vital gluten obtained by different methods. In addition to these analyses, the ability of vital gluten in improving bread performance is generally evaluated, by loaf volume and crumb structure, when a poor quality flour is used for baking (Wadhawan and Bushuk 1989).

It is well known that protein content can be estimated quantitatively by the Kjeldahl method by the determination of nitrogen with its conversion to protein using the 5.7 factor for wheat (Wang and others 2014). However, this is not enough to characterize the type of proteins in vital gluten, so it is also very common to determine wet and dry gluten contents as a guide to their quality (Larsson and Eliasson 1996).

Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) are classic techniques that can be used to separate gliadins and glutenins and their subunits according to molecular

size. However, as the reduction of disulfide bonds is a prerequisite to investigate the size of the protein aggregates, these methods cannot avoid the loss of information as individual polypeptides interact to form, especially, glutenin polymers or glutenin macropolymers (GMP) (Don and others 2003a; Labuschagne and Aucamp 2004). Other techniques with higher resolution for separation of proteins in non-denaturing medium can be applied, with the advantage of evaluating the functionality of vital gluten for different applications. The high-performance liquid chromatography by molecular size exclusion (SE-HPLC) is a commonly used technique for investigating information on protein aggregates. It is an important tool in the evaluation of native protein aggregates, because it can provide a physical-chemical basis for dough strength. Furthermore, it is a quick test to evaluate the bread-making quality of wheat genotypes for breeding programs.

Currently, SEC-HPLC is a technique used to separate the 4 major wheat protein classes in flour and vital gluten: albumins, globulins, gliadins, and glutenins, and the results obtained by this technique have been strongly correlated with the quality of dough development (Singh and others 1990; Labuschagne and Aucamp 2004). Gupta and others (1993) and Uthayakumaran and others (2002) found a correlation between the amount of protein polymers found in wheat flour and technological parameters during the dough-mixing process. The amount of some protein polymers is related to gluten strength and the volume of bread (Autran 1993; El Haddad and others 1996; Weegels and others 1996; Scanlon and Zghal 2001; Bekes and others 2004; Delcour and others 2012; Bock and Damodaran 2013).

Chemical predictive tests, including those for surface hydrophobicity, protein solubility in various solvent systems, and the types of interactions that occur between the proteins, as well as the ratio of gliadin-to-glutenin, have been investigated to evaluate gluten vitality (Krull and Wall 1969; Melander and Horváth 1977; Jeanjean and others 1980; Kinsella and Hale 1984; Robertson and others 1999; Singh and Macritchie 2001; Bennion and Daggett 2003; Liu and Hsieh 2008; Stathopoulos and others 2008b). Near-infrared spectroscopy has also been used to assess qualitative and quantitative properties of wheat proteins (Guerrieri and Cerletti 1996; Bock and Damodaran 2013; Sivam and others 2013; Czaja and others 2016).

Evaluations of the characteristics of the protein gel, using such fundamental rheological tests as oscillatory dynamic tests and compression tests, appear as alternative techniques to better assess gluten behavior during dough development (Létang and others 1999; Uthayakumaran and others 2002; Dobraszczyk and Morgenstern 2003; Dobraszczyk 2004; Ng and others 2006; Angioloni and others 2008; Mirsaeedghazi and others 2008; Ng

and McKinley 2008; van den Broeck and others 2009; Uthayakumaran and others 2014), as some physical tests often do not have good intra- and inter-assay repeatability (Chandi and Seetharaman 2012).

Knowing that vital gluten undergoes a drying step during its processing, it is necessary to assess the degree of denaturation of proteins at high temperatures, relating it to their functionality when applied to wheat flour or other flours. The gluten proteins, as protein molecules, are characterized by a transition temperature between 2 phases, one semi-solid, prevalent at high temperatures, and the other glassy-solid, prevalent at low temperatures (Hill and others 2014). This type of physical change is called “glass transition”. The glass transition temperature ( $T_g$ ) is the main parameter to understand the thermal and mechanical properties of gluten proteins (Cherian and Chinachoti 1997; Micard and Guilbert 2000; Hayta and Schofield 2004; Thanatuksorn and others 2009; Khatkar and others 2013). An analytical tool to study the thermal behavior of these proteins is differential scanning calorimetry (DSC), which is a technique that allows observations of phenomena involving heat exchange (Arntfield and Murray 1981; Wang and Damodaran 1990; Weegels and others 1994a, 1994b; Leon and others 2003; Angioloni and Dalla Rosa 2005; Falcão-Rodrigues and others 2005; Mohamed and others 2010).

The molecular structure of gluten is also relevant to determine its viscoelastic characteristics. Studies of the molecular origin of viscoelasticity have been hampered by the intrinsic complexity of gluten, since it is composed of dozens of proteins of high-molecular-weight, and because it is insoluble in water. This has promoted the development of techniques for determining three-dimensional structures in high resolution, such as X-ray diffraction spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR) (Umbach and others 1998).

As gluten protein structures vary depending on the solvent used, the secondary structures of proteins have been studied for wheat gluten using infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR). This analysis allows the quantification of the secondary structures of proteins in a solid, in tablet form, or as a film (Bernardes Filho and others 1998). FTIR coupled with Attenuated Total Reflectance (FTIR/ATR) cell is a powerful method to obtain relevant information for understanding protein adsorption to surfaces (Chittur, 1998). The use of ATR is usually related to the rapid obtaining of the difficult-to-handle samples spectrum, with controlled temperature, and less intense interference of the solvent can be observed in the infrared spectrum as a whole, allowing its easy subtraction of the sample spectrum (Fabian and Mäntele 2002).

The circular dichroism technique (CD) also provides important data on the conformation of the protein structures present in many systems. Molecules that have several chiral centers, such as proteins and peptides, can interact with incident light and change its polarization. Thus, the CD technique uses this fact to determine the secondary structure of proteins, peptides, and nucleic acids (Kieffer and others 2007).

The surface formed in the gluten network can be assessed by scanning electron microscopy (SEM), which provides interesting data on the surface morphology of the structure from images at high magnification. Khatkar and others (2013) studied the changes in microstructure after gliadin addition to doughs and reported structural differences between them.

Polymerization of glutenin and gliadin to form the gluten network involves the oxidation of sulfhydryl groups (SH) and the exchange with previously existing disulfide bonds (SS) (Beveridge and others 1974; Hueqner and others 1977; Kuktaite and others 2011). In studies with the addition of reducing agents and oxidants to flour, it was observed that the addition of a reducing agent breaks the disulfide bonds between gliadin and glutenin, whereas the oxidizing agent aids in the polymerization of gluten (Lagrain and others 2006). These observations were ascribed to a SH-SS exchange mechanism (Khatkar and others 1995). Thus, changes of free SH groups affect the association between gliadins and glutenins, becoming an important factor for evaluating the quality of vital gluten.

While the rheological and practical baking tests are the most common tests in mills, baking industries and research institutions use chemical tests for the assessment of vital gluten quality (Chandi and Seetharaman 2012), as these are also important in determining the type and quantity of the proteins found in the product. On the other hand, these chemical and physical tests require a long time of analysis, specific instrumentation and reagents, and also technical personnel trained for such analysis and interpretation of the data. Thus, the use of simple tests to assess vital gluten quality is relevant for reducing analysis time and costs, as long as they allow obtaining fast results associated with the technological quality of vital gluten.

Simple tests, such as the expansion test of a gluten ball, hand-washing test and an extensibility test by simply stretching the gluten ball, can be important for determining vital gluten quality, often avoiding the need to carry out more time-consuming practical baking or physical or chemical tests to check the viscoelastic properties of this product before its application in the baking industry. These rapid tests can also be carried out in bakeries or mills that must assess the quality of gluten.

## **I.7. Conclusions**

Vital wheat gluten is an ingredient used in the bakery industry. It is obtained from wheat flour through a process that involves washing and drying steps. Drying is a critical process step, because heat can induce thermal denaturation of vital wheat gluten proteins, and this can change viscoelastic characteristic of gluten when rehydrated. When vital wheat gluten is added to wheat flour, it is expected that this protein supplementation improves the viscoelastic properties of the gluten network and, consequently, dough quality.

The protein characteristics that affect the technological quality of vital gluten to be used in baking are amino acid composition, protein structure and conformation, gluten protein hydrophobicity, and gliadin and glutenin quantity and quality. Good quality of the gluten network is achieved when its proteins, gliadins and glutenins, can interact with each other, through non-covalent interactions and disulfide bonds, resulting in a cohesive and elastic network able to retain gases from fermentation in the bread-making process.

The gluten network has a complex viscoelastic behavior that depends on its proteins, thus there are many tests to verify its technological quality. Rheological tests are conducted to determine the viscoelastic properties using different methods and equipment, at a macroscopic level, but physical-chemical tests are also important to identify protein quality at microscopic and molecular levels. Correlation studies of dough rheological properties and gluten protein quality are relevant to expand our knowledge on the unique behavior of gluten.

## **Acknowledgements**

The authors thank CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for an author's grant (163129/2013-4).

## **Author Contributions**

Fernanda Ortolan researched prior studies and wrote the text.

Caroline Joy Steel reviewed the text and made suggestions to improve the work.

## **References**

- AACCI. 2010. American Association of Cereal Chemists International. Approved methods, 11th ed., St. Paul: AACCI.
- Abang Zaidel DN, Chin NL, Yusof YA, Abdul Rahman R. 2009. Analysis and correlation studies on gluten quantity and quality during production. *J Appl Sci* 9:1686–94.
- ABITRIGO. 2016. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. Estatísticas. Available from:

- < [http://abitrito.com.br/associados/arquivos/5.prod\\_trigo.pdf](http://abitrito.com.br/associados/arquivos/5.prod_trigo.pdf)>. Accessed in: 2016 October 14.
- Anderson RA, Pfeifer VF, Lancaster EB, Vojnovich C, Griffin Jr EL. 1960. Pilot-plant studies on the continuous batter process to recover gluten from wheat flour. *Cereal Chem* 37:180–8.
- Angioloni A, Balestra F, Pinnavaia GG, Rosa MD. 2008. Small and large deformation tests for the evaluation of frozen dough viscoelastic behaviour. *J Food Eng* 87:527–31.
- Angioloni A, Dalla Rosa M. 2005. Dough thermo-mechanical properties: Influence of sodium chloride, mixing time and equipment. *J Cereal Sci* 41:327–31.
- Arntfield SD, Murray ED. 1981. The influence of processing parameters on food protein functionality I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *Can Inst Food Sci Technol J* 14:289–94.
- Autran JC. 1993. Recent perspectives on the genetics , biochemistry and functionality of wheat proteins. *Trends Food Sci Technol* 4:358–64.
- Barak S, Mudgil D, Khatkar BS. 2014. Influence of gliadin and glutenin fractions on rheological, pasting, and textural properties of dough. *Int J Food Prop* 17:1428–38.
- Barth A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1767:1073–101.
- Beck M, Jekle M, Becker T. 2012. Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast-leavened products. I. Rheological attributes. *J Sci Food Agric* 92:585–92.
- Beckwith A, Wall J. 1966. Reduction and reoxidation of wheat glutenin. *Biochim Biophys Acta* 130:155–62.
- Bekes F, Gianibelli MC, Wrigley C. 2004. Grain proteins and flour quality. *Aust J Agric Res* 416–23.
- Belton PS. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *J Cereal Sci* 29:103–7.
- Belton PS. 2005. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *J Cereal Sci* 41:203–11.
- Bennion BJ, Daggett V. 2003. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5142–7.
- Bernardes Filho R, Otsuka R, Colnago LA. 1998. Análise das estruturas secundárias das proteínas do glúten de trigo em estado sólido por FTIR. São Carlos, São Paulo, Brasil Available from: [http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=CT24\\_98.pdf](http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=CT24_98.pdf). Accessed 2016 July 27.
- Beveridge T, Toma SJ, Nakai S. 1974. Determination of SH- and SS-groups in some food

- proteins using Ellman's reagent. *J Food Sci* 39:49–51. Bietz JA, Lookhart GL. 1996. Properties and non-food potential of gluten. *Cereal Foods World* 41:377–82.
- Bock JE, Damodaran S. 2013. Bran-induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Hydrocoll* 31:146–55.
- Boland M, Brester GW, Taylor MR. 2005. Global and U.S. wheat gluten industries: structure, competition, and trade. Agricultural Marketing Policy Center briefing n°. 76, Montana State University, Bozeman. Available from: <http://purl.umn.edu/29220>. Accessed 2016 March 30.
- Callejo MJ, Gil MJ, Rodríguez G, Ruiz M V. 1999. Effect of gluten addition and storage time on white pan bread quality: instrumental evaluation. *Zeitschrift für Leb und -Forsch* 208:27–32.
- Cauvain S. 2015. *Technology of breadmaking*, Third ed. Springer, New York. p.1-408.
- Chandi GK, Seetharaman K. 2012. Optimization of gluten peak tester: a statistical approach. *J Food Qual* 35:69–75. Cherian G, Chinachoti P. 1997. Nuclear magnetic resonance mobility, and glass transition behavior of gluten. *Cereal Chem* 74:312–7.
- Chittur KK. 1998. FTIR / ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Mater Eng* 19:357-69.
- Cocchi M, Cobellini M, Foca G, Lucisano M, Ambrogina Pagani M, Tassi L, Ulrici A. 2005. Classification of Bread Wheat Flours in Different Quality Categories by a Wavelet-Based Feature Selection/classification Algorithm on NIR Spectra. *Ana Chim Acta* 544:100–7.
- Codex Alimentarius. 2008. FAO / WHO. Thirty first Session. Geneva , Switzerland, 30 June - 5 July 2008 , Bad Neuenahr-Ahrweiler , Germany.
- Czaja T, Mazurek S, Szostak R. 2016. Quantification of gluten in wheat flour by FT-Raman spectroscopy. *Food Chem* 211:560–3.
- Czuchajowska Z, Paszczynska B. 1996. Is wet gluten good for baking ? *Cereal Chem* 73:483–9.
- Day L, Augustin M a., Batey IL, Wrigley CW. 2006. Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci Technol* 17:82–90.
- Day L. 2011. Wheat gluten: production, properties and application. In Phillips G O, Williams PA, editors, *Handbook of food proteins*, Woodhead Publishing, Sawston, UK. pp 267-88
- Debet MR, Gidley MJ. 2006. Three classes of starch granule swelling : Influence of surface

- proteins and lipids. *Carbohydr Polym* 64:452–65.
- Delcour Ja, Joye IJ, Pareyt B, Wilderjans E, Brijs K, Lagrain B. 2012. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annu Rev Food Sci Technol* 3:469–92.
- Dhaka V, Gulia N, Khatkar BS. 2012. application of mixolab to assess the bread making quality of wheat varieties. *Open Access Sci Reports* 1:1–8. Dobraszczyk B., Morgenstern M. 2003. Rheology and the breadmaking process. *J Cereal Sci* 38:229–45.
- Dobraszczyk BJ. 2004. The physics of baking: rheological and polymer molecular structure–function relationships in breadmaking. *J Nonnewton Fluid Mech* 124:61–9.
- Dobraszczyk BJ, Roberts CA. 1994. Strain hardening and dough gas cell-wall failure in biaxial extension. *J Cereal Sci* 20:265–74.
- Domenek S, Brendel L, Morel M-H, Guilbert S. 2004. Swelling behavior and structural characteristics of wheat gluten polypeptide films. *Biomacromolecules* 5:1002–8.
- Don C, Lichtendonk W, Plijter JJ, Hamer RJ. 2003a. Glutenin macropolymer: a gel formed by glutenin particles. *J Cereal Sci* 37:1–7.
- Don C, Lichtendonk WJ, Plijter JJ, Hamer RJ. 2003b. Understanding the link between GMP and dough: From glutenin particles in flour towards developed dough. *J Cereal Sci* 38:157–65.
- Dua S, Lukow OM, Humphreys G, Adams K. 2009. Effect of extraction methods and wheat cultivars on gluten functionality. *Open Food Sci J* 3:84–92.
- El Haddad L, Aussenac T, Fabre JL, Sarrafi A. 1996. Erratum: Relationships between polymeric glutenin and the quality characteristics for seven common wheats (*Triticum aestivum*) grown in the field and greenhouse (*Cereal Chemistry* (Nov.-Dec. 1995) 72:6 (599)). *Cereal Chem* 73:152.
- Esteller MS, Pitombo RNM, Lannes SCS. 2005. Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. *J Cereal Sci* 41:19–21.
- Ewart JAD. 1967. Amino acid analyses. *J Sci Food Agric* 18:176–83.
- Ewart JAD. 1977a. Isolation of two  $\gamma$ -gliadins from Cappelle-Desprez. *J Sci Food Agric* 28:843–8.
- Ewart JAD. 1977b. Cappelle-Desprez P-gliadin. *J Sci Food Agric* 28:849–51.
- Fabian H and Mäntele W. 2002. Infrared spectroscopy of proteins biochemical applications infrared spectroscopy of proteins. In: Chalmers JM and Griffiths PR, editors. *Handbook of vibrational spectroscopy*. Vol 1. Hoboken: Wiley. p1-27.
- Falcão-Rodrigues MM, Moldão-Martins M, Beirão-da-Costa ML. 2005. Thermal properties

- of gluten proteins of two soft wheat varieties. *Food Chem* 93:459–65.
- Food and Drug Administration (U.S.FDA). 2013. What is gluten-free? FDA has an answer. Available in: [https://www.in.gov/isdh/files/Gluten\\_Free\\_Article\\_October\\_2013.pdf](https://www.in.gov/isdh/files/Gluten_Free_Article_October_2013.pdf). Accessed: January 29<sup>th</sup>, 2016.
- Guarienti EM. 1996. Qualidade industrial de trigo. 2nd ed. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT. p1-36.
- Guerrieri N, Alberti E, Lavelli V, Cerletti P. 1996. Use of spectroscopic and fluorescence techniques to assess heat-induced molecular modifications of gluten. *Cereal Chem* 73:368–74.
- Guerrieri N, Cerletti P. 1996. Effect of high-temperature short-time treatment of wheat flour on gluten vitality and structure. *Cereal Chem* 73:6–9.
- Gupta RB, Khan K, MacRitchie F. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distributon of polymeric protein. *J Cereal Sci* 18:23–41.
- Hamer RJ, van Vliet T. 2000. Understanding the structure and properties of gluten: an overview. In: Shewry PR, Tatham AS, editors. *Wheat gluten*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K. pp 125–31.
- Hayta M, Schofield JD. 2004. Heat and additive induced biochemical transitions in gluten from good and poor breadmaking quality wheats. *J Cereal Sci* 40:245–56.
- Hesser JM. 1989. World food uses of vital wheat gluten. In: Applewhite TH, editor. *Proccedings of the World Congress on vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs*. The American Oil Chemists Society, Urbana, IL. pp. 117-122.
- Hill JJ, Shalaev EY, Zografi G. 2014. The importance of individual protein molecule dynamics in developing and assessing solid state protein preparations. *J Pharm Sci* 103:2605–14.
- Hueqner FR, Bietz A, Wall S. 1977. Disulfide bonds: key to wheat protein functionality. *Protein Crosslink*. 1–15.
- Jeanjean MF, Damidaux R, Feillet P. 1980. Effect of heat treatment on protein solubility and viscoelastic properties of wheat gluten. *Cereal Chem* 57:325–31.
- Jekle M, Becker T. 2013. Wheat dough microstructure: The relation between visual structure and mechanical behavior. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55:369-82.
- Joye IJ, Lagrain B, Delcour J a. 2009. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking – A review. *J Cereal Sci* 50:11–21.
- Khatkar BS, Barak S, Mudgil D. 2013. Effects of gliadin addition on the rheological,

- microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *Int J Biol Macromol* 53:38–41.
- Khatkar BS, Bell AE, Schofield JD. 1995. The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *J Cereal Sci* 22:29–44.
- Kieffer R, Wieser H, Henderson MH, Graveland A. 1998. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. *J Cereal Sci* 27:53–60.
- Kieffer R, Schurer F, Köhler P, Wieser H. 2007. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *J Cereal Sci* 45:285–92.
- Kinsella JE, Hale ML. 1984. Hydrophobic associations and gluten consistency: effect of specific anions. *J Agric Food Chem* 32:1054–6.
- Koehler P, Kieffer R, Wieser H. 2010. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten III. Studies on gluten films. *J Cereal Sci* 51:140–5.
- Kontogiorgos V. 2011. Microstructure of hydrated gluten network. *Food Res Int* 44:2582–6.
- Krull LH, Wall JS. 1969. Relationship of amino acid composition and wheat protein properties. *Bak Dig* 43:30–4.
- Kuktaite R, Plivelic TS, Cerenius Y, Hedenqvist MS, Gallstedt M, Marttila S, Ignell R, Popineau Y, Tranquet O, Shewry PR, Johansson E. 2011. Structure and morphology of wheat gluten films: From polymeric protein aggregates toward superstructure arrangements. *Biomacromolecules* 12:1438–48.
- Labuschagne MT, Aucamp U. 2004. The use of size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) for wheat quality prediction in South Africa. *South African J Plant Soil* 21:8–12.
- Lagrain B, Brijs K, Delcour J a. 2006. Impact of redox agents on the physico-chemistry of wheat gluten proteins during hydrothermal treatment. *J Cereal Sci* 44:49–53.
- Lagrain B, Thewissen BG, Brijs K, Delcour J a. 2008. Mechanism of gliadin–glutenin cross-linking during hydrothermal treatment. *Food Chem* 107:753–60.
- Larsson H, Eliasson A. 1996. Phase separation of wheat flour dough studied by ultracentrifugation and stress relaxation. II. Influence of mixing time, ascorbic acid, and lipids. *Cereal Chem* 73:25–31.
- Leon A, Rosell CM, Benedito de Barber C. 2003. A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. *Eur Food Res Technol* 217:13–16.

- Létang C, Piau M, Verdier C. 1999. Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: rheometry and microstructure. *J Food Eng* 41:121–32.
- Lefebvre J, Popineau Y, Cornec M. 1994. Viscoelastic properties of gluten proteins: Influence of prolamin composition and of temperature. In: *Gluten proteins 1993. Association of Cereal Research: Detmold, Germany*. pp 180-189.
- Liu K, Hsieh FH. 2008. Protein-protein interactions during high-moisture extrusion for fibrous meat analogues and comparison of protein solubility methods using different solvent systems. *J Agric Food Chem* 56:2681–87.
- MacRitchie F. 1999. Wheat proteins: characterization and role in flour functionality. *Cereal Foods World* 44, 188-93.
- MacRitchie F. 2014a. Theories of glutenin / dough systems. *J Cereal Sci* 60:733–5.
- MacRitchie F. 2014b. Requirements for a test to evaluate bread-making performance. *J Cereal Sci* 59:1–2.
- Majzoobi M., Abedi E. 2014. Effects of pH changes on functional properties of native and acetylated wheat gluten. *Int Food Res J* 21:1219–24.
- Mamone G, Addeo F, Chianese L, Di Luccia A, De Martino A, Nappo A, Formisano A, De Vivo P, Ferranti P. 2005. Characterization of wheat gliadin proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteomics* 5:2859–65.
- Maningat CC, Bassi SD. 1999. Wheat starch production. In *Tumbleson M, Yang P, Eckhoff S, editors. Proceedings of international starch technology conference. Urbana, IL: University of Illinois*.p26-40.
- Marchetti L, Cardós M, Campaña L, Ferrero C. 2012. Effect of glens of different quality on dough characteristics and breadmaking performance. *LWT - Food Sci Technol* 46:224–31.
- McCann TH, Day L. 2013. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *J Cereal Sci* 57:444–52.
- Mekuria B and Admassu S. 2011. Grain quality evaluation and characterization of vital gluten powder from bread wheat varieties grown in Arsi and Bale, Ethiopia. *E Afri J Sci* 5:35–41.
- Melander W, Horváth C. 1977. Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Arch Biochem Biophys* 183:200–15.
- Melnyk JP, Dreisoerner J, Marcone MF, Seetharaman K. 2012. Using the gluten peak tester as a tool to measure physical properties of gluten. *J Cereal Sci* 56:561–7.

- Micard V, Guilbert S. 2000. Thermal behavior of native and hydrophobized wheat gluten , gliadin and glutenin-rich fractions by modulated DSC. *Int J Biol Macromol* 27:229–36.
- Miller K a., Hosenev RC. 1999. Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. *Cereal Chem* 76:105–9.
- Mirsaeedghazi H, Emam-Djomeh Z, Mousavi SMA. 2008. Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. *Int J Agric Biol* 10:112–9.
- Mohamed A, Finkenstadt VL, Gordon SH, Palmquist DE. 2010. Thermal and mechanical properties of compression-molded pMDI-reinforced PCL/gluten composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 118:2778-90.
- Ng TSK, McKinley GH. 2008. Power law gels at finite strains: The nonlinear rheology of gluten gels. *J Rheol (N Y N Y)* 52:417–49.
- Ng TSK, Mckinley GH, Padmanabhan M. 2006. Linear to non-linear rheology of wheat flour dough linear to non-linear rheology of wheat flour dough. *International Symposium on Food Rheology and Structure (ISFRS2006)*, ETH, Zurich, Swiss. 1-9.
- Osborne TB. 1907. The proteins of the wheat kernel. Washington: Carnegie Institution of Washington 1-136.
- Payne PI, Holt LM, Jackson EA, Law CN. 1984. Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 304:359–71.
- Peña E, Bernardo A, Soler C, Jouve N. 2006. Do tyrosine crosslinks contribute to the formation of the gluten network in common wheat (*Triticum Aestivum* L.) dough?" *J Cereal Sci* 44:144–53.
- Pirozzi MR, Margiotta B, Lafiandra D, MacRitchie F. 2008. Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. *J Cereal Sci* 48:117-22.
- Pizzinatto A. 1997. Qualidade da farinha de trigo: conceitos, fatores determinantes, parâmetros de avaliação e controle. Campinas: ITAL. p1-62.
- Robertson GH, Cao TK, Gregorski KS, Hurkman WJ, Tanaka CK, Chiou B-S, Glenn GM, Orts WJ. 2013. Modification of vital wheat gluten with phosphoric acid to produce high free swelling capacity. *J Appl Polym Sci* 1-11.
- Robertson GH, Cao TK, Ong I. 1999. Wheat gluten swelling and partial solubility with potential impact on starch-from-gluten separation by ethanol washing. *Cereal Chem* 76:843–5.
- Robertson GH, Cao TK, Orts WO. 2008. Effect on dough functional properties of partial

- fractionation, redistribution, and in situ deposition of wheat flour gluten proteins exposed to water, ethanol, and aqueous ethanol. *Cereal Chem* 85:599–606.
- Roussel P, Chiron H. 2005. *Le pains Français, évolution, qualité, production*. 2<sup>ème</sup> édition. Conflandey: MAÉ-ERTI Editeurs. p.1-433.
- Salvador A, Sanz T, Fiszman SM. 2006. Dynamic rheological characteristics of wheat flour-water doughs. Effect of adding NaCl, sucrose and yeast. *Food Hydrocoll* 20:780–6.
- Sayaslan A. 2004. Wet-milling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods. *LWT - Food Sci Technol* 37:499–515.
- Sayaslan A, Seib PA, Chung OK. 2006. Wet-milling properties of waxy wheat flours by two laboratory methods. *J Food Eng* 72:167–78.
- Scanlon MG, Zghal MC. 2001. Bread properties and crumb structure. *Food Res Int* 34:841–64.
- Schaffarczyk M, Østdal H, Matheis O, Jekle M, Koehler P. 2016. Reconstitution baking tests with defatted wheat flour are suitable for determining the functional effects of lipase-treated wheat lipids. *Food Chem* 200:175-82.
- Schiedt B, Baumann A, Conde-Petit B, Vilgis T A. 2013. Short- and long-range interactions governing the viscoelastic properties during wheat dough and model dough development. *J Texture Stud* 44:317–32.
- Schluntz EJ, Steffe JF, Ng PKW. 2000. Rheology and microstructure of wheat dough developed with controlled deformation. *J Texture Stud* 31:41–54.
- Schmiele M. 2014. Interações físicas e químicas entre isolado protéico de soja e glúten vital durante a extrusão termoplástica a alta e baixa umidade para a obtenção de análogo de carne. Thesis. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. p.1-275.
- Schofield JD, Bottomley RC, Timms MF, Booth MR. 1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphydryl-disulphide interchange reactions. *J Cereal Sci* 1:241–53.
- Selmair PL, Koehler P. 2009. Molecular structure and baking performance of individual glycolipid classes from lecithins. *J Agr Food Chem* 57:5597-609.
- Shewry PR, Halford NG. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot* 53:947–58.
- Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:133–42.
- Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P. 2001. Wheat glutenin subunits and dough elasticity : findings of the EUROWHEAT project. *Trends Food Sci Technol* 11:433–41.

- Shewry PR, Tatham AS. 1997. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J Cereal Sci* 25:207–27.
- Singh H, Macritchie F. 2001. Application of polymer science to properties of gluten. *J Cereal Sci* 33:231–43.
- Singh NK, Donovan GR, Batey IL, Macritchie F. 1990. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chem.* 67:150–61.
- Singh S, Singh N. 2013. Relationship of polymeric proteins and empirical dough rheology with dynamic rheology of dough and gluten from different wheat varieties. *Food Hydrocoll* 33:342–8. doi:
- Singh S, Singh N, MacRitchie F. 2011. Relationship of polymeric proteins with pasting, gel dynamic- and dough empirical-rheology in different Indian wheat varieties. *Food Hydrocoll* 25:19–24.
- Sivam AS, Sun-waterhouse D, Perera CO, Waterhouse GIN. 2013. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. *Food Res Int* 50:574–85.
- Sluimer P. 2005. Principles of breadmaking. St. Paul: AACCI. p.1-212.
- Song Y, Zheng Q. 2008. Influence of gliadin removal on strain hardening of hydrated wheat gluten during equibiaxial extensional deformation. *J Cereal Sci* 48:58–67.
- Song Y, Zheng Q. 2007. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends Food Sci Technol* 18:132–8.
- Stathopoulos CE, Tsiami A A., David Schofield J, Dobraszczyk BJ. 2008a. Effect of heat on rheology, surface hydrophobicity and molecular weight distribution of gluteins extracted from flours with different bread-making quality. *J Cereal Sci* 47:134–43.
- Stathopoulos CE, Tsiami A A., David Schofield J, Dobraszczyk BJ. 2008b. Effect of heat on rheology, surface hydrophobicity and molecular weight distribution of gluteins extracted from flours with different bread-making quality. *J Cereal Sci* 47:134–43.
- Tanhaeuser S, Wieser H, Kieffer P. 2014. Correlation of quality parameters with the baking performance of wheat flours. *Cereal Chem* 91:333–41.
- Tatham AS, Drake AF, Shewry PR. 1985. A conformational study of a glutamine- and proline-rich cereal seed protein, C hordein. *Biochem J* 226:557–62.
- Tatham AS, Shewry PR. 2012. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *J Cereal Sci* 55:79–99.
- Tedrus GDAS, Cássia R De, Ormenese SC, Speranza SM, Chang YK, Bustos FM. 2001.

- Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães 1. *Ciência e Tecnol Aliment* 21:20–5.
- Thanatuksorn P, Kawai K, Kajiwaru K, Suzuki T. 2009. Effects of ball-milling on the glass transition of wheat flour constituents. *J Sci Food Agric* 89:430–5.
- Tilley KA, Benjamin RE, Bagorogoza KE, Okot-Kotber BM, Prakash O, Kwen H. 2001. Tyrosine cross-links : molecular basis of gluten structure and function. *J Agr Food Chem* 49:2627–32.
- Tomić J, Pojić M, Torbica A, Rakita S, Zivancev D, Hajnal EJ, Hadnadev TD, Hadnadev M. 2013. Changes in the content of free sulphydryl groups during postharvest wheat and flour maturation and their influence on technological quality. *J Cereal Sci* 58:495–501.
- Tuhumury HCD, Small DM, Day L. 2014. The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. *J Cereal Sci* 60:229–37.
- Ullsten NH, Cho S, Spencer G, Ga M, Johansson E. 2009. Properties of extruded vital wheat gluten sheets with sodium hydroxide and salicylic acid. *Biomacromolecules* 10:479–88.
- Umbach SL, Davis E a., Gordon J. 1998. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of conventional and microwave heated vital wheat gluten. *J Cereal Sci* 28:233–42.
- Uthayakumaran S, Tomoskozi S, Tatham AS, Savage AWJ, Gianibelli MC, Stoddard FL, Bekes F. 2001. Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. *Cereal Chem* 78:138–41.
- Uthayakumaran S, Newberry M, Phan-Thien N, Tanner R. 2002. Small and large strain rheology of wheat gluten. *Rheol Acta* 41:162–72.
- Uthayakumaran S, Tanner RI, Dai S-C, Qi F, Wrigley CW. 2014. Relationships between traditional and fundamental dough-testing methods. *Cereal Res Commun* 42:282–92.
- van den Broeck HC, America AHP, Smulders MJM, Bosch D, Hamer RJ, Gilissen LJWJ, van der Meer IM. 2009. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:975–82. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.02.035
- van der Borgh A, Goesaert H, Veraverbeke WS, Delcour J a. 2005. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *J Cereal Sci* 41:221–37.
- van der Zalm EEJ, van der Goot AJ, Boom RM. 2011. Quality of shear fractionated wheat gluten – Comparison to commercial vital wheat gluten. *J Cereal Sci* 53:154–9.
- Veraverbeke WS, Delcour Ja. 2002. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:179–208.

- Vojnovich C, Pfeifer VF, Anderson RA, Griffing JEL. 1960. Vital wheat gluten by drum drying. *Cereal Chem* 37:422–35.
- Wadhawan CK, Bushuk W. 1989. Studies on vitality of commercial gluten. I. Physical, chemical and technological characteristics. *Cereal Chem* 66:456–61.
- Wang C, Damodaran S. 1990. Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. *Trends Food Sci Technol* 35:1158–64.
- Wang P, Chen H, Mohanad B, Xua L, Ning Y, Xua J, Wua F, Yang N, Jin Z, Xu X. 2014. Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocoll* 39:187–94.
- Wang P, Jin Z, Xu X. 2015. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives. *Trends Food Sci Technol* 46:189–98.
- Wang KQ, Luo SZ, Zhonga XY, Cai J, Jiang ST, Zheng Z. 2017. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation. *Food Chem* 214:393–9.
- Weegels PL, Groot AMG, Verhoek JA, Hamer RJ. 1994a. Effects on gluten of heating at different moisture contents. II. Changes in physico-chemical properties and secondary structure. *J Cereal Sci* 19:39–47.
- Weegels PL, Verhoek JA, Groot AMG, Hamer RJ. 1994b. Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. *J Cereal Sci* 19:31–8.
- Weegels PL, Marseille JP, Hamer RJ. 1988. Small scale separation. *Starch* 40:342–6.
- Weegels PL, Pijpekamp AM Van De, Graveland A, Hamer RJ, Schofiel JD. 1996. Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *J Cereal Sci* 23:103–11.
- Wellner N, Mills ENC, Brownsey G, Wilson RH, Brown N, Freeman J, Halford NG, Shewry PR, Belton PS. 2005. Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules* 6:255–61.
- Wieser H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 24:115–9.
- Wieser H, Kieffer R. 2001. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *J Cereal Sci* 34:19–27.
- Xu J, Bietz J a., Carriere CJ. 2007. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin

suspensions. *Food Chem* 101:1025–30.

Zhou Y, Zhao D, Foster TJ, Liu Y, Wang Y, Nirasawa S, Tatsumi E, Cheng Y. 2014. Konjac glucomannan-induced changes in thiol/disulphide exchange and gluten conformation upon dough mixing. *Food Chem* 143:163–9.

Zhu J, Khan K. 2002. Quantative variation of HMW glutenin subunits from hard red spring wheats grown in different environments. *Cereal Chem* 79:783-6.

## **ARTIGO II.**

---

### **Características químicas e estruturais de proteínas de glúten vital de diferentes origens para panificação**

Ortolan, Fernanda; Urbano, Karoline; Netto, Flavia Maria; Steel, Caroline Joy

Este artigo será submetido à:

*Food Research International*

## **II. Características químicas e estruturais de proteínas de glúten vital de diferentes origens para panificação**

Ortolan, Fernanda; Urbano, Karoline; Netto, Flavia Maria; Steel, Caroline Joy

### **Resumo**

Avaliar as características químicas das proteínas que constituem o glúten vital comercial é importante, porque a qualidade tecnológica deste produto está associada não só à quantidade de proteína total, mas também à qualidade funcional da proteína que constitui este produto. O objetivo deste estudo foi avaliar as características químicas e estruturais das proteínas de glúten vitais comerciais de diferentes origens (GVA e GVB) envolvidas na qualidade tecnológica, visando definir os parâmetros mais relevantes para aplicação em panificação. Poucas diferenças nas características químicas e estruturais de GVA e GVB foram observadas, com exceção da quantidade relativa de proteínas das frações proteicas do glúten, onde GVA apresentou maior quantidade de gliadinas (relacionadas à extensibilidade) e a mesma quantidade de gluteninas (relacionadas à elasticidade) que GVB, revelando melhor equilíbrio entre essas frações em GVA. Esta diferença mostrou a necessidade de maiores informações sobre as proteínas do glúten vital comercial a ser utilizado na fabricação de pães. Palavras chave: glúten vital, qualidade proteica, gliadinas e gluteninas.

### **II.1. Introdução**

O glúten vital de trigo é comercializado como um ingrediente que pode ser adicionado às farinhas que não apresentam qualidade adequada para a elaboração de pães (ESTELLER; PITOMBO; LANNES, 2005; WEEGELS et al., 1994), ou ainda aos pães ricos em fibras. Usualmente, o glúten comercializado não é classificado de acordo com o seu perfil proteico ou de qualidade proteica. No entanto, se espera que o glúten adicionado interfira positivamente na qualidade da massa (MARCHETTI et al., 2012), embora as características tecnológicas dos diferentes glúten comerciais possam variar amplamente entre si (WEEGELS et al., 1994).

Ainda que o glúten vital adicionado à farinha de trigo melhore as características de qualidade dos pães, nem sempre ele mantém as propriedades tecnológicas da farinha original da qual foi obtido (MILLER; HOSENEY, 1999). Desta forma, a determinação de suas características química, físico-química e tecnológica auxilia na sua especificação, a fim de

alcançar melhor desempenho na elaboração dos produtos de panificação, quando adicionado às farinhas.

O glúten vital pode ser produzido a partir de diferentes métodos de extração, que apresentam múltiplos passos, iniciando-se com a moagem do grão de trigo. A moagem é seguida pela separação aquosa associada ao trabalho mecânico do amido e do glúten, insolúvel em água. Após essa etapa, o glúten deve ser seco e moído (DAY et al., 2006). Muitos são os fatores do processo que influenciam na qualidade do glúten vital obtido, mas a etapa de secagem parece ser a mais crítica (GUERRIERI; CERLETTI, 1996). Dois fatores são considerados determinantes: (i) pode ocorrer desnaturação proteica quando temperaturas acima de 70 °C são utilizadas para secar o glúten vital (GUERRIERI; CERLETTI, 1996), e (ii) o glúten se deteriora rapidamente quando mantido num estado úmido, como resultado da ação proteolítica endógena e exógena, tornando-o inadequado para sua aplicação na indústria (VAN DER BORGHT et al., 2005). As condições de processamento podem ser variadas, levando a alterações na qualidade do glúten vital, porém essas variações não são apenas resultado do processo de obtenção, mas também, do genótipo de trigo selecionado para a produção do glúten vital (FREDERIX; COURTIN; DELCOUR, 2004). Um genótipo adequado para o processamento deve possuir alto teor proteico e ser economicamente viável para toda a cadeia produtiva do trigo (WEEGELS; MARSEILLE; HAMER, 1988).

O glúten vital resultante deste processo contém no mínimo de 60% de proteínas (BRASIL, 2005), principalmente gliadinas e gluteninas, que possuem diferenças estruturais que influenciam as suas propriedades viscoelásticas. Os diferentes resíduos de aminoácidos formadores das gliadinas e gluteninas levam à formação dos diferentes tipos de ligações que estão envolvidas na formação da rede de glúten, influenciando suas propriedades viscoelásticas (JEKLE; BECKER, 2013). Enquanto as gluteninas (maior massa molecular comparada às gliadinas, e com ligações SS intra e intermoleculares) formam uma massa mais elástica quando hidratadas, as gliadinas (ligações SS intramoleculares) produzem uma massa mais fluida e extensível quando hidratadas (SINGH; MACRITCHIE, 2001; WIESER, 2007). A associação entre gliadinas e gluteninas para formar a rede de glúten combina as características desses dois componentes, exibindo propriedades físicas de coesão, viscosidade e elasticidade (PYLER, 1973). A quantidade semelhante entre gliadinas e gluteninas é determinante na reologia da rede de glúten (KHATKAR; BARAK; MUDGIL, 2013; MACRITCHIE, 2014; SHEWRY et al., 2001; TUHUMURY; SMALL; DAY, 2014), porém não deve ser considerado o único fator para avaliação da qualidade viscoelástica da rede de glúten formada.

A solubilidade e associação molecular das proteínas em diferentes sistemas de solventes são determinadas pelas diferentes cadeias laterais dos aminoácidos que constituem as cadeias polipeptídicas (SINGH; MACRITCHIE, 2001). Gliadinas e gluteninas contêm relativamente pequenas quantidades de resíduos de aminoácidos básicos e ácidos, que são responsáveis pela solubilização de proteínas (PYLER, 1973), levando a baixa solubilidade das proteínas do glúten em água. Por outro lado, elas apresentam grandes quantidades de glutamina (WIESER, 2007), que possibilita a formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos amina e carboxila terminais das glutaminas (PYLER, 1973). As proteínas do glúten também contêm grandes quantidades de resíduos de aminoácidos apolares, consistindo de grupos alifáticos e aromáticos que, em contato com a água, tendem a se associar, formando as interações hidrofóbicas (SINGH; MACRITCHIE, 2001).

As interações não covalentes formadas, em especial, as interações hidrofóbicas (GUERRIERI et al., 1996), ou por agregação de  $\beta$ -folhas por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (SCHIEDT et al., 2013), estabilizam a rede de glúten. Em nível molecular, a elasticidade tem sido sugerida como sendo associada às ligações dissulfeto inter e intra cadeias de gluteninas individuais (BELTON, 1999; DELCOUR et al., 2012; MACRITCHIE, 2014; MCCANN; DAY, 2013). Sob alongamento, a resistência à deformação aumenta devido às interações proteína-proteína nas cadeias rígidas estendidas (SHEWRY et al., 2001). Durante a mistura da massa, as ligações existentes nas cadeias das proteínas formadoras de glúten são quebradas e, posteriormente, novas ligações são formadas durante a elaboração e o descanso da massa. O resultado é uma matriz proteica que é muito mais forte do que os aglomerados de proteínas sob a condição de suspensão de farinha em água sem trabalho mecânico associado (SCHIEDT et al., 2013; WANG; JIN; XU, 2015).

Compreender o papel e a contribuição das proteínas que formam a rede de glúten e os tipos de interações envolvidas na sua estabilização é um passo essencial para aperfeiçoar os processos de desenvolvimento de massa obtida a partir da farinha de trigo (SCHLUENTZ; STEFFE; NG, 2000), ou com a adição de glúten vital sobre a farinha de trigo fraca ou farinha de trigo integral, ou farinhas oriundas de outros grãos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar quais são as características químicas e estruturais das proteínas que influenciam a qualidade tecnológica de glútenos vitais comerciais utilizados na fortificação de farinhas de trigo para a panificação, visando prever os parâmetros de qualidade mais relevantes destes produtos e ampliar o conhecimento das características das proteínas do glúten vital.

## II.2. Materiais e Métodos

### II.2.1. Materiais

Foram utilizadas duas amostras de glúten vital comercial de diferentes origens, nomeadas de glúten vital A (GVA) e glúten vital B (GVB). Além disso, um glúten de trigo não vital (GNV) foi obtido por meio de tratamento térmico, para fins de comparação.

### II.2.2. Métodos

#### II.2.2.1. Obtenção de glúten não vital

O glúten não vital (GNV) foi obtido por tratamento térmico de GVA pelo método proposto por Schofield et al. (1983), com algumas modificações citadas por Guerrieri et al. (1996). Em amostra de 20 g de glúten foi adicionada água suficiente para atingir 60 % de umidade e feita a mistura manual em gral para a formação da rede de glúten. O glúten umedecido foi colocado em placas de metal fechadas e devidamente lacradas, para evitar perda de água, e aquecido em banho-maria a 98 °C por 30 minutos. Após este período, o glúten foi congelado a -40 °C em ultracongelador UK 05 (Klimaquip, Pouso Alegre, Brasil), seco em liofilizador modelo L108 (Liotop, São Carlos, Brasil), moído, peneirado (60 mesh) e armazenado em frasco de vidro.

#### II.2.2.2. Composição química e aminoacídica

A composição química do glúten vital (GVA e GVB) e não vital (GNV) foi avaliada utilizando metodologias padronizadas pela AACCI (2010): teor de umidade (método n° 44-15.02), teor de cinzas (método n° 08-01.01), teor de proteínas (método n° 46-13.01), utilizando como fator de correção o valor de 5,7, teor de lipídios (método n° 02-01.02) e carboidratos por diferença  $[100 - (\text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{lipídios})]$ . As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em base seca.

A composição em aminoácidos de GVA, GVB e GNV foi determinada segundo White; Hart; Fry (1986), com algumas modificações. O glúten foi hidrolisado com 6 M HCl na presença de fenol. Os resíduos foram desproteinizados com solução de HCl e metanol (80 % MeOH + 20 % 0,1 M HCl). Os aminoácidos livres reagiram com fenilisotilcianato (PITC) em uma derivatização pré-coluna e foram separados por RP-HPLC C18, utilizando duas fases móveis: fase móvel A composta por 60 mL de acetonitrila misturada com 940 mL de tampão acetato de sódio contendo 0,05 % trietilamina; e fase móvel B composta por 60 % de acetonitrila e 40 % de água. Foi utilizado gradiente de eluição, aumentando gradativamente o

eluente B. Um passo adicional com 100 % de tampão móvel B foi utilizado para a limpeza da coluna, para que a mesma retornasse às suas condições iniciais. As frações separadas foram detectadas a 254 nm. A análise foi realizada em duplicata e os resultados foram expressos em teor de aminoácidos (g) em 100 g de proteínas totais (base seca).

#### II.2.2.2. Fracionamento sequencial das proteínas

As proteínas do glúten vital (GVA e GVB) e não vital (GNV) foram fracionadas em albuminas-globulinas, gliadinas e gluteninas, de acordo com o método descrito por Singh; Shepherd; Cornish (1991), com as modificações propostas por Kieffer et al. (2007) e algumas adaptações. A extração sequencial em diferentes solventes iniciou com a separação das albuminas e globulinas (ALB/GLO). Uma dispersão de 2 % de proteína (m/v) foi preparada com 0,15 M NaCl, a solução foi agitada a 14.600 rpm em mini homogeneizador TE 103 (Tecnal<sup>®</sup>, Piracicaba, Brasil) por 60 minutos a 50 °C. Após este período, a dispersão foi centrifugada a 15.000 x g por 15 minutos a 20 °C em centrífuga Allegra™ 64R (Beckman Coulter, Brea, Estados Unidos); o sobrenadante contendo ALB/GLO foi recolhido e o resíduo foi utilizado para a separação das gliadinas (GLI). Para separação da fração GLI, foi utilizada solução 50 % 1-propanol, nas mesmas condições de agitação e de centrifugação descritas anteriormente. O sobrenadante contendo GLI foi recolhido e o resíduo foi utilizado para extração de gluteninas (GLU). Para GLU foi utilizada solução de 50 % 1-propanol contendo 0,05 mol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl (pH 7,5) e 2 % β-mercaptoetanol, com as mesmas condições de agitação e centrifugação utilizadas para ALB/GLO e GLI. O sobrenadante contendo GLU foi recolhido e o resíduo foi descartado. Todas as etapas do fracionamento foram realizadas duas vezes. O conteúdo proteico das frações foi quantificado pelo método n° 46-13.01 da AACCI (2010) e, para o resíduo, o teor proteico foi determinado por diferença [100 – (ALB/GLO + GLI + GLU)]. Os resultados foram expressos em g/100 g de proteína solúvel em base seca e a análise foi realizada em triplicata.

#### II.2.2.3. Avaliação das interações químicas

##### II.2.2.3.1. Solubilidade proteica em diferentes solventes

As interações químicas existentes nas cadeias proteicas do glúten vital e possivelmente envolvidas na formação da rede de glúten foram avaliadas pela solubilidade das proteínas em diferentes solventes, segundo metodologia proposta por Schmiele et al. (2013), com algumas modificações. Os solventes utilizados foram: (TF) 40 mM tampão fosfato (pH 7,5), preparado

com água deionizada; (U) 8 M ureia; (SDS) 2 % dodecil sulfato de sódio; e (ME) 2 %  $\beta$ -mercaptoetanol. Todos os sistemas foram preparados em TF.

A solubilização da proteína de GVA, GVB e GNV em cada sistema de solvente foi realizada baseando-se no método descrito por Chiang (2007) e adaptado por Schmiele et al. (2013). Em microtubo, 80 mg de amostra (em base seca) foi adicionada de 1,5 mL de solvente, agitada em vórtex Mixer (Labnet, Rating, Estados Unidos), e incubada em banho-maria 304-TPA (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil) por 150 minutos a 40°C, com agitação em vórtex a cada 30 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados em centrífuga Mikro 200 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha) a 10.000 x g, por 30 minutos, a 20 °C. A solubilização das proteínas foi realizada em triplicata. As proteínas solubilizadas foram quantificadas pelo método de Lowry utilizando o Kit RC/DC™ (Bio-Rad Laboratories Inc., Philadelphia, Estados Unidos) com adaptações. As análises foram realizadas em microplacas, com 15 minutos de incubação e a absorbância foi medida em espectrofotômetro FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) com comprimento de onda de 750 nm. Os resultados estão expressos em g/100 g em base seca.

#### II.2.2.3.2. Avaliação dos grupos SH/SS

Os conteúdos de grupos SH total e livre e ligações dissulfeto (SS) presentes em GVA, GVB e GNV foram determinados conforme método descrito por Chan; Wasserman (1993), com modificações propostas por Tuhumury; Small; Day (2014). Para a determinação de grupos SH livres e SH total, a leitura de absorbância das amostras após reação com o reagente de Ellmann foi medida a 412 nm. O conteúdo de SS foi calculado a partir dos SH livres e SH total, pela equação:  $SS = [(SH \text{ total} - SH \text{ livre})/2]$ . As determinações foram efetuadas em triplicata e os resultados expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína em base seca.

#### II.2.2.4. Eletroforese

A avaliação do perfil de massa molecular das amostras foi realizada em sistema SDS-PAGE segundo a técnica descrita por Zhou et al. (2014) em condições redutoras e não redutoras. Soluções de proteínas de GVA, GVB e GNV foram preparadas individualmente a partir de 10 mg de amostra diluídos em 1 mL de tampão de corrida composto por: 0,4 % (m/v) de SDS, 12 % (m/v) de glicerol, 50 M de tampão Tris-HCl (pH 6,8); 2 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,01 % (m/v) de azul de bromofenol, para a condição redutora. A mesma solução tampão apenas sem o  $\beta$ -mercaptoetanol foi utilizada na condição não redutora. As soluções foram misturadas em vórtex e aquecidas em banho a 95 °C por 4 minutos. Após este

tempo, as soluções foram resfriadas a temperatura ambiente, e então 20 µL foram inseridos com auxílio de microseringa de 25 µL em gel de 10 % de poliacrilamida.

A análise SDS-PAGE foi conduzida em sistema de eletroforese Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratórios, Estados Unidos), com voltagem de 80 V por 40 minutos e 120 V por tempo suficiente para que o corante azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel. A análise foi conduzida em duplicata. Os géis foram corados “*overnight*” em solução aquosa contendo 9 % de ácido acético (v/v), 45 % de metanol (v/v) e 0,25 % de corante azul de Coomassie (m/v). A mesma solução, sem o corante, foi utilizada para a descoloração do gel por 2 horas, com agitação.

O padrão de eletroforese (#161-0304) (Bio-Rad Laboratories Inc., Philadelphia, Estados Unidos) composto por fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa), foi utilizado para as condições redutoras e não redutoras de eletroforese.

#### II.2.2.5. SEC-HPLC

A distribuição da massa molecular aparente das proteínas que constituem os glútenos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (SEC-HPLC). As proteínas de glúten vital (GVA e GVB) e não vital (GNV) foram extraídas usando procedimento descrito por Tronsmo et al. (2002) com adaptações. As amostras foram suspensas em 1 mL de solução com 0,05 M de tampão fosfato (pH 6,9) contendo 0,5 % de SDS a fim de se obter dispersões com 0,08 g/mL de proteína. As amostras foram aquecidas a 50 °C por 5 minutos e, em seguida, agitadas em vórtex por 60 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as amostras foram sonicadas em banho ultrassônico Thornton T740 (Unique Ind. e Com. de Prod. Eletrônicos, Santo Amaro, Brasil) com potência de 63 W e frequência de 40 Hz por 30 segundos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos a 25 °C em centrífuga Mikro 200 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana filtrante em fluoreto polivinidileno (PVDF, diâmetro de 30 mm e abertura de 0,45 µm) (Jet Biofil®, Guangzhou, China) para ser utilizado na análise de SEC-HPLC. A análise de perfil cromatográfico por exclusão molecular foi realizada em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Columbia, Estados Unidos), composto por bomba LC-10AT VP, forno CTO-10AS VP, detector de arranjo de diodos SPD-M20A VP, interface SCL-10A e software CLASS VP. As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de exclusão molecular Yarra SEC-4000 (300 mm x 7,8 mm x 3 µm) (Phenomenex, Hercules, Estados

Unidos). As amostras foram eluídas no modo isocrático, com fase móvel constituída por 0,05 mol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,05 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,15 mol L<sup>-1</sup> NaCl (pH 6,8), vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno de coluna a 25 °C, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 214 nm. A coluna foi calibrada com um padrão Gel Filtration (#151-1901) (Bio-Rad Laboratories Inc., Philadelphia, Estados Unidos) composto pelas seguintes proteínas: tireoglobulina bovina (MM 670.000), γ-globulina bovina (MM 158.000), ovalbumina (MM 44.000), mioglobulina de cavalo (MM 17.000), e vitamina B12 (MM 1.350), dissolvidas no mesmo tampão das amostras e com as mesmas condições de análise. Uma curva padrão foi elaborada com tempo de retenção x log massa molecular. As análises foram realizadas em triplicata. Os picos obtidos para as proteínas que compõem o padrão de tamanho molecular (670 kDa, 158 kDa, 44 kDa, 17 kDa e 1,35 kDa) apresentaram tempos de retenção que variaram de 8 a 12 minutos.

#### II.2.2.6. Análise por espectroscopia no FTIR

A estrutura secundária das proteínas foi avaliada em espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo IRprestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector DLATGS. As amostras de glúten foram secas a 60 °C em estufa a vácuo modelo TE-395 acoplada a bomba de vácuo modelo TE-058 (Tecnal, Piracicaba, Brasil), por 24 h, e, após este período, foram armazenadas em dessecador para prevenir o ganho de umidade até o momento da análise. As pastilhas de KBr foram preparadas em prensa a vácuo em uma proporção de 2 mg de amostra para 200 mg de KBr (1 % de amostra). Os espectros de absorvância de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> foram adquiridos com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 45 varreduras. Os interferogramas por transformada de Fourier foram obtidos usando apodização Happ-Genzel. Os espectros foram corrigidos com linha base de análise e obtidos em triplicata.

#### II.2.2.7. Avaliação microscópica da superfície – MEV

Para avaliar a superfície da rede proteica do glúten foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O glúten reconstituído com amido de trigo nativo numa proporção de 12 g proteínas/100 g amostra foi previamente preparado no equipamento Glutomatic 2200 (Perten, Suíça), de acordo com o método n° 38-12.02 da AACC (2010), sem as etapas de centrifugação e secagem. Logo após, foi congelado a -40 °C em ultracongelador modelo UK 05 (Klimaquip, Pouso Alegre, Brasil) e seco em liofilizador modelo L108 (Liotop, São Carlos, Brasil) para obtenção de um produto completamente seco. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura com detector de energia dispersiva de raios X, modelo

Leo 440i (LEO Electron Microscopy Ltda., Oxford, Inglaterra), com tensão de aceleração de 20 kV e corrente do feixe de 100 pA e aumento de 1000x.

### II.2.3. Análise estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a 95 % de intervalo de confiança, e a análise de comparação das médias realizada através do teste de Tukey, utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Estados Unidos).

## II.3. Resultados e Discussão

### II.3.1. Composição química e aminoacídica

A composição química e de aminoácidos do glúten vital de diferentes origens e do glúten não vital está apresentada na Tabela 1. Os resultados mostraram diferenças entre os glútenos avaliados para os teores de cinzas, lipídios e proteínas. O valor de proteína foi similar para as amostras de GVA e GVB. O GNV, obtido por tratamento térmico, não diferiu significativamente de GVA quanto às proteínas e cinzas, porém, em relação aos lipídios seu teor foi inferior, podendo indicar perda durante o tratamento térmico. As diferenças observadas para carboidratos se devem aos diferentes teores encontrados entre os constituintes químicos dos glútenos avaliados, pois o teor de carboidratos foi calculado por diferença.

Para comercialização, o glúten vital é caracterizado pelo seu teor de proteína total, porém apenas este teor não fornece informações importantes do ponto de vista tecnológico. Os métodos usuais para determinação de proteínas, como o método de Kjeldhal, que determinam apenas a sua quantidade, são insuficientes para avaliar a qualidade de uma proteína. Por outro lado, a composição de aminoácidos é uma ferramenta que fornece informação sobre os teores de aminoácidos (hidrofóbicos, polares não carregados, polares carregados) existentes nos glútenos vitais.

A composição aminoacídica de GVA, GVB e GNV indicou diferenças entre eles para alguns resíduos de aminoácidos (Tabela 1), sendo que algumas podem ser atribuídas ao método. Sabendo-se que a rede de glúten é formada por diferentes tipos de interações químicas, covalentes (ligações dissulfeto) e não covalentes (ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas), vale destacar que GVA e GVB apresentaram quantidades semelhantes de cisteína, aminoácido sulfurado envolvido nas ligações SS. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina, valina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina) representam 31,5 g/100 g dos aminoácidos de GVA, 32,4 g/100 g para GVB e

30,2 g/100 g para GNV; embora haja menor quantidade desses aminoácidos quando comparados aos demais (hidrofílicos), eles contribuem para a hidrofobicidade das proteínas do glúten, reduzindo a sua solubilidade em solventes aquosos (RASHEED et al., 2014), porém esta depende da sequência dos resíduos de aminoácidos.

**Tabela 1.** Composição química e aminoacídica (g/100 g, base seca) de glutens vitais de diferentes origens (GVA e GVB) e glúten não vital (GNV)

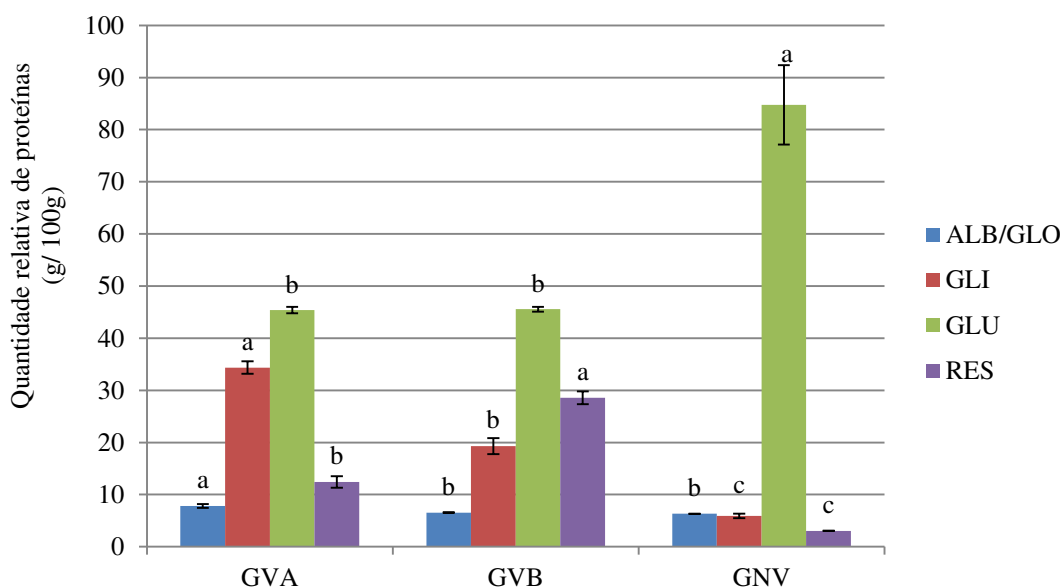
|                                | GVA             | GVB            | GNV            |
|--------------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| <b>Composição química</b>      |                 |                |                |
| Cinzas                         | 0,91 ± 0,00 a   | 0,82 ± 0,01 b  | 0,88 ± 0,02 a  |
| Lipídios                       | 3,01 ± 0,19 a   | 0,89 ± 0,04 b  | 0,33 ± 0,02 c  |
| Proteínas                      | 82,78 ± 2,81 ab | 83,01 ± 1,92 a | 79,85 ± 0,70 b |
| Carboidratos                   | 13,30           | 15,28          | 18,94          |
| <b>Composição aminoacídica</b> |                 |                |                |
| Asparagina (ASP)               | 15,52 ± 0,02 c  | 15,68 ± 0,03 b | 15,83 ± 0,03 a |
| Glutamina (GLU)                | 14,87 ± 0,01 a  | 13,70 ± 0,05 c | 13,51 ± 0,02 b |
| Serina (SER)                   | 4,09 ± 0,03 c   | 4,09 ± 0,02 b  | 4,00 ± 0,00 a  |
| Glicina (GLY)                  | 3,17 ± 0,03 ns  | 3,13 ± 0,02 ns | 3,05 ± 0,01 ns |
| Histidina (HYS)                | 1,04 ± 0,01 c   | 1,57 ± 0,02 a  | 1,43 ± 0,01 b  |
| Arginina (ARG)                 | 2,39 ± 0,01 c   | 2,49 ± 0,02 b  | 2,51 ± 0,01 a  |
| Treonina (TRE)                 | 4,78 ± 0,02 a   | 4,52 ± 0,01 b  | 4,25 ± 0,00 b  |
| Alanina (ALA)                  | 6,43 ± 0,01 b   | 6,67 ± 0,02 a  | 6,38 ± 0,00 a  |
| Prolina (PRO)                  | 4,92 ± 0,01 c   | 4,98 ± 0,01 a  | 4,65 ± 0,00 b  |
| Tirosina (TYR)                 | 2,05 ± 0,00 b   | 2,10 ± 0,02 a  | 2,05 ± 0,01 a  |
| Valina (VAL)                   | 3,45 ± 0,01 b   | 3,46 ± 0,01 a  | 3,27 ± 0,00 a  |
| Metionina (MET)                | 1,24 ± 0,01 b   | 1,20 ± 0,02 b  | 1,25 ± 0,01 a  |
| Cisteína (CYS)                 | 0,91 ± 0,03 b   | 0,97 ± 0,02 ab | 0,99 ± 0,01 a  |
| Isoleucina (ILE)               | 3,02 ± 0,00 c   | 3,05 ± 0,01 b  | 3,23 ± 0,01 a  |
| Leucina (LEU)                  | 7,48 ± 0,05 b   | 7,60 ± 0,01 a  | 6,54 ± 0,00 c  |
| Fenilalanina (PHE)             | 4,29 ± 0,00 c   | 4,70 ± 0,04 a  | 4,30 ± 0,00 b  |
| Lisina (LIS)                   | 2,37 ± 0,02 a   | 2,37 ± 0,02 a  | 2,05 ± 0,01 b  |
| Triptofano (TRP)               | 0,73 ± 0,01 a   | 0,73 ± 0,01 a  | 0,56 ± 0,02 b  |

GVA = glúten vital A; GVB = glúten vital B; GNV = glúten não vital; Teor de umidade: GVA = 9,01 g/100 g; GVB = 6,79 g/100 g; GNV = 1,93 g/100 g; Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); ns = não significativo.

As informações sobre a quantidade de proteínas total e sua composição aminoacídica não são suficientes para entender as diferenças tecnológicas dos glúten vitais comerciais (MARCHETTI et al., 2012). Desta forma, outras análises são necessárias para verificar a estrutura e as propriedades funcionais de suas proteínas, que influenciam na qualidade dos produtos finais.

### II.3.2. Composição relativa das frações proteicas

A composição relativa das frações proteicas, obtidas pelo fracionamento sequencial, dos glúten vitais e do glúten não vital está apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** Quantidade relativa de proteínas obtida do fracionamento sequencial de glúten vitais (GVA e GVB) e glúten não vital (GNV) de albuminas + globulinas (ALB/GLO), gliadinas (GLI), gluteninas (GLU) e resíduo (RES). Barras de erro representam os desvios padrão das replicatas. Letras minúsculas diferentes entre as colunas da mesma fração de proteína representam diferenças significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ).

O teor relativo de albuminas e globulinas foi diferente para GVA (7,82 g/100 g), enquanto para GVB e GNV não diferiram significativamente entre si. A pequena quantidade (< 10 g/100 g) de proteínas encontrada nessa fração foi observada porque durante a obtenção do glúten vital, os constituintes solúveis, incluindo proteínas como albuminas e globulinas, são extraídos no processo de lavagem do glúten, permanecendo predominantemente as proteínas insolúveis (VAN DER BORGHT et al., 2005) em sua constituição.

A quantidade relativa de proteínas na fração de gliadinas apresentou diferenças significativas entre os glúten avaliados, 34,4 g/100 g para GVA, 19,3 g/100 g para GVB e 5,9 g/100 g para GNV. As diferenças observadas entre GVA, GVB e GNV não se devem apenas aos diferentes genótipos de trigo (já que os glúten foram obtidos de diferentes origens), mas também, ao processo de obtenção do glúten vital. Quando são utilizadas temperaturas próximas a 70 °C pode ocorrer modificação da estrutura das proteínas que constituem os glúten vitais, reduzindo a solubilidade de proteínas, como as gliadinas, em alguns solventes (WIESER, 1998, 2007), neste caso na solução de 50 % 1-propanol. Isso provavelmente aconteceu para GVB e GNV, que apresentaram menores quantidades de

proteínas na fração gliadina. As gliadinas são proteínas monoméricas, que apresentam ligações dissulfeto intramoleculares e são responsáveis pela característica de extensibilidade da rede de glúten (KHATKAR; BARAK; MUDGIL, 2013). A determinação da fração gliadina no glúten vital é importante porque, em conjunto com as gluteninas, essas proteínas são fundamentais para as propriedades viscoelásticas da rede de glúten. Quando as propriedades viscoelásticas foram estudadas para GVA e GVB através de testes reológicos fundamentais, verificou-se que GVB se mostrou menos elástico que GVA, e este comportamento pode estar ligado à modificação estrutural parcial que as proteínas de GVB sofreram durante o seu processo de obtenção, que alterou as propriedades funcionais de suas proteínas (ORTOLAN et al., 2017).

Para os teores relativos da fração de gluteninas, não foram observadas diferenças entre GVA e GVB. Para esta fração, GNV apresentou a maior proporção (84,7 g/100 g). Gluteninas são proteínas poliméricas que apresentam ligações dissulfeto intra e intermoleculares, fornecendo a característica de elasticidade à rede de glúten (SHEWRY et al., 2001), porém não foram observadas diferenças significativas entre os glúten avaliados. A alta proporção de proteínas verificada na fração de gluteninas de GNV, comparada ao seu precursor GVA, pode sugerir a presença de aglomerados proteicos que se formaram devido ao processo térmico para produção do glúten não vital e que foram solubilizados na fração de gluteninas devido ao uso do  $\beta$ -mercaptoetanol. O  $\beta$ -mercaptoetanol é um agente redutor, que é capaz de romper as ligações dissulfeto, tornando assim os aglomerados proteicos mais solúveis e, portanto, quantificando-os na fração de glutenina.

A fração denominada de resíduo foi calculada por diferença entre as demais frações e representa as proteínas que não foram solubilizadas em nenhum dos solventes utilizados.

Segundo Lookhart et al. (1993) e Dahesh et al. (2016), o trigo deveria apresentar quantidades de proteínas similares das frações de gliadinas e gluteninas, que contribuem para o balanço apropriado (ideal 1:1) dessas proteínas. Porém isso não aconteceu para GVA e GVB, pois os tipos de agregados proteicos formados por estes glúten apresentaram solubilidades diferentes nos solventes utilizados para o fracionamento. Não apenas o tipo de proteína ( $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\omega$ -gliadinas; LMW-GS, HMW-GS), mas também a quantidade presente dessas frações irá refletir nas propriedades de elasticidade e extensibilidade da rede de glúten (BEKES; GIANIBELLI; WRIGLEY, 2004; DELCOUR et al., 2012; WANG; JIN; XU, 2015). Desta forma, foi possível verificar, pelo fracionamento, que GVA apresentou melhor balanço entre gliadinas e gluteninas que GVB, devido às quantidades relativas de proteínas

semelhantes entre suas frações, que refletiu no melhor comportamento viscoelástico da rede de glúten de GVA avaliado em estudo complementar (ORTOLAN et al., 2017).

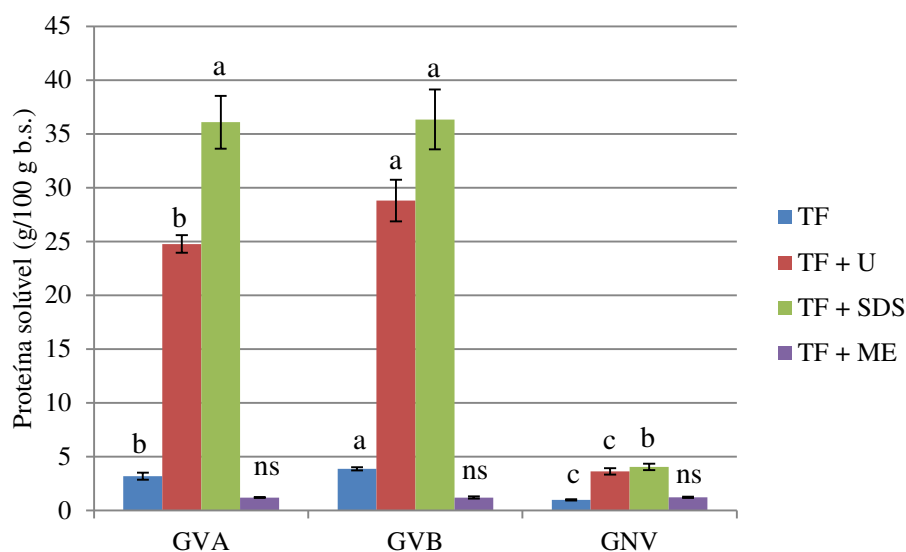
Além disso, cabe ressaltar que adaptações da técnica foram necessárias para garantir a maior solubilidade das proteínas nos diferentes solventes utilizados no fracionamento sequencial, desde o tipo e o tempo de agitação até o uso de 50 °C de temperatura de extração, que podem ter influenciado na solubilidade das proteínas de GVA, GVB e GNV. Desta forma, nas condições de análise utilizadas, foram observadas diferenças nos teores de proteínas das frações avaliadas, sendo que, dentre os glúten vitais, GVA apresentou maior quantidade de albuminas/globulinas e gliadinas, e a mesma quantidade de gluteninas que GVB.

### II.3.3. Avaliação das interações químicas

A solubilidade das proteínas do glúten em diferentes solventes está apresentada na Figura 2. O tampão fosfato (TF) foi utilizado como base para a elaboração dos demais sistemas de solventes, portanto, a solubilidade das proteínas em TF foi usada para fins de comparação. Assim, a comparação da solubilidade da proteína em diferentes meios de extração ou tampões com ou sem desnaturante (ex. ureia - U), detergente (ex. dodecil sulfato de sódio ou *sodium dodecyl sulfate* - SDS) e/ou agentes de redução (ex. β-mercaptoetanol - ME), pode fornecer informações sobre as ligações intra e intermoleculares que existem entre as proteínas do glúten (MANOI; RIZVI, 2009), e que podem depois estar envolvidas na formação da rede de glúten quando o glúten vital é utilizado no processo de panificação.

O TF solubiliza as proteínas que se encontram em seu estado nativo; a U rompe as ligações de hidrogênio que estabilizam as estruturas proteicas; o SDS forma micelas ao redor das proteínas rompendo, principalmente, as interações hidrofóbicas, e também interações eletrostáticas e iônicas; e o ME atua rompendo as ligações SS (SCHMIELE et al., 2013).

Pela Figura 2, verificou-se que GVA, GVB e GNV apresentaram pequenas quantidades de proteínas solúveis (< 5 g/100 g) no tampão fosfato, pois as proteínas formadoras da rede de glúten apresentam baixa solubilidade em sistemas aquosos, e os glúten vitais e o glúten não vital apresentam pequenas quantidades de proteínas no estado nativo, visto que eles já foram submetidos ao processo de mistura e ao tratamento térmico.



**Figura 2.** Proteínas solúveis (g/100 g, base seca) em diferentes solventes de glúten vitais de diferentes origens (GVA e GVB) e glúten não vital (GNV), sendo: TF = 40 mM de tampão fosfato (pH 7,5); U = 8 M de ureia; SDS = 2 % (m/v) dodecil sulfato de sódio; ME = 2 % (v/v) β-mercaptoetanol; Barras de erro representam os desvios padrão das replicatas. Letras minúsculas diferentes entre as colunas da mesma fração de proteína representam diferenças significativas entre as médias ( $P < 0,05$ ); ns = não significativo.

Observou-se que GVA e GVB apresentaram boa solubilização nos sistemas com adição de ureia (TF + U) e SDS (TF + SDS), indicando a grande participação de ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas na estabilização de seus agregados proteicos. GVB mostrou-se mais solúvel que GVA no sistema TF + U, provavelmente por apresentar maior quantidade de ligações de H na estabilização de seus agregados proteicos. O aumento da solubilização das proteínas dos GV no sistema contendo ureia ocorreu pela ação deste agente desnaturante que rompeu as ligações de H que estabilizam as estruturas das cadeias de proteínas, reorganizando a estrutura de modo a aumentar a solubilidade nesta solução (TF + U). Já o aumento da solubilização das proteínas dos glúten vitais no sistema contendo SDS ocorreu pela natureza hidrofóbica das gliadinas e gluteninas. O GNV apresentou baixa solubilidade na presença de ureia e SDS, provavelmente porque seus agregados proteicos apresentam uma estrutura de difícil acesso para esses agentes desnaturante e detergente, respectivamente, tornando-os insolúveis nos sistemas TF + U e TF + SDS. Rasheed et al. (2014) observaram, em seu estudo, que as proteínas do trigo quando submetidas à desnaturação térmica (130 ° C/10 min) podem formar agregados, reduzindo sua solubilidade em soluções contendo SDS, comparadas às proteínas nativas.

Quando o  $\beta$ -mercaptoetanol (ME) foi utilizado no sistema TF + ME, percebeu-se uma menor solubilidade das proteínas dos glúten vitais comparado aos demais sistemas de solventes utilizados, possivelmente, pela pequena quantidade de ligações SS presentes em suas proteínas. Por ser um agente redutor, o ME é capaz de romper as ligações SS, aumentando a solubilidade das proteínas pela “abertura” dos agregados proteicos.

GVA e GVB apresentaram diferenças na solubilidade de suas proteínas, indicando que ambos formaram aglomerados proteicos com características diferentes, que podem refletir em diferenças nas propriedades viscoelásticas da rede de glúten por eles formadas.

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) de grupos SH totais, livres e pontes dissulfeto (SS) para as amostras de glúten vital e glúten não vital.

**Tabela 2.** Quantidades de grupos tiol acessíveis (SH total e SH livre) e ligações dissulfeto (SS) de glutens vitais de diferentes origens (GVA e GVB) e glúten não vital (GNV)

| Glúten           | SH total<br>( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) | SH livre<br>( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) | SS<br>( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) |
|------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| Glúten vital A   | 30,95 $\pm$ 2,27 a                        | 2,58 $\pm$ 0,24 ns                        | 28,37 $\pm$ 2,51 ns                 |
| Glúten vital B   | 29,69 $\pm$ 2,25 a                        | 2,51 $\pm$ 0,25 ns                        | 27,18 $\pm$ 2,42 ns                 |
| Glúten não vital | 25,36 $\pm$ 0,30 b                        | --                                        | --                                  |

Médias seguidas de desvios-padrão; As médias com letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ); ns = não houve diferença significativa entre as médias.

Analisando os resultados, foi possível verificar que GVA e GVB não diferiram na quantidade de grupos sulfídricos totais e livres e nas ligações dissulfeto. Por outro lado, GNV apresentou o menor valor de SH total e para esta amostra não foi possível quantificar SH livre (e, portanto, SS). Em relação às ligações SS, os resultados estão de acordo com os apresentados na Figura 2 (TF + ME), quando são avaliadas as interações SS pela utilização de  $\beta$ -mercaptoetanol, um agente redutor, onde também não houve diferença entre GVA e GVB, indicando que essas ligações são importantes para a formação de rede proteica, polímeros e agregados proteicos, mas estas não são as únicas responsáveis pelas diferentes características físico-químicas e tecnológicas dos glúten vitais.

Os grupos sulfídricos das cadeias de gliadinas e gluteninas têm papel importante no desenvolvimento da rede de glúten (JOYE et al., 2009; JEKLE; BECKER, 2013). Embora em pequena quantidade, os grupos sulfídricos não são estáticos durante o desenvolvimento da rede de glúten, mas de natureza transitória (SCHIEDT et al., 2013), levando ao intercâmbio das ligações SH/SS. Durante a mistura, as ligações dissulfeto “nativas” das cadeias de

gliadinas e gluteninas podem se romper pela força aplicada sobre elas, formando novos SH/SS, dentro da mesma molécula de proteína (SS intramoleculares) ou com outra molécula de proteína (SS intermoleculares) (SINGH; MACRITCHIE, 2001; WIESER, 2007; JEKLE; BECKER, 2013; DELCOUR et al., 2012; WANG et al., 2015).

Segundo Pyler (1973), as ligações SS intermoleculares, por serem mais reativas, são mais importantes para as propriedades reológicas da rede de glúten. Este intercâmbio fornece um mecanismo de alívio da deformação criada entre as proteínas do glúten, atrasando assim o enfraquecimento da massa no “overmixing” (PYLER, 1973; SLUIMER, 2007; CAUVAIN, 2015). No intercâmbio das ligações SH/SS não ocorrem perdas destes grupos, isto é, os grupos sulfídricos podem reagir mais de uma vez, sem prejuízo aos grupamentos envolvidos (PYLER, 1973).

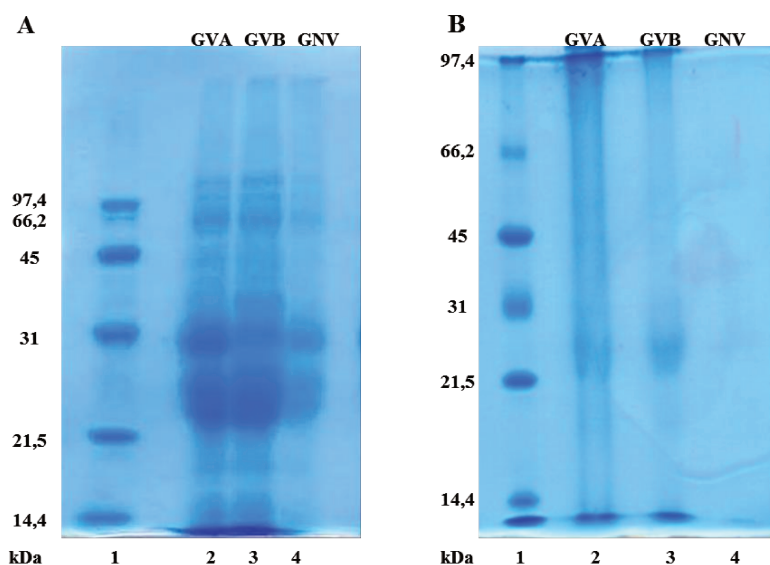
O uso de diferentes materiais (farinha, massa, glúten) para a determinação de SH, diferentes métodos analíticos e diferentes expressões dos resultados (RAKITA et al., 2014), torna difícil a comparação com resultados oriundos de outras pesquisas.

#### II.3.4. Perfil das proteínas por tamanho molecular

##### II.3.4.1. SDS-PAGE

Na Figura 3 (A e B) está apresentado o perfil de separação por tamanho molecular das proteínas constituintes dos glútenos vitais (GVA e GVB) e do glúten não vital (GNV) em gel de poliacrilamida sob condições redutoras, o que possibilitou avaliar a distribuição por tamanho molecular das proteínas que se encontram nos glútenos avaliados.

GVA, GVB e GNV apresentaram perfis eletroforéticos em condições redutoras (Fig. 4A) similares. Todos os perfis mostraram bandas de proteínas correspondendo às gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS  $\geq$  97 kDa) (GUERRIERI et al., 1996),  $\omega$ -gliadinas (39-55 kDa) (WIESER, 2007),  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas (30-41 kDa) (GUERRIERI et al., 1996), gluteninas de baixo peso molecular (LMW-GS, 30-40 kDa) (GÓMEZ et al., 2012), e também as albuminas/globulinas (14-16 kDa) (GUERRIERI et al., 1996). Enquanto GVA e GVB apresentaram intensidades de bandas semelhantes, as do GNV mostrou intensidade menor, provavelmente porque parte de suas proteínas não foi solubilizada no tampão da amostra, já que a mesma concentração de proteínas foi utilizada no preparo de GVA, GVB e GNV (0,08 g/mL). Deste modo, pela Figura 3A, verificou-se que gliadinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -) e LMW-GS estão em maior proporção em GVA e GVB que GNV. Além disso, observaram-se bandas na extremidade superior do gel, em especial para GVB e GNV, indicando a presença de agregados proteicos mesmo em condições desnaturantes e redutoras.



**Figura 3.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas dos glútenos vitais e do glúten não vital sob condições redutoras (A) e não redutoras (B). Coluna 1 – padrão de proteína para eletroforese; ao lado estão indicadas as massas moleculares das proteínas do padrão utilizado para comparação; Coluna 2 – glúten vital A – GVA; Coluna 3 – glúten vital B – GVB; Coluna 4 – glúten não vital – GNV.

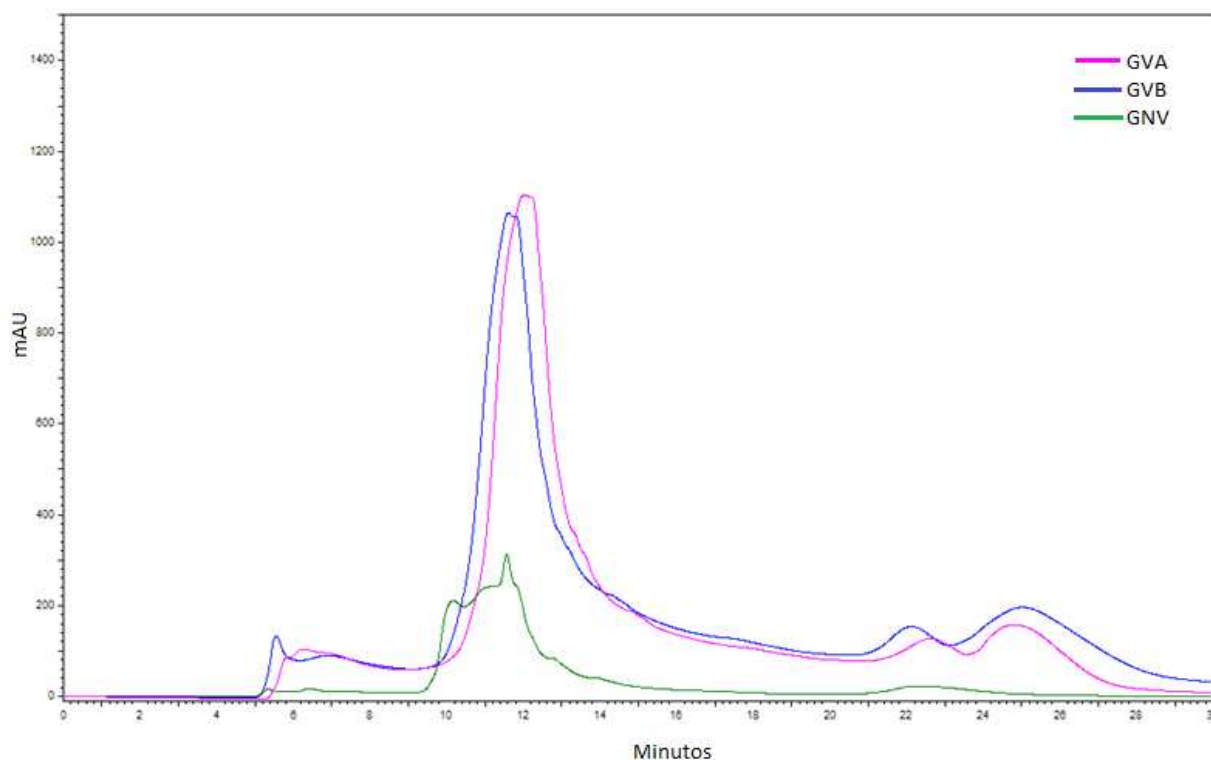
Os perfis eletroforéticos, sob condições não redutoras (Fig. 3B), apresentaram diferenças entre GVA, GVB e GNV. GVA apresentou maior quantidade de agregados estabilizados por ligações dissulfeto que GVB, conforme observado pela fração retida no topo do gel. Além disso, foi possível observar uma mesma fração proteica nos perfis de GVA e GVB, com peso molecular compreendido entre 21,5 e 31 kDa, relacionado às albuminas e globulinas, grupo heterogêneo de proteínas encontradas no trigo (BIETZ; SIMPSON, 1992). O aumento das bandas entre 14,4 e 27 kDa, em condições não redutoras foi também observado por Wang et al. (2014), indicando que esta fração não faz parte de agregados estabilizados pelas pontes dissulfeto, que estão retidos no topo do gel. O GNV possivelmente não foi solubilizado nas condições de análise, por isso, não apresentou bandas proteicas no gel de separação e nem agregados proteicos retidos no topo do gel.

A análise do perfil de separação por tamanho molecular permitiu observar a presença de proteínas com massas moleculares que correspondem às proteínas presentes no grão de trigo e, conseqüentemente, nos produtos oriundos deste grão (como o glúten vital), com classificação, de acordo com a massa molecular em albuminas e globulinas, gliadinas e gluteninas. Também foi possível verificar a presença de agregados proteicos em GVA e GVB quando eles foram submetidos a condições não redutoras.

#### II.3.4.2. SEC-HPLC

Os cromatogramas de GVA, GVB e GNV estão representados na Figura 4. Os resultados da distribuição da massa molecular aparente das proteínas dos glútenos vitais e do glúten não vital foram descritos comparando-os com o padrão de proteínas.

Os perfis cromatográficos de GVA e GVB são semelhantes entre si e diferentes do GNV. Para os glútenos vitais, observou-se a presença de proteínas com  $MM \geq 670$  kDa (TR inferior a 8 min), especialmente relacionadas aos agregados proteicos; MM de 63 a 13,5 kDa (TR de 10 a 16 min), referindo-se à maior parte das proteínas que constituem os dois glútenos vitais, e, possivelmente, não são proteínas isoladas, mas sim grupos de proteínas monoméricas (gliadinas) e poliméricas (gluteninas); e  $MM < 13,5$  kDa (TR de 21 a 28 min), sugerindo a presença de albuminas e globulinas nos glútenos vitais, como visto anteriormente.



**Figura 4.** Cromatogramas (por exclusão de tamanho molecular) característicos dos glútenos vitais de diferentes origens (GVA e GVB) e glúten não vital (GNV).

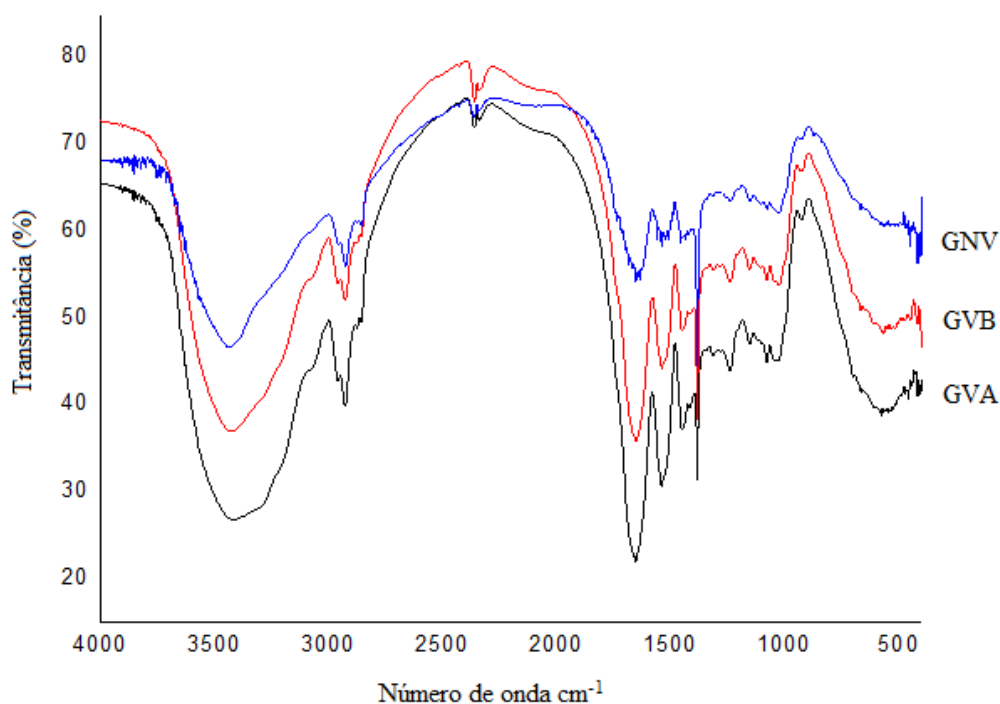
O perfil cromatográfico do GNV apresentou diferenças em relação a GVA e GVB. GNV apresentou o pico com MM aparente de 63 a 13,5 kDa, porém com menor intensidade que os glútenos vitais. O tratamento térmico pode ter formado agregados proteicos que ficaram retidos no filtro utilizado durante o preparo da amostra antes da injeção na coluna de separação, refletindo na ausência de picos encontrados em GVA e GVB e na menor

intensidade do sinal do pico com MM aparente relacionada às proteínas monoméricas e poliméricas do glúten.

Estes resultados mostram que os glúten vitais apresentaram perfis de massa molecular aparente muito próximos, mesmo ambos sendo de diferentes origens, e, provavelmente, sendo produzidos a partir de diferentes genótipos de trigo e por diferentes métodos de extração.

### II.3.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica que pode ser utilizada para estudar diferentes propriedades químicas das macromoléculas, por exemplo, conformação estrutural, ligações de hidrogênio, estado redox, entre outras (BARTH, 2007). A Figura 5 apresenta os espectros de transmitância no infravermelho médio das amostras de glúten vital (GVA e GVB) e não vital (GNV).



**Figura 5.** Espectros de transmitância no infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) obtidos dos glúten vitais (GVA e GVB) e do glúten não vital (GNV).

Os espectros de infravermelho (FTIR) (Fig.5) mostram que GVA, GVB e GNV apresentaram bandas características de glúten, conforme relatado por Majzoobi; Abedi (2014). Desta forma, GVA e GVB não apresentaram diferenças no espectro de IR, porém

GNV mostrou pequenas diferenças em relação a GVA (precursor de GNV), que serão discutidas a seguir.

Foram observadas bandas na região de 3600-3100  $\text{cm}^{-1}$  (FORATO; BERNARDES-FILHO; COLNAGO, 1998) que caracterizam os estiramentos das ligações O-H e  $-\text{NH}_2$  (amina livre); na região de estiramento das ligações C-H ( $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ ) (WANG et al., 2016); e também na região de  $\sim 1800\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$  (que envolvem as ligações C=O e N-H), que caracteriza a maior parte das frequências do IR para as classes químicas comumente encontradas em proteínas (GARIDEL; SCHOTT, 2006), e são muito utilizadas para estudar as estruturas secundárias das proteínas (FORATO et al., 1997). A forma e a intensidade das bandas existentes nessa região são atribuídas às configurações em  $\alpha$ -hélices (1648-1657  $\text{cm}^{-1}$ ), estruturas  $\beta$ -folha (1623-1641  $\text{cm}^{-1}$  e 1674-1695  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -voltas (1662-1686  $\text{cm}^{-1}$ ) e estruturas desordenadas (1642-1657  $\text{cm}^{-1}$ ) (TATTINI JR; PARRA; PITOMBO, 2006; WANG et al., 2016) que foram observadas para GVA, GVB e GNV (Fig. 5).

Uma vez que a grande maioria das moléculas orgânicas possui muitas ligações simples, as bandas abaixo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  tornam-se muito complexas para interpretação (GARIDEL; SCHOTT, 2006). Uma região de interesse para o estudo das estruturas do glúten é a banda de 700-500  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento S-S e C-S, que caracterizam o espectro da cistina (TATTINI JR; PARRA; PITOMBO, 2006), que foi observada para GVA, GVB e GNV. Além disso, não foi observado o aparecimento de banda em 2560  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizando a ausência do estiramento do grupo S-H, indicando que ocorreu a oxidação da cisteína em cistina. A redução de SH no glúten vital e não vital está associada à etapa de formação da rede de glúten que ocorre durante a obtenção do glúten vital, proporcionando a oxidação dos grupos SH livres às ligações SS e o intercâmbio das ligações SS nas gliadinas e gluteninas (JANSENS et al., 2011).

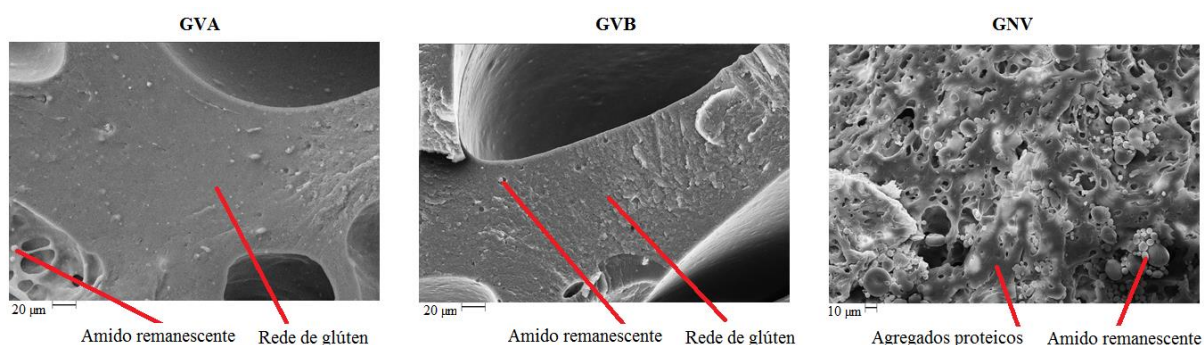
Considerando que GNV sofreu tratamento térmico de GVA e comparando os espectros de ambos, foi possível observar algumas alterações no formato das bandas do GNV. As alterações foram encontradas nas regiões de estiramento de O-H e  $-\text{NH}_2$  (3600-3100  $\text{cm}^{-1}$ ), na região de estiramento de C-H ( $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ ), e na região de estiramento dos compostos sulfurados (700-500  $\text{cm}^{-1}$ ). Essas alterações provavelmente ocorreram em virtude de alterações promovidas pelo tratamento térmico de GNV, resultando em deformações das bandas em virtude da modificação estrutural causada pelo tratamento térmico a que foi exposto, refletindo em alterações no perfil das ligações de suas proteínas.

As respostas obtidas pelo IR são importantes para o entendimento da estrutura secundária das proteínas que constituem as amostras de glúten vital, que são fundamentais

para o comportamento viscoelástico da rede de glúten que por elas será formada. Além disso, esses resultados podem informar ainda sobre as perdas (por oxidação, redução, etc) dos aminoácidos, ou ainda, sobre a desnaturação mecânica e/ou térmica que podem ocorrer durante as etapas de mistura e secagem na obtenção do glúten vital. Foi possível observar que as amostras de glúten vital encontravam-se estruturalmente organizadas, com estruturas secundárias em  $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -folha e  $\beta$ -voltas semelhantes entre si. Já para o glúten não vital observaram-se alterações estruturais, principalmente relacionadas aos compostos sulfurados envolvidos na ligação SS, que ocorreu pelo tratamento térmico.

### II.3.6. Avaliação microscópica da superfície da rede de glúten

As micrografias da rede de glúten formada a partir de GVA, GVB e GNV estão apresentadas na Figura 6. Para GVA e GVB ocorreu a formação da rede de glúten, com alguns grânulos de amido remanescentes presos à estrutura, já que as redes de glúten avaliadas foram obtidas de glúten vitais reconstituídos com amido de trigo. GVA e GVB não apresentaram diferenças em relação à estrutura de rede formada. O GNV não formou a rede homogênea observada nos glúten vitais, pois a sua proteína, que estava previamente agregada, não fez as ligações formadas anteriormente, e portanto, não foi capaz de formar as interações necessárias (proteína-proteína e proteína-água) para o desenvolvimento da estrutura da rede de glúten.



**Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura da rede de glúten formada a partir de glúten vitais (GVA e GVB) e de agregados proteicos formados a partir do glúten não vital (GNV) com aumento de 1000x.

## II.4. Conclusões

Dentre as diferenças químicas e estruturais que envolveram os glútenos avaliados, a quantidade relativa de proteínas distribuídas entre as diferentes frações que constituem os glútenos vitais, e também as interações envolvidas na estabilização de suas cadeias proteicas, parecem ser as mais relevantes para influenciar na qualidade tecnológica deste produto. Quando há melhor balanço entre a quantidade de gliadinas e gluteninas, possivelmente, a rede de glúten formada (pela hidratação do glúten vital associado ao trabalho mecânico) é de melhor qualidade viscoelástica, contribuindo para o processo de panificação. O uso de glúten não vital foi importante para revelar que o processo térmico, utilizado na etapa de secagem do glúten vital, se não realizado sob rigoroso controle de temperatura e tempo, pode levar a perdas na qualidade tecnológica, devido às alterações químicas e estruturais.

Este estudo representa uma importante contribuição para melhorar as informações sobre as proteínas que constituem os diferentes glútenos vitais comerciais, garantindo o uso mais adequado deste produto, especialmente, na elaboração de pães.

## Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (concessão número 163129/2013-4) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (concessão número 2014/02533-9) através de bolsas aos autores Fernanda e Karoline, respectivamente. Os autores gostariam de agradecer a Labonathus® (São Paulo, SP) e a Granotec® (Curitiba, PR, Brasil) pela doação de glúten vital de trigo.

## Referências

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International. **Approved methods**, 11th ed., St. Paul: AACCI. 2010.
- ABANG ZAIDEL, D. N. et al. Rheological characterisation of gluten from extensibility measurement. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 549–556, jun. 2008.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica**, v. 1767, p. 1073–1101, 2007.
- BEKES, F.; GIANIBELLI, M. C.; WRIGLEY, C. Grain Proteins and Flour Quality. **Australian Journal of Agricultural Research**, p. 416–423, 2004.
- BELTON, P. S. On the Elasticity of Wheat Gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 29, n. 2, p. 103–107, 1999.

BIETZ, J. A.; SIMPSON, D. G. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: Available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. **Journal of Chromatography**, v. 624, n. 1–2, p. 53–80, 1992.

BRASIL. **Regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal**. Brasil.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, 2005. Disponível em:

<<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=371&data=23/09/2005>>

CAUVAIN, S. **Technology of breadmaking**. Third edit ed. New York: Springer, 2015.

CHAN, K. Y.; WASSERMAN, B. P. Direct Colorimetric Assay of Free Thiol-Groups and Disulfide Bonds in Suspensions of Solubilized and Particulate Cereal Proteins. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 22–26, 1993.

CHIANG, A. **Protein-protein interaction of Soybean Protein from Extrusion Processing**. [s.l.] University of Missouri-Columbia, 2007.

DAHESH, M. et al. Spontaneous gelation of wheat gluten proteins in a food grade solvent. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 1–10, 2016.

DAY, L. et al. Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 82–90, fev. 2006.

DELCOUR, J. A et al. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. **Annual review of food science and technology**, v. 3, p. 469–92, jan. 2012.

ESTELLER, M. S.; PITOMBO, R. N. M.; LANNES, S. C. S. Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 1, p. 19–21, jan. 2005.

FORATO, L. A. et al. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de ftir para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 146–150, 1997.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy. **Analytical biochemistry**, v. 259, November, p. 136–141, 1998.

FREDERIX, S. .; COURTIN, C. .; DELCOUR, J. . Influence of process parameters on yield and composition of gluten fractions obtained in a laboratory scale dough batter procedure. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 1, p. 29–36, jan. 2004.

GARIDEL, P.; SCHOTT, H. Fourier-Transform Midinfrared Spectroscopy for Analysis and Screening of Liquid Protein Formulations Part 2: Details Analysis and Applications. **BioProcess International**, v. 1, p. 48–55, 2006.

- GÓMEZ, A. V. et al. Analysis of soluble proteins/aggregates derived from gluten-emulsifiers systems. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 62–68, 2012.
- GUERRIERI, N. et al. Use of spectroscopic and fluorescence techniques to assess heat-induced molecular modifications of gluten. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 368–374, 1996.
- GUERRIERI, N.; CERLETTI, P. Effect of High-Temperature Short-Time Treatment of Wheat Flour on Gluten Vitality and Structure. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 6–9, 1996.
- JANSENS, K. J. A. et al. Effect of temperature, time and wheat gluten moisture content on wheat gluten network formation during thermomolding. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 3, p. 434–441, nov. 2011.
- JEKLE, M.; BECKER, T. Wheat dough microstructure: The relation between visual structure and mechanical behavior. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. February 2014, p. 369–382, 2013.
- JOYE, I. J.; LAGRAIN, B.; DELCOUR, J. A. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking – A review. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 11–21, 2009.
- KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International journal of biological macromolecules**, v. 53, p. 38–41, mar. 2013.
- KHATKAR, B. S.; BELL, A. E.; SCHOFIELD, J. D. The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 22, n. 1, p. 29–44, jul. 1995.
- KIEFFER, R. et al. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. **Journal of Cereal Science**, v. 45, n. 3, p. 285–292, maio 2007.
- LOOKHART, G. L. et al. Comparison of high-molecular-weight subunits of glutenin and baking performance of flours varying in bread-making quality. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 26, p. 301–306, 1993.
- MACRITCHIE, F. Theories of glutenin / dough systems. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 733–735, 2014.
- MAJZOABI, M. .; ABEDI, E. Effects of pH changes on functional properties of native and acetylated wheat gluten. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 1219–1224, 2014.
- MANOI, K.; RIZVI, S. S. H. Physicochemical changes in whey protein concentrate texturized by reactive supercritical fluid extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 627–

635, 2009.

MARCHETTI, L. et al. Effect of glutens of different quality on dough characteristics and breadmaking performance. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 224–231, abr. 2012.

MCCANN, T. H.; DAY, L. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 3, p. 444–452, 2013.

MILLER, K. A.; HOSENEY, R. C. Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 105–109, 1999.

ORTOLAN, F. et al. Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 647–654, 2017.

PYLER, E.J. **Baking Science and Technology**, 3rd Ed. Kansas City: Sosland Publishing Company, p.357–377. 1988.

RAKITA, S. D. S. et al. Determination of free sulphhydryl groups in wheat gluten under the influence of different time and temperature of incubation: Method validation. **Food Chemistry**, v. 150, p. 166–173, 2014.

RASHEED, F. et al. Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. **RSC Adv.**, v. 4, n. 4, p. 2051–2060, 2014.

SCHIEDT, B. et al. Short- and Long-Range Interactions Governing the Viscoelastic Properties during Wheat Dough and Model Dough Development. **Journal of Texture Studies**, v. 44, n. 4, p. 317–332, 17 ago. 2013.

SCHLUENTZ, E. J.; STEFFE, J. F.; NG, P. K. W. Rheology and microstructure of wheat dough developed with controlled deformation. **Journal of Texture Studies**, v. 31, p. 41–54, 2000.

SCHMIELE, M. et al. Determinação da concentração de diferentes sistemas de solventes na solubilização de proteínas de análogo de carne. **Ciência Rural**, p. 1–6, 2013.

SCHOFIELD, J. D. et al. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. **Journal of Cereal Science**, v. 1, p. 241–253, 1983.

SHEWRY, P. R. et al. Wheat glutenin subunits and dough elasticity : findings of the EUROWHEAT project. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 433–441, 2001.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W.; CORNISH, G. B. A simplified SDS—PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. **Journal of Cereal Science**, v. 14, n. 3, p. 203–208,

nov. 1991.

SINGH, H., & MACRITCHIE, F. Application of polymer science to properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p. 231–243, 2001.

SLUIMER, P. **Principles of breadmaking**. St. Paul: AACCI. p.1-212. 2005.

TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. D. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 127–136, 2006.

TRONSMO, K. M. et al. A Study of how Size Distribution of Gluten Proteins, Surface Properties of Gluten and Dough Mixing Properties Relate to Baking Properties of Wheat Flours. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 201–214, 2002.

TUHUMURY, H. C. D.; SMALL, D. M.; DAY, L. The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 1, p. 229–237, 2014.

VAN DER BORGHT, A. et al. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 221–237, maio 2005.

WANG, K.-Q. et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten formation. **Food chemistry**, 2016.

WANG, P. et al. Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 187–194, 2014.

WANG, P.; JIN, Z.; XU, X. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives.

**Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, Part A, p. 189–198, 2015.

WEEGELS, P. L. et al. Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 31–38, 1994.

WEEGELS, P. L.; MARSEILLE, J. P.; HAMER, R. J. Small Scale Separation. **Starch**, v. 40, n. 9, p. 342–346, 1988.

WHITE, J. A; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of automatic chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–7, jan. 1986.

WIESER, H. Investigations on the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung**, v. 207, p. 128–132, 1998.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115–9, abr. 2007.

ZHOU, Y. et al. Konjac glucomannan-induced changes in thiol/disulphide exchange and gluten conformation upon dough mixing. **Food chemistry**, v. 143, p. 163–9, 15 jan. 2014.

### **ARTIGO III.**

---

#### **Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride**

Fernanda Ortolan; Gabriela Paiva Corrêa; Rosiane Lopes da Cunha; Caroline Joy Steel

Published in

LWT - Food Science and Technology, v.79, p. 647-654, 2017

doi: 10.1016/j.lwt.2017.01.059

(Anexo 2)

### III. Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride

Fernanda Ortolan; Gabriela Paiva Corrêa; Rosiane Lopes da Cunha; Caroline Joy Steel

#### Abstract

Vital wheat gluten is an ingredient used in the bakery industry. The objective of this research was to evaluate the quality of two different vital wheat glutens (A and B) through fundamental and empirical rheological tests. Samples of wet gluten and of dough prepared with wheat flour fortified with 5 or 7 g/100 g gluten were evaluated, with or without sodium chloride. In the fundamental tests, the gluten network showed higher storage modulus values when prepared with water than when prepared with salt solution. Extensograph measurements showed that the dough prepared with salt solution presented greater resistance, maximum resistance, and area under curve than when prepared with water. In both fundamental and empirical tests, vital wheat gluten A was superior to vital wheat gluten B. The differences found between fundamental and empirical tests can be associated with the magnitude and type of force applied, as well as the protein composition and quality of the vital wheat glutens. These tests were good tools for evaluating the differences between vital wheat glutens.

**Keywords:** fundamental rheology, empirical rheology, extensograph, rheometer, dough, gluten network

#### III.1. Introduction

Wheat gluten is a common food ingredient that can be used to fortify weak wheat flours to produce breads with good quality. This product is obtained from wheat flour and is marketed as “vital wheat gluten” when its technological properties are maintained after hydration. Dry vital wheat gluten, when in contact with water, rehydrates rapidly and regains its intrinsic functionality. Vitality has been related to the rate of water absorption and degree of viscoelasticity (Miller & Hosney, 1999). To improve characteristics such as flour strength, dough mixing tolerance, and bread volume, vital wheat gluten is added to flour at levels varying from 2 to 10 g/100 g (Wadhawan & Bushuk, 1989), with 5 g/100 g being a commonly used concentration (Czuchajowska & Paszczynska, 1996). However, the vital wheat gluten commercialized in the market has few quality specifications, especially related to the characteristics of the proteins that constitute the protein network responsible for its viscoelastic properties. Gluten is a viscoelastic protein complex, having both elastic and

viscous properties (Tuhumury, Small, & Day, 2014; Wieser, 2007). Gluten contains two major protein groups: glutenins and gliadins. It is generally accepted that glutenin contributes mainly to elastic properties whereas gliadin contributes primarily to viscous properties (Delcour et al., 2012; MacRitchie, 2014; McCann & Day, 2013).

It is widely known that the strength of a dough depends on the arrangement of the three-dimensional gluten network, which is a consequence of the number of disulfide bonds and sulfhydryl groups in the proteins. It should be noted that most of the changes in dough mixing properties are caused by thiol-disulfide interchange reactions between gliadins and glutenins (Delcour et al., 2012). Some studies (Delcour et al., 2012; MacRitchie, 2014; Wang, Jin, & Xu, 2015; Wellner et al., 2005) have sought to understand the formation of the gluten network. One of the most accepted theories is the “loop-train theory” (Belton, 1999), which establishes that not only are disulfide bonds involved in gluten network formation, but hydrogen bonds also contribute to the interaction between gliadins and glutenins (Ng & McKinley, 2008). Thus, evaluating rheological properties is important in determining the behavior of the gluten network in dough during mechanical handling, in addition to its influence on the quality of the finished product. Rheological tests such as those applied in cereal research and industry have been classified as empirical or fundamental.

Studies on the fundamental rheology of dough and/or gluten (McCann & Day, 2013; Singh & Singh, 2013; Song & Zheng, 2007; Tronsmo, Magnus, Færgestad, & Schofield, 2003) are usually carried out using small deformation, whereas the empirical measurements are made using large deformation. Empirical dough and gluten rheological tests using large deformations are more popular for evaluating dough quality, but rheological measurements carried out using small deformations can be useful to complement information on the strength of the network. The structure and interactions between gliadins and glutenins that contribute to gluten network formation are affected by solvents during hydration and the presence of salt (Tuhumury et al., 2014). Salt, depending on its concentration, reduces protein repulsive forces, allowing greater interaction between them, thus strengthening the gluten network. On the other hand, salt can also have osmotic effects, preventing or delaying protein hydration (McCann and Day, 2013; Schober, Dockery, & Arendt, 2003; Tuhumury et al., 2014; Wellner, Bianchini, Mills, & Belton, 2003), and water clearly plays a critical role in gluten development (Abang Zaidel, Chin, Abdul Rahman, & Karim, 2008; Belton, 1999). Besides that, the fact that salt can either strengthen or weaken noncovalent intermolecular interactions makes it a good tool for studying protein-protein interactions in gluten (Wellner et al., 2003).

These rheological measurements can show the difference between vital wheat glutens and the effects of sodium chloride on gluten network formation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the fundamental and empirical rheological properties of the gluten network and of doughs produced, with or without sodium chloride, from vital wheat glutens of different qualities and wheat flour fortified with 5 or 7 g/100 g of these vital wheat glutens.

## **III.2. Materials and methods**

### **III.2.1. Material**

Two samples of commercial vital wheat gluten were kindly donated by Labonathus (São Paulo, SP, Brazil) and Granotec (Curitiba, PR, Brazil), which were named VGA and VGB, respectively. The wheat flour control (CWF) was provided by Sul Mineiro Mill (Varginha, MG, Brazil). The proximate composition of the raw materials was performed according to AACCI (2010) and results showed the following: 9.01 g/100 g moisture, 0.83 g/100 g ash, 2.74 g/100 g lipids, 75.32 g/100 g proteins, and 21.11 g/100 g carbohydrates for VGA; 6.79 g/100 g moisture, 0.72 g/100 g ash, 0.81 g/100 g lipids, 77.38 g/100 g proteins, and 21.09 g/100 g carbohydrates for VGB; 11.89 g/100 g moisture, 0.72 g/100 g ash, 1.17 g/100 g lipids, 13.6 g/100 g proteins, and 72.62 g/100 g carbohydrates for CWF. The methods applied to measure the proximate composition were: moisture content (AACCI method 44-15.02), ash content (AACCI method 08-01.01), protein content (AACCI method 46-13.01), using 5.7 as correction factor, lipids content (AACCI method 02-01.02), and carbohydrates by difference  $[100 - (\text{ash} + \text{protein} + \text{lipids})]$ . The results are given on a dry weight basis except for moisture content.

### **III.2.2. Methods**

#### **III.2.2.1. Sample codes**

The sample codes used in this study are described in Table 1. VGA, VGB, and CWF were used to prepare blends with different levels (5 and 7 g/100 g) of VGA or VGB for flour fortification. These levels of fortification were chosen after pre-baking tests were carried out (data not shown).

**Table 1.** Codes for the samples used in this study for fundamental rheological measurements and empirical rheological measurement

| Samples                                                      | Fundamental Rheological Measurements<br>wet gluten (G) |                                   | Empirical Rheological Measurement<br>dough (D) |                              |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|
|                                                              | Wet gluten prepared with water (W)                     | Wet gluten prepared with salt (S) | Dough prepared with water (W)                  | Dough prepared with salt (S) |
| Vital gluten A                                               | VGA W                                                  | VGA S                             | --                                             | --                           |
| Vital gluten B                                               | VGB W                                                  | VGB S                             | --                                             | --                           |
| Control wheat flour                                          | GWF W                                                  | GWF S                             | DWF W                                          | DWF S                        |
| Wheat flour fortified with 5 g/100 g of vital wheat gluten A | G5A W                                                  | G5A S                             | D5A W                                          | D5A S                        |
| Wheat flour fortified with 7 g/100 g of vital wheat gluten A | G7A W                                                  | G7A S                             | D7A W                                          | D7A S                        |
| Wheat flour fortified with 5 g/100 g of vital wheat gluten B | G5B W                                                  | G5B S                             | D5B W                                          | D5B S                        |
| Wheat flour fortified with 7 g/100 g of vital wheat gluten B | G7B W                                                  | G7B S                             | D7B W                                          | D7B S                        |

To better understand the difference between vital wheat glutens of different quality, all of the rheological tests (fundamental and empirical) were performed by adding both water and salt, owing to the fact that bakers routinely add a small amount of NaCl to wheat flour doughs (1 to 2 g/100 g, flour basis) to prepare different types of breads (Wellner et al., 2003). The fundamental rheological tests were carried out with wet gluten and the empirical rheological tests were performed with dough.

#### III.2.2.2. Gluten reconstitution and wet gluten preparation

The fundamental rheological tests were carried out with wet gluten, which was prepared with reconstituted vital wheat gluten. Before preparing the wet gluten, the dry vital wheat glutens (VGA and VGB) were reconstituted with native wheat starch until each sample reached 12 g/100 g (w/w) protein content to standardize the protein content in both samples.

The wet gluten was prepared in a Glutomatic 2200 machine (Perten Instruments, Hägersten, Sweden), following AACCI method 38-12.02 (AACCI, 2010) without the centrifugation and drying steps. The wet gluten was obtained from washing with water or salt solution containing 2 g/100 mL (w/v) NaCl. The procedure was performed in triplicate, and the samples were maintained in a water saturation environment until the fundamental rheological analysis.

### III.2.2.3. Rheological measurements

Fundamental rheological properties of wet gluten prepared from VGA and VGB and their blends with water or salt were measured with a strain-controlled Rheometer AR 1500 ex model (TA Instruments, New Castle, USA), using a 20-mm diameter cone-plate geometry, and the equilibration time was 1 min at 35°C. This analysis was performed with wet gluten instead of dough to better understand the contribution of protein supplementation on wheat flour, without interference from other flour constituents. The wet gluten was placed between a cone and plate geometry (cone truncation 0.057 mm). The excess wet gluten was trimmed off carefully with a razor blade, and a thin layer of silicone oil was applied to the exposed wet gluten surfaces to prevent moisture loss. The parameters obtained were  $G'$  and  $\tan \delta$ . All tests were run in triplicate.

Samples were characterized via strain (1 Hz, 0.1–10% strain at 25°C) and frequency sweeps within the linear viscoelastic region (1% strain, 0.1–10 Hz at 25°C). Temperature sweep experiments were performed as described by Stathopoulos et al. (2008), with some modifications. The initial temperature was 35°C and the final temperature was 90°C. The rate of temperature increase used was 274.15 K /min. The strain used was 1% and the frequency was kept at 1 Hz.

For empirical rheological measurements, an Extensograph-E (Brabender, Duisburg, Germany) was used to measure dough stretching properties, particularly the resistance to extension and the extensibility, according to AACCI method 54-10.01 (AACCI, 2010). This measurement was performed in triplicate with the CWF fortified with 5 or 7 g/100 g of VGA or VGB with water or with a salt solution containing 2 g/100 mL NaCl.

#### III.2.2.3.1. Calculation of power law parameters

In the present study, power law constant (slope), relating  $G'$  to frequency, was calculated using the equation  $G' = G_0' \omega^n$ .

Where  $G'$  represents the storage modulus,  $n$  is the corresponding slope,  $\omega$  is the frequency and  $G_0'$  is the intercept of the power law model for the frequency sweep.

### III.2.3 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed for experimental data with a 5% level of significance and average multiple comparisons were made with the Tukey test, using Statistica 7.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

### III.3. Results and discussion

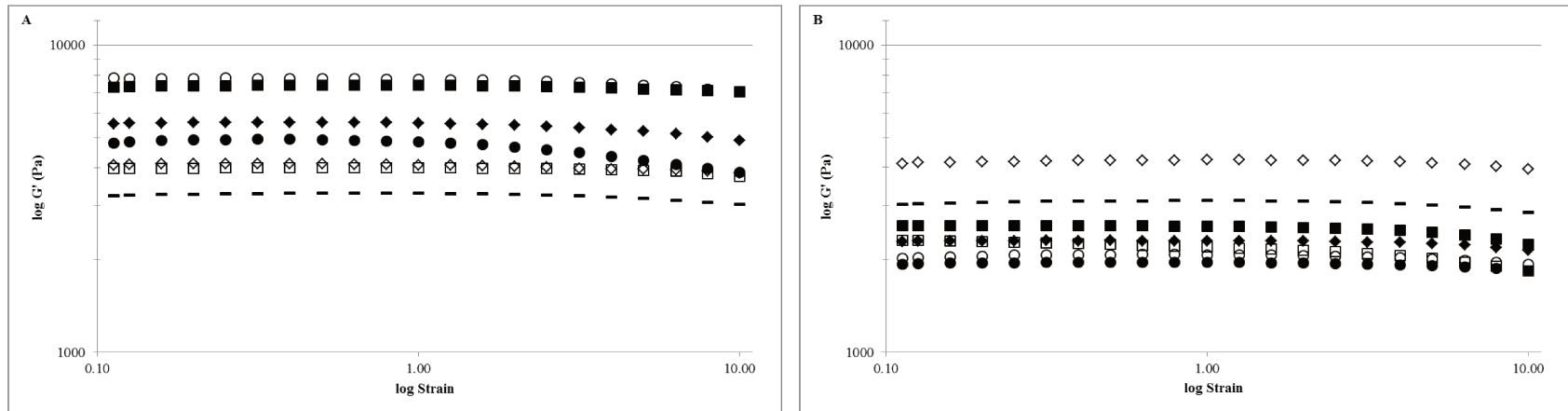
#### III.3.1. Fundamental rheological measurements

##### III.3.1.1. Strain sweep

Strain sweeps are usually performed to identify the linear viscoelastic region of various materials, including polymeric networks such as wet gluten and dough, by defining its strain limit until irreversible deformation. The typical strain sweep curves for the storage modulus ( $G'$ ) of the wet gluten obtained from vital wheat glutens (VGA and VGB) and wheat flour fortified with vital wheat gluten prepared with water or salt solution (2 g/100 mL NaCl) is presented in Figure 1 (A and B). Samples showed a wide linear viscoelastic region between 0.1–10%. An overview of the results shows that the wet gluten network formed with water presented higher  $G'$  values than the wet gluten network formed with salt. These results indicate that the gluten network of dough prepared with water was more resistant to flow than the gluten network of dough prepared with salt solution.

When vital wheat glutens were evaluated, both VGA W and VGB W (Fig. 1 A) presented greater  $G'$  values than VGA S and VGB S (Fig. 1 B); and VGA W showed the greatest  $G'$  value. For the wheat flours fortified with vital wheat glutens, flours fortified with VGA showed the highest  $G'$  values; on the other hand, the fortification levels used (5 and 7 g/100 g) were too low to discern differences between the wheat flours fortified in the fundamental rheological measurements.

These results agree with Schober et al. (2003) and Tuhumury et al. (2014), who evaluated gluten networks by fundamental rheological tests and verified that increased salt concentration can decrease  $G'$  values. The same findings were observed by Angioloni & Dalla Rosa (2005) and Lynch, Dal Bello, Sheehan, Cashman, & Arendt (2009) for doughs obtained from wheat flour with or without salt analyzed in fundamental and empirical rheological tests. They found greater  $G'$  values for dough prepared with water than for dough prepared with salt solution, but the resistance to extension, as evaluated by the empirical rheological test, was greater for dough prepared with salt solution than for dough prepared with water.



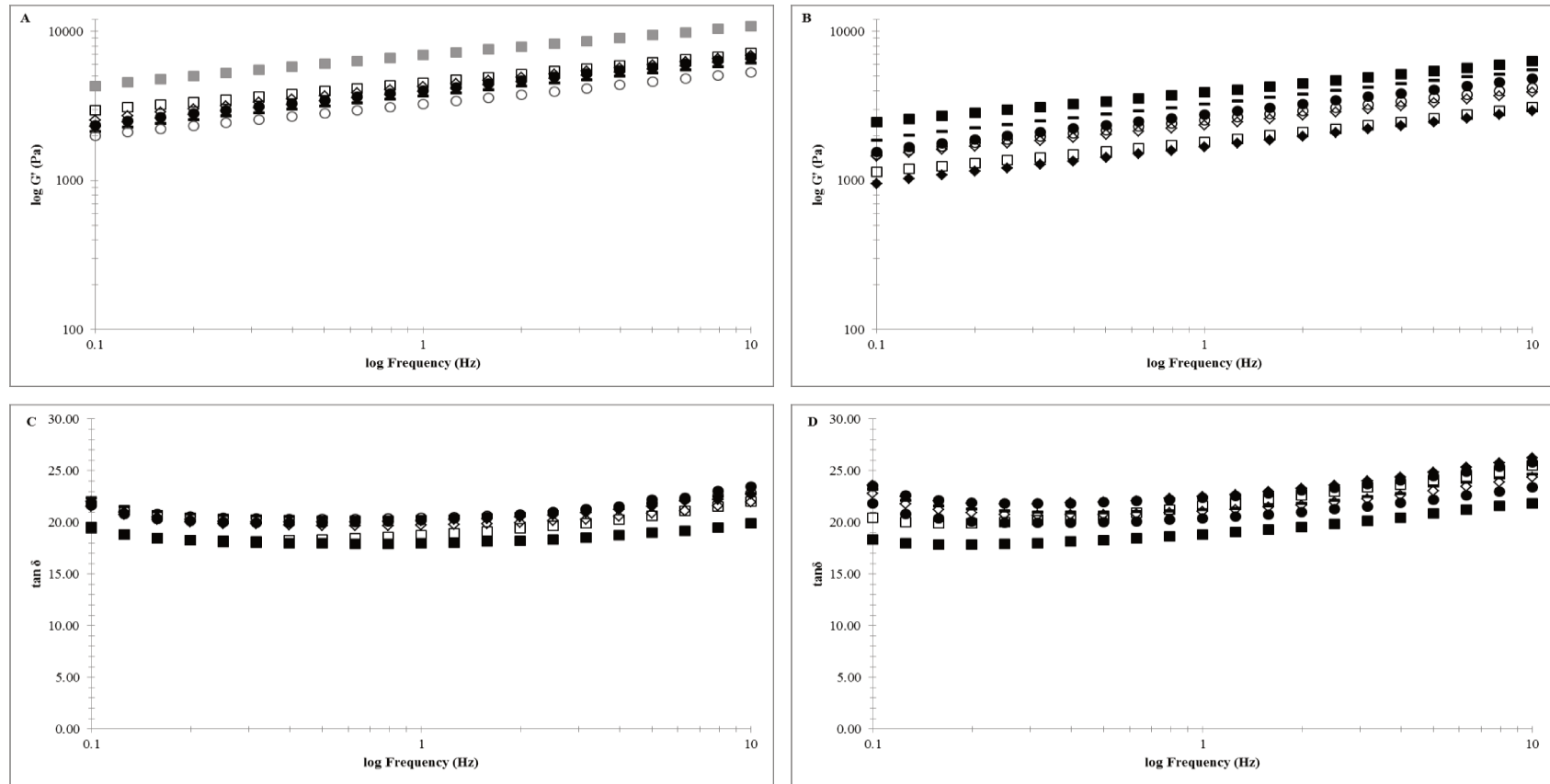
**Figure 1.** Strain sweep curve for storage moduli ( $G'$ ) of the vital wheat gluten and wheat flour fortified with vital wheat gluten. **A** = wet gluten prepared with water (W), where ■ = VGA W = vital wheat gluten A with water, □ = VGB W = vital wheat gluten B with water, ● = GWF W = control wheat flour with water, ● = G5A W = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGA with water, ○ = G7A W = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGA with water, ◆ = G5B W = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGB with water, ◇ = G7B W = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGB with water. **B** = wet gluten prepared with salt solution contained 2 g/100mL (w/v) of NaCl (S). Where ■ = VGA S = vital wheat gluten A with salt, □ = VGB S = vital wheat gluten B with salt, ● = GWF S = control wheat flour with salt, ● = G5A S = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGA with salt, ○ = G7A S = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGA with salt, ◆ = G5B S = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGB with salt, ◇ = G7B S = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGB with salt.

The presence of NaCl can decrease inter-protein hydrophobic interactions, as a result of the effect of salt on the structure of water (Lynch et al., 2009; Salvador, Sanz, & Fiszman, 2006). This decrease, which largely depends on the content and quality of the proteins present (Preston, 1989), reduces the tendency of the proteins to aggregate, reducing elasticity, and consequently decreasing  $G'$  values. Besides this, sodium chloride can reduce protein hydration because of its water-holding capacity (Beck, Jekle, & Becker, 2012).

The linear viscoelastic region of wheat flour dough may show a shorter linear region than the isolated gluten network, because the interactions among the wheat flour constituents (such as proteins and starch) can reduce the linear region (Uthayakumaran, Newberry, Phan-Thien, & Tanner, 2002), while in the gluten ball (rubbery gluten network) this region is larger when compared with wheat flour doughs (Létang, Piau, & Verdier, 1999). These findings were also observed by Dahesh, Banc, Duri, Morel, & Ramos (2016). These authors found an extremely large linear region for gluten gel, which reached more than 300% in strain sweep. In our work, we prepared the gluten network in a Glutomatic device, retaining only the insoluble proteins in the gluten ball. In our study, the gluten ball obtained from both vital wheat gluten and wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of VGA or VGB showed similar linear viscoelastic regions, as shown in Figure 1 (A and B). This may be explained by the increased protein concentration in wheat flour when vital gluten was used for fortification. The differences observed between VGA and VGB may be due their protein compositions, especially with regard to gliadins and glutenins. Gliadins confer viscosity properties to the gluten network (Khatkar, Barak, & Mudgil, 2013), while glutenins, especially high-molecular weight glutenin subunits (HMW-GS), are related to gluten elasticity (Delcour et al., 2012; Uthayakumaran, Tanner, Dai, Qi, & Wrigley, 2014). Therefore, an appropriate balance between gliadin and glutenin is necessary to ensure adequate viscoelastic properties in the gluten network.

### III.3.1.2. Frequency sweep

The frequency sweep provides information about changes in the viscoelastic properties of the polymer network at different observation times. The elastic modulus ( $G'$ ) and  $\tan \delta$  as measured by the frequency sweep for vital wheat glutens and wheat flour fortified with vital gluten obtained from the washings with water or with salt solution are shown in Figure 2 (A, B, C, and D).



**Figure 2.** Frequency sweep curve for storage moduli ( $G'$ ) – A and B – and  $\tan \delta$  – C and D of the vital wheat gluten and wheat flour fortified with vital wheat gluten. **A and C** = wet gluten prepared with water (W), where ■ = VGA W = vital wheat gluten A with water, □ = VGB W = vital wheat gluten B with water, ● = GWF W = control wheat flour with water, ● = G5A W = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGA with water, ○ = G7A W = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGA with water, ◆ = G5B W = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGB with water, ◇ = G7B W = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGB with water. **B** = wet gluten prepared with salt solution contained 2 g/100mL (w/v) of NaCl (S). Where ■ = VGA S = vital wheat gluten A with salt, □ = VGB S = vital wheat gluten B with salt, ● = GWF S = control wheat flour with salt, ● = G5A S = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGA with salt, ○ = G7A S = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGA with salt, ◆ = G5B S = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGB with salt, ◇ = G7B S = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGB with salt.

The curves obtained showed that  $G'$  was dependent of frequency for all samples analyzed. There was an increase in  $G'$  with increasing frequency, meaning a decreased mobility of the protein chains within the gluten network (Singh & Singh, 2013) for vital wheat glutes and wheat flour fortified with 5 or 7 g/100 g of VGA or VGB. The dependence of  $G'$  modulus was also observed by Tronsmo et al. (2003) and Wesolowska-Trojanowska et al. (2014), for dough and glutes. The results observed in the frequency sweep (Fig. 2 A and B) confirmed the results from the strain sweep, since the gluten network formed with water was more elastic than the network formed with salt solution, and also demonstrated that the gluten network of all samples exhibited a power-law dependence on frequency. Power law relaxation at gel point was observed by other authors for both chemical and physical gels (Ng & McKinley, 2008; Ng, McKinley, & Ewoldt, 2011; Tanner, Qi, & Dai, 2008; S. Uthayakumaran et al., 2014). Table 2 provides the values of the slopes as calculated from the frequency sweeps.

Comparing the curves obtained with water and salt solutions, we observed that VGA W (Fig. 2 A) showed the highest  $G'$  values throughout the observation period, while the lowest  $G'$  values were observed for VGB S and G5B S (Fig. 2 B). These results indicate that the deformations that occur in the gluten network from VGA and VGB with water (Fig. 2A) and salt solution (Fig. 2B) present the same trends. The values of the slopes (Table 2) showed that larger values of  $n$  were found for samples prepared with salt solution compared to values observed in samples prepared with water. When the gluten network has a higher  $n$  value, this indicates that the network has less resistance to deformation, because higher  $n$  values indicate a rapid decay of stress with decreasing frequency (Uthayakumaran et al., 2014). It was interesting to observe that GWF showed similar  $n$  values in either W or S systems (GWF W and GWF S, respectively), showing similar behavior in both cases, probably due to the fact that these samples were not supplemented with vital gluten.

Differences between the samples occurred because of structural changes promoted by interactions between gliadin and glutenin, were influenced by the presence or absence of salt, and depend on the degree of hydration of the proteins of the gluten network (Shewry et al., 2001). Noncovalent interactions are formed by interactions occurring through hydrophobic interactions or  $\beta$ -sheets aggregating by electrostatic interactions and hydrogen bonds (Schiedt, Baumann, Conde-Petit, & Vilgis, 2013), which aid in stabilizing the gluten network. All these types of bonds may produce different behaviors after deformation, which may lead to stronger or weaker interactions between components, and this may be related to the inherent

differences in protein content (gliadins and glutenins) of a particular flour (Tuhumury et al., 2014).

**Table 2.** Power law parameters of gluten networks obtained from wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of vital wheat gluten A (VGA) or vital wheat gluten B (VGB) prepared using water (W) or salt solution (S)

|       | $G'_0$             | $n$            | $R^2$          |
|-------|--------------------|----------------|----------------|
| VGA W | 6909.1 ± 156.3 a   | 0.20 ± 0.00 ab | 0.99 ± 0.00 ns |
| VGB W | 4551.8 ± 153.7 b   | 0.19 ± 0.01 b  | 0.99 ± 0.05 ns |
| GWF W | 3671.8 ± 140.3 e   | 0.22 ± 0.01 a  | 0.99 ± 0.00 ns |
| G5A W | 4020.6 ± 265.5 cde | 0.23 ± 0.01 a  | 0.99 ± 0.00 ns |
| G7A W | 3266.7 ± 45.3 f    | 0.21 ± 0.01 ab | 0.99 ± 0.00 ns |
| G5B W | 3936.3 ± 59.1 d    | 0.22 ± 0.01 a  | 0.99 ± 0.02 ns |
| G7B W | 4241.8 ± 101.4 c   | 0.21 ± 0.00 a  | 0.99 ± 0.00 ns |
| VGA S | 3919.4 ± 203.3 a   | 0.20 ± 0.00 c  | 0.99 ± 0.00 ns |
| VGB S | 1839.1 ± 118.0 e   | 0.22 ± 0.00 b  | 0.99 ± 0.01 ns |
| GWF S | 3246.6 ± 15.2 b    | 0.23 ± 0.00 a  | 0.99 ± 0.01 ns |
| G5A S | 2769.0 ± 141.0 c   | 0.24 ± 0.01 a  | 0.99 ± 0.00 ns |
| G7A S | 2527.5 ± 222.3 cd  | 0.22 ± 0.00 b  | 0.99 ± 0.00 ns |
| G5B S | 1678.9 ± 96.7 e    | 0.24 ± 0.00 a  | 0.99 ± 0.03 ns |
| G7B S | 2366.7 ± 37.6 d    | 0.21 ± 0.01 bc | 0.99 ± 0.00 ns |

$G'_0$  = intercept of the power law model for frequency sweep;  $n$  = corresponding slope;  $R^2$  = regression coefficient; VGA W = vital wheat gluten A with water; VGB W = vital wheat gluten B with water; GWF W = control wheat flour with water; G5A W = wheat flour fortified with 5 g/100 g of vital wheat gluten A with water; G7A W = wheat flour fortified with 7 g/100 g of vital wheat gluten A with water; G5B W = wheat flour fortified with 5 g/100 g of vital wheat gluten B with water; G7B W = wheat flour fortified with 7 g/100 g of vital wheat gluten B with water; VGA S = vital wheat gluten A with salt; VGB S = vital wheat gluten B with salt; GWF S = control wheat flour with salt; G5A S = wheat flour fortified with 5 g/100 g of vital wheat gluten A with salt; G7A S = wheat flour fortified with 7 g/100 g of vital wheat gluten A with salt; G5B S = wheat flour fortified with 5 g/100 g of vital wheat gluten B with salt; G7B S = wheat flour fortified with 7 g/100 g of vital wheat gluten B with salt. Means are followed by standard deviation. Different letter in the column represents significant differences among means; ns = no significant.

For  $\tan \delta$  as measured by the frequency sweep for vital wheat glutens and wheat flour fortified with vital gluten obtained from the washings with water (Fig. 2C) or with salt solution (Fig. 2D), the results were similar among the samples. With regards to the relationship between elastic and viscous behaviors, there was essentially no change upon the addition of salt. That is, both samples increased at the same rate and all samples formed a relatively strong gel with virtually independent frequency moduli.

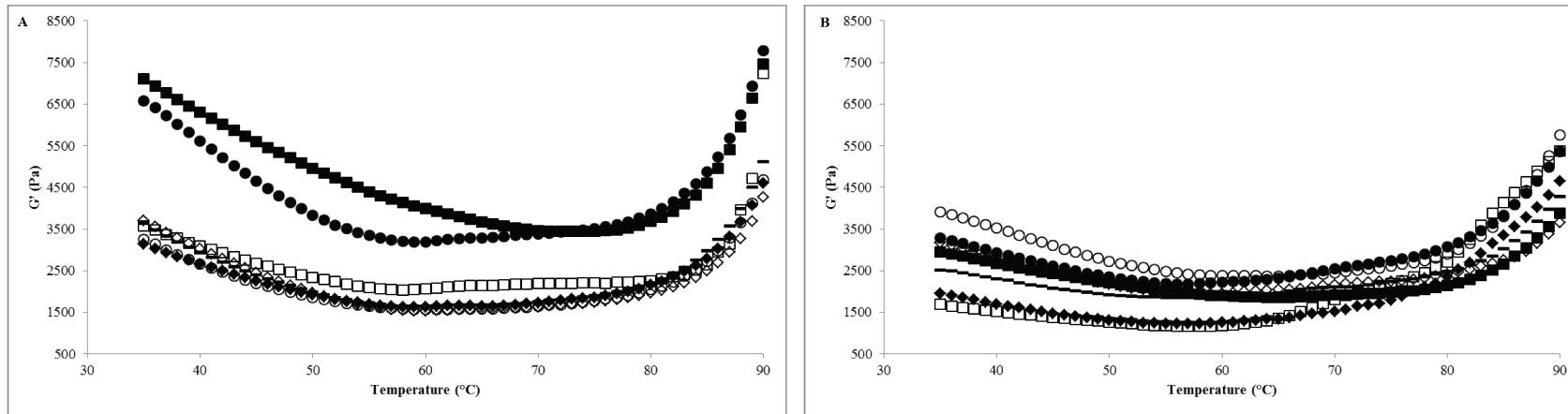
### III.3.1.3. Temperature sweep

Temperature sweep is used to evaluate thermo-mechanical structural modifications and determine the temperature at which gluten protein network changes occur. The storage modulus ( $G'$ ) curves from the temperature sweep obtained for VGA and VGB and wheat flour fortified with 5 or 7 g/100 g of VGA or VGB mixed with water or salt solution (2 g/100 g NaCl) are shown in Figure 3 (A and B).

It was observed (Fig. 3 A and B) that below 60°C,  $G'$  gradually decreased as temperature increased for all samples, indicating dough softening (Angioloni & Dalla Rosa, 2005). Thereafter, we observed changes in  $G'$  around 60°C and 80°C. Above 80°C, all samples showed more pronounced protein structural changes, promoting a greater increase in  $G'$ . The results also indicated that VGA showed higher elastic behavior than VGB with increasing temperature in samples prepared with either water or with salt. For samples prepared with salt (Fig. 3B), the transition temperature range of the structural modifications of gluten proteins appeared to be shifted to higher values than the samples with water (Fig. 3A).

The rheological behaviors of VGA (S or W) and VGB (S or W), even when they were applied on the wheat flour, were similar since the structural transition observed during heating that changes  $G'$  occurs in two stages. At first, there was a  $G'$  decrease that extended over a wide temperature range (between 35–60°C), indicating the increase of the viscous portion mobility with the consequent breakdown of the elastic portion while these temperatures were applied. In the second step, there was a more pronounced change at temperatures above 80°C. These results are in agreement with the denaturation temperature of gluten proteins as evaluated by thermograms obtained from DSC (Leon, Rosell, & Benedito de Barber, 2003). These authors observed that denaturation occurs at two different temperatures; gliadins denature around 58°C and glutenins around 80°C.

During heating, the native protein structure is destabilized and unfolding occurs (Rosell, Collar, & Haros, 2007). In general, ionic and hydrogen interactions are destroyed during heating, leading to the denaturation of protein molecules. Therefore, this unfolding may facilitate sulfhydryl–disulfide interchange reactions and oxidation together with hydrophobic interactions (Li & Lee, 1998), leading to the association of proteins and the consequent formation of large protein aggregates (Schofield, Bottomley, Timms, & Booth, 1983).



**Figure 3.** Temperature sweep curve for storage moduli ( $G'$ ) of the vital wheat gluten and wheat flour fortified with vital wheat gluten. **A** = wet gluten prepared with water (W), where ■ = VGA W = vital wheat gluten A with water, □ = VGB W = vital wheat gluten B with water, — = GWF W = control wheat flour with water, ● = G5A W = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGA with water, ○ = G7A W = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGA with water, ◆ = G5B W = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGB with water, ◇ = G7B W = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGB with water. **B** = wet gluten prepared with salt solution contained 2 g/100mL (w/v) of NaCl (S). Where ■ = VGA S = vital wheat gluten A with salt, □ = VGB S = vital wheat gluten B with salt, — = GWF S = control wheat flour with salt, ● = G5A S = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGA with salt, ○ = G7A S = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGA with salt, ◆ = G5B S = wheat flour fortified with 5 g/100g of VGB with salt, ◇ = G7B S = wheat flour fortified with 7 g/100g of VGB with salt.

The decrease in  $G'$  observed with increasing temperatures (from 25–60°C) observed for the samples (Fig. 3A and B) can be explained a reduction in ionic and hydrogen interactions, resulting in reduced elastic behavior of gluten (Wang et al., 2017). On the other hand, when temperatures higher than 80°C were reached,  $G'$  increased for all samples (Fig. 3A and B). Increasing the temperature from 60–90°C exposed some functional groups, such as SH and hydrophobic groups, which interacted with each other and promoted the network formation, increasing  $G'$  (Wang et al., 2017).

The increase in  $G'$  observed upon increasing the temperature from 60–80°C (Figure 3 A and B) was caused by temperature-induced changes on the structure of proteins and starch granules. This result was also observed by Moreira, Chenlo, & Torres (2013), who found  $G'$  values increase during starch gelatinization using temperature sweep. According to Dreese, Faubion, & Hosene, (1988), starch content present in the gluten-starch dough has a small effect on  $G'$  below 55°C, however, the magnitude of change in  $G'$  is proportional to the amount of starch present in the dough above 55°C, and this is mostly due to starch gelatinization. Starch gelatinization is a stage in the baking process where starch granules swell and absorb water, increasing the viscosity (pasting) of the dough. Gelatinization may increase hydrogen bonding between gluten proteins and starch molecules (Attenburrow, Barnes, Davies, & Ingman, 1990; Chen, Deng, Wu, Tian, & Xie, 2010; Dreese et al., 1988; Mirsaeedghazi, Emam-Djomeh, & Mousavi, 2008).

### III.3.2. Empirical rheological measurements

In the extensograph test, the doughs obtained were evaluated by the fortification of wheat flour with levels of 5 or 7 g/100 g of VGA or VGB in the absence or presence of 2 g/100 mL NaCl, as shown in Table 3.

When observing the characteristics of doughs prepared with water, the values obtained in this analysis were lower than values of doughs prepared with salt solution. These results are consistent with extensograph results obtained by Lynch et al. (2009) and Ignácio et al. (2013). Overall, the addition of 7 g/100 g VGA showed the highest values for  $R_{max}$ , A, and R/E. These results indicate the difference that exists between the protein qualities of VGA and VGB. For doughs prepared with salt solution, the greatest resistance (R) values were achieved in D5A S, D7A S, and D7B S, and maximum resistance ( $R_{max}$ ) with 7 g/100 g of VGA or VGB (D7A S and D7B S), with an increase of 67% and 48%, respectively, when compared with DWF S. These results show that the doughs prepared with vital wheat gluten have a high

resistance to extension, indicating that they require greater forces to stretch. However, the extensibility (E) showed no significant differences among the samples. The area under curve or work input (A) was higher for all doughs prepared with fortified wheat flour compared with the dough prepared with CWF, as occurred for the resistance/extensibility ratio (R/E), with higher values when 7 g/100 g of VGA and 7 g/100 g of VGB were used for wheat flour fortification. This indicates that the strength of the dough was significantly improved upon the addition of vital gluten (5 or 7 g/100 g), however this effect was more pronounced when salt was used.

**Table 3.** Extensograph parameters (at 135 min) of doughs obtained from wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of vital wheat gluten A (VGA) or B (VGB) from different origins using water or salt solution (2 g/100 mL NaCl)

|                                             | DWF           | D5A            | D7A           | D5B           | D7B            |
|---------------------------------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>Water (W)</b>                            |               |                |               |               |                |
| Resistance – R (BU)                         | 452 ± 17 c    | 475 ± 8 bc     | 548 ± 22 a    | 510 ± 16 ab   | 442 ± 29 c     |
| Maximum resistance – R <sub>max</sub> (BU)  | 500 ± 10 c    | 602 ± 6 b      | 728 ± 18 a    | 639 ± 19 b    | 532 ± 39 c     |
| Extensibility – E (mm)                      | 110 ± 6 b     | 134 ± 5 a      | 135 ± 2 a     | 131 ± 3 a     | 128 ± 6 a      |
| Area under the curve – A (cm <sup>2</sup> ) | 75 ± 4 d      | 107 ± 4 bc     | 124 ± 7 a     | 109 ± 3 ab    | 92 ± 9 c       |
| Resistance/Extensibility ratio – R/E        | 2.94 ± 0.11 d | 3.37 ± 0.06 bc | 3.93 ± 0.16 a | 3.43 ± 0.10 b | 3.05 ± 0.19 cd |
| <b>Salt solution (S)</b>                    |               |                |               |               |                |
| Resistance – R (BU)                         | 543 ± 18 d    | 828 ± 38 bc    | 887 ± 35 ab   | 793 ± 29 c    | 936 ± 44 a     |
| Maximum resistance – R <sub>max</sub> (BU)  | 755 ± 36 c    | 1141 ± 18 b    | 1261 ± 21 a   | 1121 ± 37 b   | 1330 ± 24 a    |
| Extensibility – E (mm)                      | 153 ± 7 ns    | 141 ± 5 ns     | 139 ± 6 ns    | 148 ± 8 ns    | 153 ± 8 ns     |
| Area under the curve – A (cm <sup>2</sup> ) | 151 ± 15 b    | 205 ± 10 a     | 210 ± 16 a    | 210 ± 10 a    | 232 ± 8 a      |
| Resistance/Extensibility ratio – R/E        | 3.53 ± 0.06 c | 5.87 ± 0.15 ab | 6.40 ± 0.17 a | 5.33 ± 0.41 b | 6.47 ± 0.31 a  |

DWF = dough from control wheat flour; D5A = dough from wheat flour + 5 g/100 g of vital wheat gluten A; D7A = dough from wheat flour + 7 g/100 g of vital wheat gluten A; D5B = dough from wheat flour + 5 g/100 g of vital wheat gluten B; D7B = dough from wheat flour + 7 g/100 g of vital wheat gluten B. Different letters in the lines indicate significant differences between means by Tukey's test ( $P < 0.05$ ); ns = not significant. BU: Brabender units.

The empirical rheological test revealed that salt (NaCl) affects dough properties; salt toughens the proteins and helps condition the dough by improving its tolerance to mixing and increasing dough stability (McCann & Day, 2013). According to Belton (1999), when greater deformation energy is applied, the regions of loops and trains may be deformed, allowing a greater interaction between the protein chains. Dough preparation with salt (2 g/100 mL NaCl) increased resistance to extension, even when promoting lower  $G'$  in the fundamental

rheological analysis (Fig. 1 B and 2 B). That is, the gluten network when submitted to normal force was stronger, but was less elastic when subjected to shear force (fundamental rheological tests). When salt was used to prepare the doughs for the extensographic analysis, repulsion between charged protein chains was reduced, favoring hydrophobic interactions between them (Beck et al., 2012), forming train regions (protein-protein interactions), strengthening the gluten network as a result of a closer molecular alignment (Abang Zaidel et al., 2008; Tuhumury et al., 2014), and reducing the number of loops in the gluten network (Belton, 1999; Delcour et al., 2012; MacRitchie, 2014; Shewry et al., 2001). These differences observed in fundamental and empirical rheological behaviors between small and large deformation tests might be related to sample preparation or to the different deformation forces/rates used in the measurements (Lynch et al., 2009). Besides that, salt in the dough may affect other constituents of flour such as starch during dough development, but the effect of salt on starch is not well-understood (Lynch et al., 2009; Salvador et al., 2006).

We can compare our results with those of Ng & McKinley (2008) who observed that gluten showed different behavior in shear and extensional trials. They found changes in the power-law growth within the linear viscoelastic region when shear and uniaxial extension forces were applied. These authors claim that gluten structure remains intact even under large deformations because of the tensile strength of the network formed, reinforcing the importance of intermolecular bonds between the protein chains. In our work, we also observed that the salt plus tensile forces increased dough resistance in the empirical rheological test. This is due to the effects of salt on proteins, which, at high strain rates, allowed approximating gliadin and glutenin chains by reducing the electrostatic forces between them (Schober et al., 2003).

Structural changes can be observed in the empirical test because the doughs were prepared in the Brabender Farinograph-E, before the extension test in the extensograph, imitating dough mixing and resting/proofing steps during bread making. Thus, the results obtained from the Extensograph-E may correlate better with the bread-making process (Abang Zaidel et al., 2008). Adding vital wheat gluten improved dough quality by increasing the content of proteins that are able to form the gluten network, strengthening the dough structure (Weegels, Verhoek, Groot, & Hamer, 1994).

### III.4. Conclusions

In the fundamental rheological tests, we observed that the use of salt solution (2 g/100 mL NaCl) to form the gluten ball from reconstituted vital wheat gluten or fortified wheat flour reduced the elastic modulus, when compared to gluten balls prepared with water. On the other hand, the viscoelastic properties of wheat flour fortified with vital gluten measured by the empirical rheological test in the extensograph were opposite to the results obtained in the fundamental tests, and the doughs produced with the salt solution presented higher resistance to extension than the doughs prepared with water. In a real baking system, this is important because the dough can expand during fermentation and baking, maintaining sufficient resilience to prevent rupture and collapse of the growing gas bubbles and increasing bread volume. The differences between fundamental and empirical rheological tests might be related to different sample preparations (in the first, samples were prepared in the Glutomatic, and in the second, in the farinograph) and/or to the different deformation forces/rates used in the measurements. Differences between samples might be related to protein composition of the different vital wheat glutes. Our results confirmed that even though there were differences between the two vital wheat glutes, especially in the fundamental rheological tests, both may improve the viscoelastic properties of doughs and can be used for bread preparation to improve final product quality.

### Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grants numbers 163129/2013-4 and 118348/2014-0). The authors would like to thank Sul Mineiro Mill for wheat flour donation; and Labonathus and Granotec for donating vital wheat gluten.

### References

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International, 2010. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method. AACCI International, St. Paul, MN, USA.
- Abang Zaidel, D. N., Chin, N. L., Abdul Rahman, R., & Karim, R. (2008). Rheological characterisation of gluten from extensibility measurement. *Journal of Food Engineering*, 86, 549–556.
- Angioloni, A., & Dalla Rosa, M. (2005). Dough thermo-mechanical properties: Influence of sodium chloride, mixing time and equipment. *Journal of Cereal*

- Science*, 41, 327–331. Attenburrow, G., Barnes, D. J., Davies, a. P., & Ingman, S. J. (1990). Rheological properties of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 12, 1–14.
- Beck, M., Jekle, M., & Becker, T. (2012). Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast-leavened products. I. Rheological attributes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, Belton, P. S. (1999). On the Elasticity of Wheat Gluten. *Journal of Cereal Science*, 29, 103–107.
- Chen, J. sheng, Deng, Z. ying, Wu, P., Tian, J. chun, & Xie, Q. gang. (2010). Effect of Gluten on Pasting Properties of Wheat Starch. *Agricultural Sciences in China*, 9, 1836–1844.
- Czuchajowska, Z., & Paszczynska, B. (1996). Is Wet Gluten Good for Baking ? *Cereal Chemistry*, 73, 483–489.
- Dahesh, M., Banc, A., Duri, A., Morel, M. H., & Ramos, L. (2016). Spontaneous gelation of wheat gluten proteins in a food grade solvent. *Food Hydrocolloids*, 52, 1–10. Delcour, J. a, Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 469–92. Dreese, P., Faubion, J., & Hosney, R. C. (1988). Dynamic rheological properties of flour, gluten, and gluten-starch doughs. I. Temperature-dependent changes durign heating. *Cereal Chemistry*, 65, 348–353.
- Esteller, M. S., Pitombo, R. N. M., & Lannes, S. C. S. (2005). Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. *Journal of Cereal Science*, 41, 19–21.
- Ignácio, A. K. F., Rodrigues, J. T. D., Niizu, P. Y., Chang, Y. K., Estadual, U., & Steel, C. J. (2013). Efeito da substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio em pão francês Effect of the substitution of sodium chloride by potassium chloride in French rolls. *Brazilian Journal of Food Technology*, 1, 1–11.
- Khatkar, B. S., Barak, S., & Mudgil, D. (2013). Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 38–41.
- Leon, A., Rosell, C. M., & Benedito de Barber, C. (2003). A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. *European Food Research and Technology*, 217, 13–16. Létang, C., Piau, M., & Verdier, C. (1999). Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41, 121–132. Li, M., & Lee, T.-C. (1998). Effect of cysteine on the functional properties and microstructures of wheat flour extrudates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 846–853.
- Lynch, E. J., Dal Bello, F., Sheehan, E. M., Cashman, K. D., & Arendt, E. K. (2009).

- Fundamental studies on the reduction of salt on dough and bread characteristics. *Food Research International*, 42, 885–891.
- MacRitchie, F. (2014). Requirements for a test to evaluate bread-making performance. *Journal of Cereal Science*, 59, 1–2.
- McCann, T. H., & Day, L. (2013). Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 57, 444–452.
- Miller, K. a., & Hosene, R. C. (1999). Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. *Cereal Chemistry*, 76, 105–109.
- Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. A. (2008). Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 112–119.
- Moreira, R., Chenlo, F., & Torres, M. D. (2013). Rheology of Gluten-Free Doughs from Blends of Chestnut and Rice Flours. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1476–1485.
- Ng, T. S. K., & McKinley, G. H. (2008). Power law gels at finite strains: The nonlinear rheology of gluten gels. *Journal of Rheology*, 52, 417–449.
- Ng, T. S. K., McKinley, G. H., & Ewoldt, R. H. (2011). Large amplitude oscillatory shear flow of gluten dough: A model power-law gel. *Journal of Rheology*, 55, 627.
- Preston, K. R. (1989). Effects of neutral salts of the lyotropic series on the physical dough properties of a Canadian Red Spring Wheat flour. *Cereal Chemistry*, 66, 144–148.
- Rosell, C. M., Collar, C., & Haros, M. (2007). Assessment of hydrocolloid effects on the thermo-mechanical properties of wheat using the Mixolab. *Food Hydrocolloids*, 21, 452–462.
- Salvador, A., Sanz, T., & Fiszman, S. M. (2006). Dynamic rheological characteristics of wheat flour-water doughs. Effect of adding NaCl, sucrose and yeast. *Food Hydrocolloids*, 20, 780–786.
- Schiedt, B., Baumann, A., Conde-Petit, B., & Vilgis, T. a. (2013). Short- and Long-Range Interactions Governing the Viscoelastic Properties during Wheat Dough and Model Dough Development. *Journal of Texture Studies*, 44, 317–332.
- Schober, T. J., Dockery, P., & Arendt, E. K. (2003). Model studies for wheat sourdough systems using gluten, lactate buffer and sodium chloride. *European Food Research and Technology*, 217, 235–243.
- Schofield, J. D., Bottomley, R. C., Timms, M. F., & Booth, M. R. (1983). The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions.

- Journal of Cereal Science*, 1, 241–253.
- Shewry, P. R., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P., & Lellis, S. C. De. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity : findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 433–441.
- Singh, S., & Singh, N. (2013). Relationship of polymeric proteins and empirical dough rheology with dynamic rheology of dough and gluten from different wheat varieties. *Food Hydrocolloids*, 33, 342–348.
- Song, Y., & Zheng, Q. (2007). Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 132–138.
- Stathopoulos, C. E., Tsiami, A. a., David Schofield, J., & Dobraszczyk, B. J. (2008). Effect of heat on rheology, surface hydrophobicity and molecular weight distribution of glens extracted from flours with different bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 47, 134–143.
- Tanner, R. I., Qi, F., & Dai, S. C. (2008). Bread dough rheology and recoil. I. Rheology. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 148, 33–40.
- Tronsmo, K. M., Magnus, E. M., Færgestad, E. M., & Schofield, J. D. (2003). Relationships between gluten rheological properties and hearth loaf characteristics. *Cereal Chemistry*, 80, 575–586.
- Tuhumury, H. C. D., Small, D. M., & Day, L. (2014). The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. *Journal of Cereal Science*, 60, 229–237.
- Uthayakumaran, S., Newberry, M., Phan-Thien, N., & Tanner, R. (2002). Small and large strain rheology of wheat gluten. *Rheologica Acta*, 41, 162–172. Uthayakumaran, S., Tanner, R. I., Dai, S.-C., Qi, F., & Wrigley, C. W. (2014). Relationships between traditional and fundamental dough-testing methods. *Cereal Research Communications*, 42, 282–292.
- Wadhawan, C. K., & Bushuk, W. (1989). Studies on vitality of commercial gluten. I. Physical, chemical and technological characteristics. *Cereal Chemistry*, 66, 456–461.
- Wang, K.-Q., Luo, S.-Z., Zhong, X.-Y., Cai, J., Jiang, S.-T., & Zheng, Z. (2017). Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation. *Food Chemistry*, 214, 393–399.
- Wang, P., Jin, Z., & Xu, X. (2015). Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 189–198.

- Weegels, P. L., Verhoek, J. A., Groot, A. M. G., & Hamer, R. J. (1994). Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. *Journal of Cereal Science*, 19, 31–38.
- Wellner, N., Bianchini, D., Mills, E. N. C., & Belton, P. S. (2003). Selected Hofmeister anions on the secondary structure and dynamics of wheat prolamins in gluten. *Cereal Chemistry*, 80, 596–600.
- Wellner, N., Mills, E. N. C., Brownsey, G., Wilson, R. H., Brown, N., Freeman, J., & Belton, P. S. (2005). Changes in Protein Secondary Structure during Gluten Deformation Studied by Dynamic Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6, 255–261.
- Wesolowska-Trojanowska, M., Tomczynska-Mleko, M., Mazurkiewicz, J., Kwiatkowski, C., Kowalczyk, K., Solowiej, B., & Mleko, S. (2014). Rheological properties of gluten obtained from Polish wheat cultivars. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20, 1221–1226.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115–9. Xu, J., Bietz, J. a., & Carriere, C. J. (2007). Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chemistry*, 101, 1025–1030.

#### ARTIGO IV.

---

### **Technological characteristics of vital wheat gluten from different origins used for bread making**

Ortolan, Fernanda; Corrêa, Gabriela Paiva; Steel, Caroline Joy

*This manuscript was submitted to:  
Food Research International on March 2<sup>nd</sup>, 2017*

## **IV. Technological characteristics of vital wheat gluten from different origins used for bread making**

Ortolan, Fernanda; Corrêa, Gabriela Paiva; Steel, Caroline Joy

### **Abstract**

Vital wheat gluten is used to improve the rheological characteristics of wheat flour considered inadequate for bread making. The quality of this product is associated with its proteins, gliadins and glutenins, which are responsible for its viscoelastic properties, but is marketed with little information on its proteins quality. Thus, the aim of this study was to evaluate the technological characteristics of two different vital wheat glutens (A and B), through rheological analyses and baking test by wheat flour fortification with 5 and 7 g/100 g of vital wheat gluten A or B. It was observed the contribution of vital wheat gluten added to control wheat flour on dough viscoelastic quality and also on physical quality of bread, especially, decreasing crumb firmness. The increase of specific volume was also observed, when 7 g/100 g of vital gluten A was added on wheat flour, and this vital gluten was technologically better than vital gluten B. This fact reinforces that there are differences in the quality of vital wheat glutens commercialized, and it points out the needed of better information about the protein quality of this product to better determine the level that will be used in the baking industry.

**Keywords:** gluten network, dough viscoelastic properties, empirical rheological tests, bread quality

### **IV.1. Introduction**

Vital wheat gluten is commercialized as an ingredient that can be added to wheat flour with poor quality for bread making (Esteller, Pitombo, & Lannes, 2005), or still to produce bread rich in fiber. Usually, the gluten marketed is classified just by its appearance (color and particle size) and its moisture, protein, ash and lipid contents, beside its microbiological characteristics. However, it is expected that the gluten quality interferes directly on dough quality (Marchetti, Cardós, Campaña, & Ferrero, 2012), and the technological characteristics can vary widely between the vital wheat glutens available. Although the vital wheat gluten added to wheat flour improves dough and bread quality, it does not always retain the

technological properties of the original wheat flour from which it was obtained (Miller & Hoseney, 1999). Thus, the determination of vital gluten technological quality can improve its specification to reach better performance in bread making, when it is used to fortify wheat flours.

Some authors define gluten as a protein network formed by covalent and non-covalent interactions between gliadins and glutenins (Barak, Mudgil, & Khatkar, 2013; Shewry & Tatham, 1997; Herbert Wieser, 2007; Xu, Bietz, & Carriere, 2007; Zhou et al., 2014). Gluten development occurs when wheat flour is mixed with water associated with mechanical work giving a cohesive dough with viscoelastic properties (Goesaert et al., 2005; Hoseney, Finney, & Pomeranz, 1970; MacRitchie, 2014). The viscoelastic properties of gluten are related to its protein quantity and quality. These properties influence bakery product quality like texture, shape and expansion (Delcour et al., 2012) evaluated by volume. Because of their structure, gliadins, on hydration, behave as a viscous liquid, that provides dough extensibility (Khatkar, Barak, & Mudgil, 2013), decreasing the higher elasticity level conferred by glutenins (Zhou et al., 2014). Thus, the appropriate balance between gliadins and glutenins is determinant on gluten rheological quality (Melnik, Dreisoerner, Marcone, & Seetharaman, 2012).

Several tests have been used to determine vital wheat gluten quality, including protein content, water absorption, gluten extensibility when it is hydrated, and the mixing properties of the dough obtained from wheat flour fortified with vital gluten. To evaluate the differences in functionality showed by different glutes, flour quality parameters are usually used, such as farinograph parameters and bread volume (Dua, Lukow, Humphreys, & Adams, 2009). Some studies (Czuchajowska & Paszczynska, 1996; Marchetti et al., 2012; Song & Zheng, 2007) have demonstrated the utilization of the alveograph, farinograph and extensograph to verify the quality of vital wheat gluten obtained from different methods. Furthermore, the thermomechanical properties in the Mixolab™ have been used to evaluate the rheological characteristics of flours, when submitted to different conditions of mixing and temperature (Codina, Mironeasa, Bordei, & Leahu, 2010; Dhaka, Gulia, & Khatkar, 2012; Huang et al., 2010). The Mixolab™ is based on principles of the farinograph and of the thermal analysis of starch through the Rapid Visco Analyser (RVA) (Dhaka et al., 2012). The physical tests of the dough formed by the addition of vital gluten to wheat flour are used to evaluate the baking potential; that is, gluten strength and performance under mechanical conditions.

The analysis of the dough technological characteristics also plays an important role in quality control (Barak et al., 2013; Barak, Mudgil, & Khatkar, 2014; Delcour et al., 2012;

Dhaka et al., 2012; Goesaert et al., 2005; Hoseney et al., 1970) of mill and baking industries, and assists in defining the ingredients to be used in the manufacture of several bakery products. Added to these analyses, the ability of vital wheat gluten to improve the baking performance when a poor quality flour is used for baking is usually evaluated by loaf volume and crumb structure (Wadhawan & Bushuk, 1989).

The baking industry requires more information on the technological parameters of vital wheat gluten that is used in the manufacture of different products, to select the type and the appropriate level of vital gluten addition to its flours (Esteller et al., 2005). Due to market requirements, techniques that allow a quick conclusion about vital wheat gluten quality should be used and are necessary to ensure the quality standards of the final products. Thus, the aim of this study was to characterize commercial vital wheat glutens from different origins through empirical rheological analyses and prepare pan bread from wheat flour fortified with vital gluten, at levels of 5 and 7 g/100 g, evaluating bread during its shelf life, to check the quality of different commercial vital wheat glutens and to assist in defining their specifications.

## **IV.2. Material e Methods**

### **IV.2.1. Material**

Two commercial vital wheat glutens were used in this study, and both were from different origins and were named vital gluten A (VGA) and vital gluten B (VGB). Wheat flour was used as control (CWF) and to prepare blends with different levels (5 and 7 g/100 g) of VGA and VGB. Such fortification levels were selected after conducting pre-tests with different levels (data not shown). The fortified flours were named 5 g/100 g VGA (CWF + 5 g/100 g vital gluten A), 7 g/100 g VGA (CWF + 7 g/100 g vital gluten A), 5 g/100 g VGB (CWF + 5 g/100 g vital gluten B) and 7 g/100 g VGB (CWF + 7 g/100 g vital gluten B). The other ingredients used in the baking test (instant baker's yeast, sodium chloride, sucrose, hydrogenated vegetable fat, and calcium propionate) were obtained in the local market.

### **IV.2.2. Methods**

#### **IV.2.2.1. Chemical composition**

The chemical composition of the control wheat flour and the flours fortified with vital wheat gluten was evaluated through the methodologies described by AACCI (2010): moisture

content (method 44-15.02), ash content (method 08-01.01), protein content (method 46-13.01), using 5.7 as correction factor, lipid content (method 02-01.02), and carbohydrates by difference [100-(ash + protein + lipids)].

#### IV.2.2.2 Empirical rheological tests

The control wheat flour (CWF) and the fortified wheat flours (5 and 7 g/100 g of VGA or VGB) were evaluated for their gluten contents and gluten index,  $\alpha$ -amylase activity, farinograph and alveograph parameters, thermomechanical properties and baking test.

##### IV.2.2.2.1. Gluten contents and gluten index

The gluten contents and gluten index were determined in a Glutomatic equipment (Perten, Hägersten, Switzerland), by AACCI method 38-12.02 (2010).

##### IV.2.2.2.2. $\alpha$ -amylase activity

The  $\alpha$ -amylase activity was determined indirectly in a Falling Number 1800 (Perten, Hägersten, Switzerland), by AACCI method 56-81.03 (2010).

##### IV.2.2.2.3. Farinograph parameters

The water absorption (ABS), stability (STA) and other dough characteristics were evaluated in a Farinograph-E (Brabender, Duisburg, Germany), by AACCI method 54-21.02 (2010).

##### IV.2.2.2.4 Alveograph parameters

The analysis of the elasticity (P), extensibility (L) and gluten strength (W) was carried out in an Alveograph (Chopin, Villeneuve-la-Garenne, France), by biaxial expansion of the dough produced, according to AACCI method 54-30.02 (2010).

##### IV.2.2.2.5 Thermomechanical properties

The thermomechanical properties were evaluated using a Mixolab™ (Chopin, Villeneuve-la-Garenne, France), according to AACCI method 54-60.01 (2010), using the Chopin+ protocol. The parameters obtained from the curve were: water absorption (%); dough development time (DDT, min) or the time to reach the maximum torque (C1) at 30 °C. At that point, the dough is able to resist deformation for a certain time, which determines

dough stability (STA, min) (1st stage). The simultaneous mechanical shear stress and temperature constraint (2nd stage) decrease the torque, until a minimum value (C2) that could be related to the beginning of the protein structure destabilization or protein weakening. As the temperature increases, starch gelatinization takes place (3rd stage), with a concomitant increase in the torque until a new maximum value (C3). A reduction in viscosity is observed in the 4th stage, derived from the physical breakdown of the starch granules, leading to a minimum value of the torque (C4). The decrease in the temperature produces an enhancement in dough consistency (5th stage), resulting in a maximum torque (C5).

#### IV.2.2.3. Baking test

For the baking test, pan breads were prepared, as a type of bread that needs wheat flour with good gluten quality, in terms of balance between strength, and its elasticity and extensibility characteristics. In addition, these breads are classified into the category of "packaged breads" and must have their quality assessed during the shelf life.

The breads were prepared based on the formulation used by Schmiele, Jaekel, Patricio, Steel, & Chang (2012), with modifications: control wheat flour or wheat flour fortified with vital gluten (100 %); water (based on the water absorption in the farinograph); instant baker's yeast (1.3 %); sodium chloride (1.5 %); sucrose (4 %); hydrogenated vegetable fat (4 %); and calcium propionate (0.2 %) (flour basis). The breads were prepared without additives or processing aids addition in order to observe only the contribution of vital wheat gluten on bread quality.

The breads were prepared using the modified straight dough method. The ingredients were mixed at low speed (~90 rpm) for 3 min in a Hyppolito model HAE 10 mixer (Hyppolito, Ferraz de Vasconcelos, BRA), and then at high speed (~ 210 rpm) until the optimal development of the gluten network (observed manually by stretching the dough). The doughs were divided into portions of  $400 \pm 1$  g, rounded by hand, left to rest for 15 min at 21–22 °C and molded in a HM2 Hp 0.5 molder (Hyppolito, Ferraz de Vasconcelos, Brazil), placed in open pans (dimensions of 20 x 10 x 5 cm) and taken to the fermentation chamber model CCKU 5868 20-1 (Super Freezer, Poços de Caldas, BRA), at 35 °C, and controlled relative humidity of 95 %, where they remained until the optimum fermentation time (checked manually by dough resistance to touch). Proofed doughs were baked in an Ipanema IP 4/80 hearth oven (Haas, Curitiba, Brazil), at 180 °C top temperature, and 195 °C hearth temperature. The baking time was monitored visually by the development of crust color. After

baking, the breads were removed from the pans and cooled to room temperature (~1 h), cut in an electric slicer (GPaniz of Caxias, BRA) into slices 1.2 cm thick, packed in polyethylene bags and stored under controlled temperature (~20 °C) until the bread quality analyses. These analyses were made during the shelf life of bread on days 1, 4 and 9 (storage).

#### IV.2.2.4. Pan bread quality tests

The pan breads were characterized on days 1, 4 and 9 through the following analyses: specific volume, moisture and water activity of the crumb and the crust, instrumental color and texture of the crumb, as well as crumb image analysis. The entire inner portion leaving only 1 cm from the boarder was considered as crumb.

##### IV.2.2.4.1. Bread quality tests on the production day (day 1)

The specific volume of the breads was determined by AACCI method 10-05.01 (2010), and expressed in mL/g. The crumb color of the breads was measured using a MiniScan HunterLab spectrophotometer (Reston, USA), according to the CIELab system, determining the values of L\*, a\* and b\* (MINOLTA 1993). The bread crumb image analysis was performed using the program Image J (Oliveira, Rosell, & Steel, 2015; Rosell, Santos, & Collar, 2010). The bread crumb image was captured using HP Scanjet G2710 (Hewlett-Packard, California, USA) with resolution of 300 dpi.

##### IV.2.2.4.2. Quality testing of bread during shelf life (days 1, 4 and 9)

The crumb and crust moisture contents were determined by AACCI method 44-15.02 (2010). The crumb and crust water activity (Aw) was measured in a Digital AquaLab 4TEV model (Decagon, Washington, USA), according to manufacturer specifications.

The crumb firmness of the bread was evaluated by AACCI method 74-10.02 (2010), in a TA-XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, Surrey, UK), with force capacity of 25 kg, using an aluminum probe P/35, and the following parameters: pre-test speed = 1.7 mm/s; test speed = 1.7 mm/s; post-test speed = 10.0 mm/s; strength = 10 g; distance 40 %; mode: compression strength. The evaluation was conducted on six replicates, the probe compression on two central slices arranged horizontally to the platform.

#### IV.2.2.5. Statistical analysis

All the analyses, including the baking test, were performed in triplicate, except for crumb firmness that was determined on six replicates. Data was submitted to analysis of variance with a 95 % confidence interval, and the mean comparison analysis was performed by Tukey's test, using the Statistica 7.0 software (StatSoft. Inc., Tulsa, USA).

### IV.3. Results and Discussions

#### IV.3.1. Chemical composition

Table 1 shows the results of the chemical composition of the control wheat flour (CWF) and wheat flour fortified at levels of 5 and 7 g/100 g of vital gluten (VGA and VGB) from different origins.

**Table 1.** Chemical composition (g/100 g, dry basis) of the control wheat flour and wheat flour fortified with vital wheat gluten from different origins

| Samples       | Ash            | Lipids        | Proteins       | Carbohydrates |
|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| CWF           | 0.82 ± 0.05 ns | 1.33 ± 0.08 b | 15.44 ± 0.46 c | 82.41         |
| 5 g/100 g VGA | 0.83 ± 0.04 ns | 1.11 ± 0.11 b | 19.13 ± 0.23 b | 78.93         |
| 7 g/100 g VGA | 0.86 ± 0.00 ns | 1.74 ± 0.11 a | 20.92 ± 0.22 a | 76.48         |
| 5 g/100 g VGB | 0.85 ± 0.04 ns | 1.30 ± 0.05 b | 19.71 ± 0.25 b | 78.14         |
| 7 g/100 g VGB | 0.82 ± 0.04 ns | 1.11 ± 0.06 b | 21.03 ± 1.08 a | 77.04         |

CWF = control wheat flour; VGA = vital wheat gluten A; VGB = vital wheat gluten B. Different letters in the columns indicate significant differences between means by Tukey's test ( $P < 0.05$ ); ns = non-significant. Carbohydrates were calculated by difference. Moisture content: 11.89 % for CWF; 12.03 % for 5 g/100 g VGA; 12.30 % for 7 g/100 g VGA; 12.07 % for 5 g/100 g VGB; 12.32 % for 7 g/100 g VGB.

Regarding the chemical composition of CWF and fortified wheat flour, there were no differences in mineral and lipids content, except for 7 g/100 g VGA with the highest amount of lipids in the blend. It was observed that the protein content increased in the fortified wheat flour, compared to the CWF and it was proportional with the increasing level (5 and 7 g/100 g) of vital gluten added, decreasing the carbohydrate content, calculated by difference. These results occurred because the vital gluten is a protein concentrate, which when added to flour contributes to the increase in total protein content providing mostly gliadins and glutenins.

#### IV.3.2 Technological analysis

Table 2 shows the results of the technological parameters for control wheat flour (CWF) and wheat flour fortified with levels of 5 and 7 g/100 g of vital gluten (VGA and VGB) from different origins.

##### IV.3.2.1. Wet and dry gluten contents and gluten index

When vital wheat gluten was added to wheat flour, the WG and DG were higher than for CWF, demonstrating the involvement of supplemented gliadins and glutenins in the formation of the gluten network. Analyzing the ratio WG/DG (Table 2), it was observed that the fortified flours were not different to CWF, however VGA presented WG/DG lower than VGB, indicating lower loss of water when the wet gluten passed by drying to obtain the dried gluten, probably because the gluten network formed by the addition of VGA physically held a greater quantity of water within its protein structure than VGB.

The GI is directly proportional to the viscoelastic quality of the gluten formed (Barak et al., 2014), and it is strongly influenced by glutenins (Wieser & Kieffer, 2001), which are responsible to the elastic behavior of the gluten network. The supplementation of wheat flour with vital gluten increased the amount of wet gluten (proportional to the amount added), however it did not imply in an increase in GI. This depends on the types of gluten proteins of the vital gluten and on the interaction between gliadins and glutenins from wheat flour and the vital gluten added. Therefore, by performing the GI calculations, it was observed that flour fortified with VGA and VGB, regardless of the level, had lower GI values compared to CWF.

VGA showed higher GI than VGB on both levels studied, indicating that VGA was more elastic than VGB. In a previous work (data not shown) it was observed that VGA presented better gliadin/glutenin ratio than VGB. According to Khatkar, Bell, & Schofield (1995) and Khatkar et al. (2013), the ideal dough viscoelastic behavior occurs due to the glutenin and gliadin balance, because each one of these proteins has a fundamental role in the development and stabilization of the gluten network. Besides, according to Cubadda, Carcea, & Pasqui (1992), the gluten index can be used as a quality classification criterion of gluten from wheat flour, ranking as weak gluten (GI < 30 %), normal (GI 30-80 %) or strong (GI > 80 %). In this way, we used this standard to classify the glutes obtained from CWF and 5 and 7 g/100 g of VGA as strong glutes, while 5 and 7 g/100 g of VGB are classified as normal glutes.

**Table 2.** Technological parameters for control wheat flour (CWF) and wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of vital wheat gluten from different origins (VGA or VGB)

| Parameters             | CWF             | VGA             |                  | VGB              |                   |
|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
|                        |                 | 5 g/100 g       | 7 g/100 g        | 5 g/100 g        | 7 g/100 g         |
| Gluten analyses        |                 |                 |                  |                  |                   |
| WG (%)                 | 31.75 ± 1.68 c  | 46.57 ± 4.46 ab | 48.39 ± 1.23 ab  | 42.84 ± 0.22 b   | 52.57 ± 1.48 a    |
| DG (%)                 | 12.76 ± 1.12 c  | 22.61 ± 1.51 a  | 24.31 ± 1.16 a   | 15.73 ± 0.64 b   | 17.51 ± 1.35 b    |
| WG/DG                  | 2.51 ± 0.34 ab  | 2.07 ± 0.30 b   | 1.99 ± 0.14 b    | 2.73 ± 0.12 a    | 3.01 ± 0.17 a     |
| GI                     | 95.02 ± 1.49 a  | 77.57 ± 3.77 b  | 84.01 ± 2.89 b   | 62.59 ± 2.63 c   | 68.86 ± 3.21 c    |
|                        |                 |                 |                  |                  |                   |
| Falling number (s)     | 476.5 ± 12.9 ns | 464.5 ± 26.2 ns | 462.5 ± 10.0 ns  | 466.5 ± 8.8 ns   | 455.75 ± 13.4 ns  |
|                        |                 |                 |                  |                  |                   |
| Farinograph parameters |                 |                 |                  |                  |                   |
| ABS (%)                | 55.73 ± 0.38 c  | 59.63 ± 0.58 b  | 60.60 ± 0.10 a   | 60.63 ± 0.31 a   | 61.03 ± 0.12 a    |
| DDT (min)              | 10.07 ± 0.32 c  | 13.50 ± 0.92 b  | 17.43 ± 0.25 a   | 10.73 ± 0.25 c   | 11.27 ± 0.12 c    |
| STA (min)              | 14.97 ± 0.59 c  | 19.17 ± 0.74 b  | 21.17 ± 0.25 a   | 13.80 ± 0.17 c   | 14.33 ± 0.76 c    |
| MTI (FU)               | 25.33 ± 2.12 b  | 26.67 ± 2.08 b  | 24.67 ± 2.00 b   | 36.00 ± 0.00 a   | 31.33 ± 2.08 a    |
|                        |                 |                 |                  |                  |                   |
| Alveograph parameters  |                 |                 |                  |                  |                   |
| P (mm)                 | 72.17 ± 3.97 c  | 92.88 ± 6.23 ab | 103.24 ± 7.35 a  | 87.91 ± 1.99 b   | 106.68 ± 7.06 a   |
| L (mm)                 | 59.00 ± 2.65 c  | 75.67 ± 1.53 b  | 95.67 ± 7.02 a   | 104.33 ± 3.79 a  | 92.00 ± 7.21 a    |
| P/L                    | 1.26 ± 0.08 a   | 1.22 ± 0.07 a   | 1.11 ± 0.05 a    | 0.84 ± 0.03 b    | 1.18 ± 0.13 a     |
| W (10 <sup>-4</sup> J) | 184.86 ± 8.27 c | 322.67 ± 8.74 b | 418.93 ± 22.59 a | 347.67 ± 22.50 b | 376.50 ± 36.01 ab |
|                        |                 |                 |                  |                  |                   |
| Mixolab™ parameters    |                 |                 |                  |                  |                   |
| ABS (%)                | 59.13 ± 0.12 c  | 60.80 ± 0.00 b  | 62.37 ± 0.58 a   | 59.57 ± 0.55 c   | 61.10 ± 0.00 b    |
| DDT (min)              | 6.77 ± 0.23 c   | 8.08 ± 0.54 abc | 8.59 ± 0.69 a    | 7.01 ± 0.41 bc   | 8.30 ± 0.59 ab    |
| STA (min)              | 10.27 ± 0.31 b  | 11.19 ± 0.28 a  | 11.17 ± 0.45 a   | 10.65 ± 0.20 ab  | 10.72 ± 0.20 ab   |
| C1 (Nm)                | 1.07 ± 0.02 b   | 1.13 ± 0.02 a   | 1.11 ± 0.03 ab   | 1.10 ± 0.01 ab   | 1.11 ± 0.02 ab    |
| C2 (Nm)                | 0.49 ± 0.02 c   | 0.57 ± 0.01 a   | 0.56 ± 0.01 a    | 0.51 ± 0.00 bc   | 0.53 ± 0.01 ab    |
| C3 (Nm)                | 1.85 ± 0.03 a   | 1.82 ± 0.03 a   | 1.73 ± 0.02 b    | 1.72 ± 0.03 b    | 1.64 ± 0.01 c     |
| C4 (Nm)                | 1.72 ± 0.04 a   | 1.67 ± 0.05 a   | 1.58 ± 0.04 b    | 1.56 ± 0.02 b    | 1.52 ± 0.02 b     |
| C5 (Nm)                | 2.82 ± 0.08 a   | 2.87 ± 0.12 a   | 2.60 ± 0.05 b    | 2.72 ± 0.06 ab   | 2.57 ± 0.04 b     |

CWF = control wheat flour; VGA = vital wheat gluten A; VGB = vital wheat gluten B; WG = wet gluten; DG = dry gluten; GI = gluten index; WG/DG = wet gluten/dry gluten ratio; ABS = water absorption; DDT = dough development time; STA = dough stability; MTI = mixing tolerance time; P = elasticity; L = extensibility; P/L = elasticity/extensibility ratio; W = work input = gluten strength; C1, C2, C3, C4 and C5 = torque as described in the methodology. Different letters in the lines indicate significant differences between means by Tukey's test ( $P < 0.05$ ); ns = non-significant.

#### IV.3.2.2. Falling Number

The indirect measurement of  $\alpha$ -amylase from CWF and wheat flour fortified with VGA and VGB through the Falling Number (Table 2) did not show difference among the samples, indicating that vital wheat gluten did not affect the  $\alpha$ -amylase activity when added to wheat flour.

#### IV.3.2.3. Farinograph parameters

Analyzing the farinograph results (Table 2), it was observed, in general, that the wheat flour fortified with vital gluten increased water absorption, because there was incorporation of a higher amount of proteins in the blend, needing higher amount of water for completely moisturizing the constituents of the flour to develop the dough. Regarding the other parameters, VGA presented better technological features than VGB and CWF, with greater dough development time (DDT), greater dough stability (STA) during the mixing process, and mixing tolerance index (MTI) similar to CWF. Thus, the dough made with wheat flour fortified with different levels of VGA requires more time to complete the development of its gluten network, and supports longer periods of dough mixing than doughs produced with VGB or CWF. The samples of wheat flour fortified with VGB did not show differences for the DDT and STA when compared to CWF; only the MTI values were higher, indicating that the gluten network formed by VGB addition to wheat flour does not tolerate long periods of mixing, and its gluten network weakens rapidly with overmixing. These differences between VGA and VGB are related to the type of proteins that compose the gluten fractions (Don, Lichtendonk, Plijter, & Hamer, 2003; Létang, Piau, & Verdier, 1999).

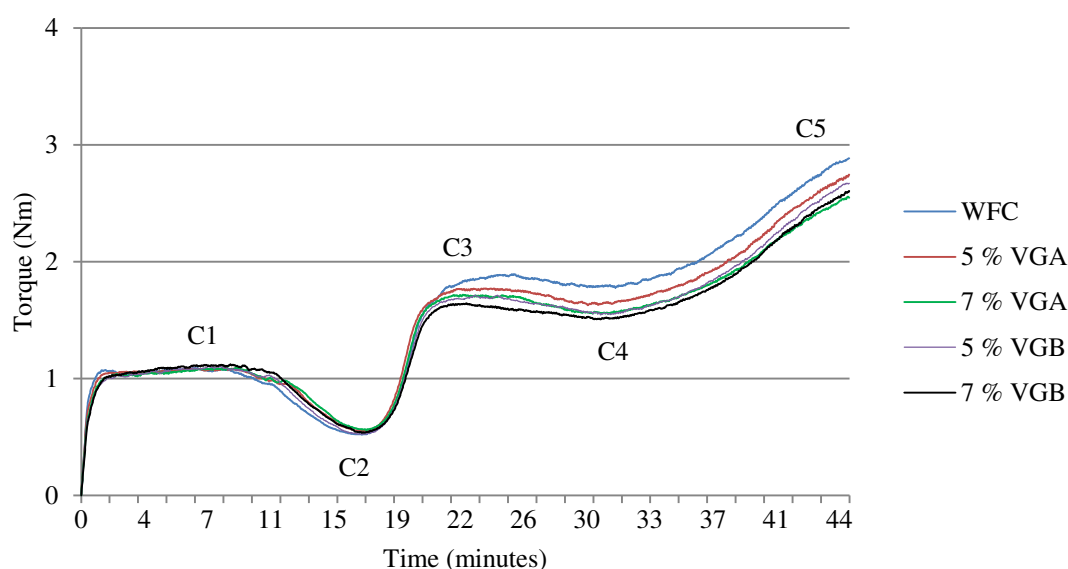
#### IV.3.2.4. Alveograph parameters

Alveograph parameters (Table 2), showed, in general, that the wheat flour fortified with VGA or VGB presented higher values for elasticity (P), extensibility (L), and gluten strength (W) compared to CWF. There were no differences in the results of the P/L ratio, with the exception of wheat flour fortified with 5 g/100 g of VGB, which presented a value below 1, showing a greater extensibility than elasticity. Through the gluten strength (W), it was found that CWF is weaker than the samples added of 7 g/100 g VGA or VGB. This is due to the high elasticity of the dough (Fernandes, Pereira, Germani, & Oiano-Neto, 2008) found for these samples. The incorporation of vital gluten to wheat flour contributes to the increase of dough viscoelastic parameters, both elasticity and extensibility, due to glutenins and gliadins

addition (Codina et al., 2010; Hadna, Dap, Šimurina, & Filip, 2013; Mirsaeedghazi, Emam-Djomeh, & Mousavi, 2008). Thus, VGA and VGB addition increased the area under the curve, indicating greater gluten strength (W).

#### IV.3.2.5. Thermomechanical properties

Technological analysis through the Mixolab™ assesses the quality of the gluten network and the pasting properties when flour is mixed at 30 °C, heated to 95 °C and cooled to 50 °C, always with stirring (Codina et al., 2010; Dhaka et al., 2012; Gil-Humanes, Pistón, Rosell, & Barro, 2012; Rosell et al., 2010). The curve obtained is usually divided into two parts: the first part refers to the gluten network properties of the dough during mixing (parameters: absorption - ABS, dough development time - DDT, dough stability - STA, maximum minimum torque - C1 and protein weakening - C2); and the second part is linked to the starch properties and it represents the dough viscosity under mixing and concomitant heating (starch gelatinization - C3, breakdown of the starch granules - C4 and dough consistency after cooling - C5). The results obtained in the Mixolab™ are presented in Table 2 and Figure 1.



**Figure 1.** Mixolab™ curves obtained for control wheat flour (CWF) and wheat flour fortified with 5 or 7 g/100 g of vital wheat gluten from different origins (VGA or VGB)

In general, there was increased water absorption (Table 2) for the wheat flour fortified with VGA or VGB compared to CWF, except for 5 g/100 g VGB. Moreover, the dough

obtained from CWF showed lower DDT being different to 7 g/100 g VGA or VGB; for STA, the dough obtained from VGA showed high stability of its gluten network, differing from CWF, while the STA for VGB did not differ either from VGA or CFW. For C1, a difference was observed between CWF and 5 g/100 g VGA, and for C2, the highest values were found for 5 and 7 g/100 g VGA and 7 g/100 g VGB.

Assessing the first part of the Mixolab™ curve (Figure 1), the differences among the samples are more related to the secondary endpoints of the curve, which refer to the extent of weakening (C1-C2) and the rate of weakening (fall angle of the curve C1-C2) of the gluten network when subjected to overmixing. Thus, it is possible to see that CWF and 5 g/100 g VGB are the doughs that had greater weakening of the protein network. According Gil-Humanes et al. (2012), the reduction in dough consistency (C2 torque, Table 2) is related to proteins of lower quality for baking connected to gliadin content. Also according to these authors, DDT and STA are related to the dough strength when subjected to the mixing process. Between the proteins involved in the gluten network formation, the gliadins are responsible for reducing the strength and stability of the dough when added to flour (Khatkar et al., 2013; MacRitchie, 1987; Rosell et al., 2010). Lundh & Macritchie (1989) observed that the difference between the DDT from excellent and reasonably good for baking wheat varieties is attributed to glutenin ratio, and Dhaka et al. (2012) found a strong relationship between DDT and the balance of glutenin and gliadin. Thus, we found that, even with larger amounts of gliadin (data not shown), VGA, at the different levels used, developed a gluten network with better viscoelastic characteristics for baking than VGB, because VGA its better glutenin/gliadin ratio in its composition.

Evaluating the second part of the curve (Figure 1) related to the starch properties, together with the values of torque at C3, C4 and C5 (Table 2), it was found that CWF and 5 g/100 g VGA showed the same behavior with higher C3, C4 and C5. In C5, 5 g/100 g VGB also showed a higher gain in consistency, but it did not differ from the dough with 7 g/100 g VGA or VGB addition. The torque reduction at C3, related to starch gelatinization, occurred because the incorporation of gluten to wheat flour influenced dough consistency, by reducing starch and increasing proteins in the blend. This can limit the swelling of the starch granules, reducing the viscosity of the slurry (Debet & Gidley, 2006).

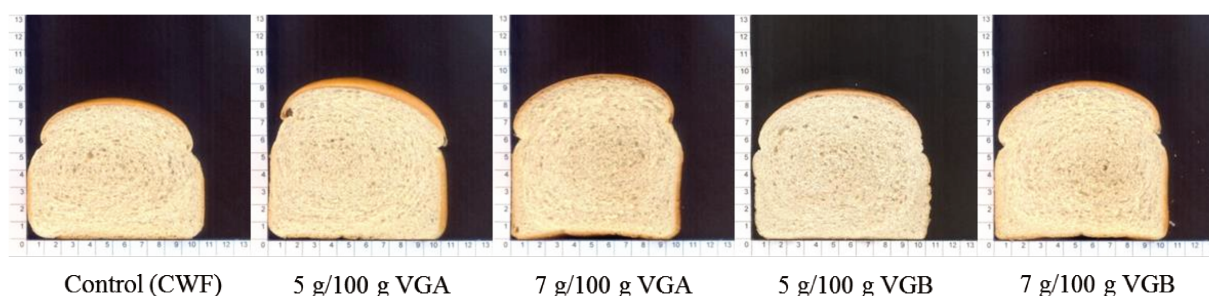
### IV.3.3. Baking test and evaluation of bread quality

The results of the physical-chemical analyses obtained from bread produced with wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g VGA or VGB compared with the control bread are presented in Table 3.

#### IV.3.3.1. Physical-chemical analyses of bread on production day (day 1)

The analyses carried out only on the bread preparation day were specific volume (SV) and color, and their results are presented in Table 3. The specific volume of the breads is widely used in industries and bakeries (Hoseney et al., 1970), and it provides relevant data about the dough development during the mixing process and growth of the bread during its proofing and baking (Czuchajowska & Paszczynska, 1996; Dua et al., 2009; Scanlon & Zghal, 2001; van der Zalm, van der Goot, & Boom, 2011). The volume directly affects the visual appearance of bread (at the time of purchase), besides other characteristics, such as crumb color and texture (Cauvain, 2015).

Analyzing the SV values (Table 3), it was observed that the bread made with wheat flour fortified with 7 g/100 g VGA showed larger volume (4.30 mL/g) than breads prepared with CWF, 5 g/100 g VGA, and 5 and 7 g/100 g VGB. These last breads did not differ from each other (Figure 2). These results are in agreement with Marchetti et al. (2012), who found that vital gluten addition to wheat flour increased the specific volume of the bread due to its better viscoelastic behavior than wheat flour only, because of the increase of the amount of glutenin in the samples.



**Figure 2.** Slices of breads made with control wheat flour (CWF) and wheat flour fortified with 5 and 7 % of vital wheat gluten from different origins (VGA or VGB).

**Table 3.** Quality evaluation of breads elaborated with control wheat flour and wheat flour fortified vital wheat gluten

|                        |            | Control bread      | Bread made from wheat flour fortified |                    |                    |                    |
|------------------------|------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                        |            |                    | 5 g/100 g VGA                         | 7 g/100 g VGA      | 5 g/100 g VGB      | 7 g/100 g VGB      |
| Specific volume (mL/g) |            | 3.66 ± 0.09 b      | 3.68 ± 0.16 b                         | 4.30 ± 0.21 a      | 3.62 ± 0.03 b      | 3.80 ± 0.08 b      |
| Crumb color            | <i>L</i> * | 76.97 ± 2.64 b     | 79.15 ± 0.46 a                        | 79.32 ± 0.54 a     | 78.35 ± 0.84 ab    | 77.79 ± 0.98 ab    |
|                        | <i>a</i> * | 1.86 ± 0.06 a      | 1.85 ± 0.10 a                         | 1.89 ± 0.06 a      | 1.71 ± 0.08 b      | 1.70 ± 0.12 b      |
|                        | <i>b</i> * | 19.12 ± 0.28 ab    | 19.44 ± 0.39 a                        | 19.43 ± 0.41 a     | 18.75 ± 0.31 b     | 18.96 ± 0.39 ab    |
| Firmness (N)           | Day 1      | 6.31 ± 0.43 a C    | 6.26 ± 0.60 a C                       | 4.44 ± 0.33 c C    | 5.11 ± 0.28 b C    | 4.93 ± 0.54 bc C   |
|                        | Day 4      | 9.16 ± 0.36 a B    | 9.34 ± 0.37 a B                       | 7.01 ± 0.26 c B    | 8.24 ± 0.20 b B    | 7.94 ± 0.69 b B    |
|                        | Day 9      | 9.95 ± 0.41 b A    | 10.80 ± 0.52 a A                      | 7.59 ± 0.23 d A    | 8.86 ± 0.50 c A    | 8.73 ± 0.71 c A    |
| Crumb water activity   | Day 1      | 0.97 ± 0.00 ns A   | 0.97 ± 0.00 ns NS                     | 0.96 ± 0.00 ns NS  | 0.97 ± 0.00 ns NS  | 0.97 ± 0.00 ns NS  |
|                        | Day 4      | 0.96 ± 0.00 ns B   | 0.97 ± 0.00 ns NS                     | 0.96 ± 0.00 ns NS  | 0.96 ± 0.00 ns NS  | 0.97 ± 0.00 ns NS  |
|                        | Day 9      | 0.96 ± 0.00 ns B   | 0.96 ± 0.01 ns NS                     | 0.96 ± 0.00 ns NS  | 0.96 ± 0.00 ns NS  | 0.97 ± 0.00 ns NS  |
| Crust water activity   | Day 1      | 0.94 ± 0.01 ns NS  | 0.95 ± 0.01 ns NS                     | 0.94 ± 0.00 ns B   | 0.94 ± 0.01 ns NS  | 0.94 ± 0.00 ns B   |
|                        | Day 4      | 0.94 ± 0.01 ab NS  | 0.95 ± 0.00 ab NS                     | 0.94 ± 0.00 b B    | 0.94 ± 0.00 ab NS  | 0.95 ± 0.00 a A    |
|                        | Day 9      | 0.95 ± 0.00 ns NS  | 0.96 ± 0.00 ns NS                     | 0.95 ± 0.00 ns A   | 0.95 ± 0.00 ns NS  | 0.96 ± 0.00 ns A   |
| Crumb moisture (%)     | Day 1      | 41.10 ± 0.16 ns NS | 42.02 ± 0.68 ns A                     | 42.13 ± 0.12 ns A  | 42.22 ± 0.46 ns NS | 42.72 ± 0.11 ns A  |
|                        | Day 4      | 40.07 ± 0.56 ns NS | 40.91 ± 0.60 ns AB                    | 40.46 ± 0.39 ns B  | 41.23 ± 0.04 ns NS | 41.80 ± 0.09 ns AB |
|                        | Day 9      | 39.36 ± 0.92 b NS  | 40.36 ± 0.35 ab B                     | 40.08 ± 0.30 ab B  | 40.24 ± 0.81 ab NS | 41.26 ± 0.65 a B   |
| Crust moisture (%)     | Day 1      | 33.04 ± 2.08 ns NS | 34.89 ± 1.95 ns NS                    | 34.01 ± 0.37 ns NS | 35.66 ± 1.21 ns NS | 35.78 ± 0.68 ns NS |
|                        | Day 4      | 35.07 ± 1.14 ns NS | 36.05 ± 1.34 ns NS                    | 34.68 ± 1.22 ns NS | 36.57 ± 0.67 ns NS | 36.98 ± 0.49 ns NS |
|                        | Day 9      | 35.07 ± 1.14 ns NS | 36.05 ± 1.34 ns NS                    | 35.51 ± 0.48 ns NS | 36.52 ± 1.24 ns NS | 37.03 ± 1.01 ns NS |

VGA = vital wheat gluten A; VGB = vital wheat gluten B; Control bread = elaborated with control wheat flour (CWF); *L*\* = lightness, *a*\* and *b*\* = chromaticity coordinates, (-*a*\* = green, +*a*\* = red, -*b*\* = blue, +*b*\* = yellow). Different lowercase letters in the lines and different uppercase letters in the columns (for the same parameter) indicate significant differences between means by Tukey's test ( $P < 0.05$ ); ns and NS = non-significant.

The increase in the SV occurred due to the incorporation of gliadins and glutenins in CWF, enabling the formation of a better gluten network, which prevents the exit of gases from the fermentation process (Dobraszczyk & Morgenstern, 2003; Dobraszczyk & Salmanowicz, 2008; Khatkar et al., 1995). Thus, higher specific volume is achieved when enough amounts of vital gluten with good technological quality is added to the wheat flour, 7 g/100 g VGA in this study. The largest bread volumes are obtained with those doughs that have a good alveograph behavior (Marchetti et al., 2012), especially with a good relationship between elasticity (P, glutenin) and extensibility (L, gliadin) and gluten strength (W), but also when doughs have good mixing properties, such as increased dough development time (DDT) and stability (STA) (Tronsmo, Magnus, Færgestad, & Schofield, 2003), as measured by the farinograph and Mixolab (Dhaka et al., 2012). Furthermore, according to Singh (2001), the macromolecules, such as the glutenin macropolymer (GMP) (Don et al., 2003), contributes to the higher specific volume of the bread, because they are directly related to the elastic characteristic of the dough (Don et al., 2003; Wang et al., 2014). In this study, we observed that 7 g/100 g VGA presented better viscoelastic properties for baking (Table 2), reflecting on an increase in SV.

With respect to bread color (Table 3), color is a critical parameter in baked products (Cauvain, 2015). Breads with very light or very dark crusts are associated with faults during processing. The presence of sugars in the formulation accelerates the reactions of caramelization and Maillard, leading to the progressive darkening of the crust (Esteller & Lannes, 2005). As the crumb reaches temperatures below 100 °C (about 98 °C), its color is mostly a consequence of the color of the flour and other raw materials used, and the bread volume. For L\* of the crumb, breads with VGA showed higher L\* values than bread made with control wheat flour. This may be due to the gluten network formed in the mixing process, which gave breads with high volume, more uniform crumb structure, increasing the extent of light reflected. Regarding the chromaticity coordinates of the bread crumb, the results indicate that the bread prepared with VGB had the lowest values of a\* (less red) compared to VGA and the control bread. On the other hand, when analyzing the b\* coordinate, the bread with 5 g/100 g VGB showed a lower value (less yellow) when compared to blends with VGA. These differences may be explained by differences in color observed for the vital gluten (A and B) powders that were added to wheat flour, even in small quantities

(VGA had  $L^* = 86.96$ ,  $a^* = 1.81$  and  $b^* = 18.95$  and VGB had  $L^* = 86.77$ ,  $a^* = 1.01$  and  $b^* = 15.23$ ), where VGA visually looked more yellow, and VGB was grayer.

#### IV.3.3.2. Physical-chemical analyses of bread during its shelf life (days 1, 4 and 9)

Crumb firmness for bakery products depends on the formulation (flour quality, amount of sugar, fat, emulsifiers, enzymes, addition of gluten and the use of bread improvers), dough moisture and storage conditions (Esteller & Lannes, 2005; Luyten, Plijter, & Vliet, 2004; Roudaut, Dacremont, Valle, & Meste, 2002). Observing the values found (Table 3), bread crumb firmness increased with storage time. The bread with 7 g/100 g VGA presented lower firmness compared to the other breads within the same day of evaluation. This happened because VGA promoted a higher volume of bread, as it presented better viscoelastic properties (Table 2). The better viscoelastic properties of VGA permitted greater gas retention during proofing and baking, yielding bread with higher specific volume. This leads to more aerated, less dense crumbs, with thinner cell walls, and consequently softer texture. In addition, the increase of the crumb bread firmness during storage occurred due to the process of retrogradation of amylopectin and the migration of water from the crumb to the crust, a process that occurs during storage of this product (Cauvain, 2015).

Bread has high water activity ( $A_w \sim 0.90$ ) (Czuchajowska, Pomeranz, & Jeffers, 1989), ie, it has a lot of free water available for microbial growth and chemical reactions deterioration. For this reason, usually the commercially available products have relatively short shelf life (10 – 12 days); and are likely mainly to present the growth of molds and yeasts on the surface (Montenegro, 2011.). The results for  $A_w$  of the bread crumb were higher than 0.96, with no significant differences ( $P < 0.05$ ) between the samples, which ends up putting all breads within a critical range of microbiological stability. They are therefore more susceptible to growth of molds and yeasts, as observed from the ninth day of bread storage, even with the addition of 0.2 % (flour basis) calcium propionate. Also regarding the bread crumb  $A_w$ , the control bread showed differences in the results between the different days analyzed, reducing  $A_w$  with increasing storage time, which did not occur with the breads produced with vital gluten, most likely because it retains water in its structure.

Oliveira, Telis-Romero, Da-Silva, & Franco (2014) report some changes that occur in baked products related to shelf life, among which the loss of crust crispness due to water

absorption or water migration from the crumb to the crust. Regarding the bread crust  $A_w$ , significant differences between the samples from the first day to last day of storage were observed. This may be due to increased water retention in the crumb by the gluten network formed by VGA.

Observing the results in Table 3, there was no significant difference in crumb moisture content in the samples on the first and fourth days of storage, but on day 9, it was observed that the bread crumb of the blend with 7 g/100 g VGB showed a significant difference from the control bread, with higher moisture. Also regarding bread crumb moisture, the blends with 5 and 7 g/100 g VGA and 7 g/100 g VGB presented significant differences during the storage period, and the moisture on the 9th day was lower than the moisture on day 1. For bread crust moisture, no significant difference was observed among the different formulations of bread and among the days of storage.

#### IV.3.3.3. Image analysis of bread crumb

The results of the image analysis of bread crumb made with control wheat flour (CWF) and flour fortified with different levels of VGA or VGB are presented in Table 4 and Figure 3.

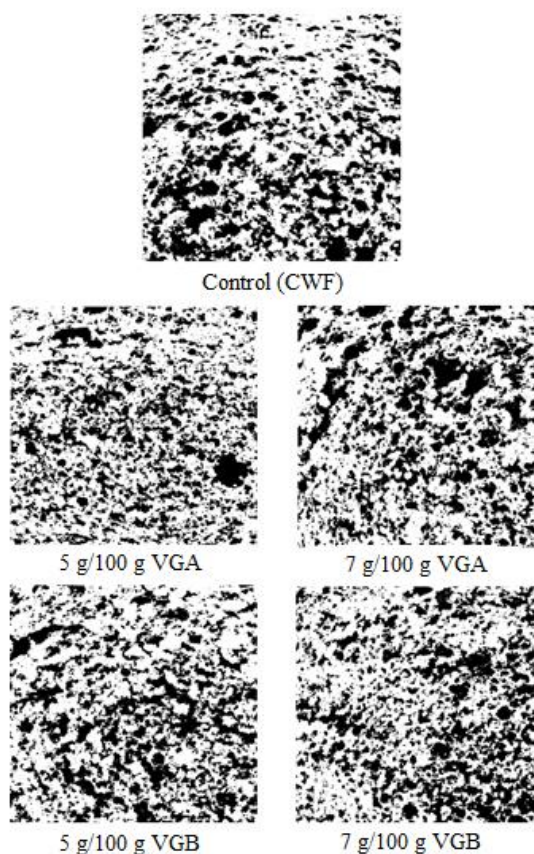
**Table 4.** Parameters obtained in the image analysis of the bread crumb made with control wheat flour (CWF) and wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of vital gluten from different origins (VGA or VGB)

| Breads             | Alveoli number | Alveoli area (mm <sup>2</sup> ) | Alveoli perimeter (mm) |
|--------------------|----------------|---------------------------------|------------------------|
| Control bread      | 7552 ± 417 b   | 0.20 ± 0.01 a                   | 1.24 ± 0.08 ab         |
| Bread with 5 % VGA | 9450 ± 886 a   | 0.14 ± 0.01 b                   | 1.22 ± 0.03 ab         |
| Bread with 7 % VGA | 7735 ± 329 b   | 0.20 ± 0.00 a                   | 1.34 ± 0.03 a          |
| Bread with 5 % VGB | 7830 ± 770 b   | 0.21 ± 0.02 a                   | 1.14 ± 0.04 b          |
| Bread with 7 % VGB | 8295 ± 205 ab  | 0.19 ± 0.01 a                   | 1.22 ± 0.10 ab         |

VGA = vital wheat gluten A; VGB = vital wheat gluten B; Control bread = bread made of control wheat flour (CWF). Different letters in the columns indicate significant differences between means by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

The analysis of the structure of the bread crumb indicates that the formulations containing vital wheat gluten did not promote great changes regarding the number, area and perimeter of the alveoli. The bread prepared with 5 g/100 g VGA presented the greatest

number of alveoli and the lowest alveoli area compared to others, indicating a more closed structure than other breads. For the perimeter, the bread crumb with 7 g/100 g VGA presented higher alveoli perimeter, but with the same area as the alveoli produced in the bread crumb with 5 g/100 g VGB. This may be due to the formation of alveoli with irregular structures that resemble fissures.



**Figure 3.** Image analysis of the crumb of breads with control wheat flour control (CWF) and wheat flour fortified with 5 and 7 g/100 g of vital gluten from different origins (VGA or VGB).

According to Rosell et al. (2010), the baking process significantly affects these parameters measured in image analysis, yielding higher alveoli numbers with a conventional baking process. These authors found higher amounts of alveoli when they used a conventional method of baking (~1200 alveoli), when compared with methods where there was pre-baking and freezing of breads (~980 alveoli) or pre-baking and the use of lower temperatures of

bread storage (~1000 alveoli). The air that is trapped inside the dough during the mixing process determines the number of gas cells in the bread, and the baking process affects the size of these cells (Scanlon & Zghal, 2001), but also the constitution in terms of glutenin and gliadin and a better relationship between them directly influence the distribution of the gas cells in the crumb of bread, and the bread volume (Tronsmo et al., 2003).

The images shown in Figure 3 do not show large differences in the alveoli structure of the breads, confirming the values shown in Table 4, but it is possible to see that the bread with 5 g/100 g VGA showed a structure with a greater number of alveoli and smaller than the others. Possibly, this is because the addition of 5 g/100 g vital gluten to wheat flour increased the protein amount sufficiently to generate a more homogeneous dough and with better distribution of the alveoli than the others.

#### **IV.4. Conclusions**

The addition of vital gluten to wheat flour for bread making contributed to improve the rheological parameters of the dough evaluated. In this study, when VGA was added to wheat flour, its dough showed dough development time and gluten network stability while the addition of VGB produced a weaker dough under mixing conditions. When assessing the volume characteristics and crumb texture of the breads, it was observed that the bread made from wheat flour fortified with 7 g/100 g of VGA had the highest volume and lower firmness during its storage due to the viscoelastic characteristics of gluten given by rheological responses. From this study, we conclude that the flours with better technological quality and that provided bread with better quality were those with the addition of vital gluten A, compared to flour with the addition of vital gluten B, reinforcing the existence of differences in the quality of different vital glutens sold in Brazil, and pointing out the need for better product quality information to better define the levels to be used in baking industries.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grants numbers 163129/2013-4 and 118348/2014-0) for grants to authors Fernanda and Gabriela, respectively. The authors would like to thank Sul Mineiro

Mill (Varginha, MG, Brazil) for wheat flour donation; and Labonathus (São Paulo, SP, Brazil) and Granotec® (Curitiba, PR, Brazil) for donating vital wheat gluten.

## References

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International, 2010. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method. AACCI International, St. Paul, MN, USA.
- Barak, S., Mudgil, D., & Khatkar, B. S. (2013). Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 211–217.
- Barak, S., Mudgil, D., & Khatkar, B. S. (2014). Influence of gliadin and glutenin fractions on rheological, pasting, and textural properties of dough. *International Journal of Food Properties*, 17, 1428–1438.
- Cauvain, S. (2015). *Technology of breadmaking. Technology of Breadmaking* (Third edit). New York: Springer.
- Codina, G. G., Mironeasa, S., Bordei, D., & Leahu, A. (2010). Mixolab versus alveograph and falling number. *Czech Journal Food Science*, 28, 185–191.
- Cubadda, R., Carcea, M., & Pasqui, L. A. (1992). Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina. *Cereal Foods World*, 37, 866–869.
- Czuchajowska, Z., & Paszczynska, B. (1996). Is wet gluten good for baking ? *Cereal Chemistry*, 73, 483–489.
- Czuchajowska, Z., Pomeranz, Y., & Jeffers, H. C. (1989). Water activity and moisture content of dough and bread. *Cereal Chemistry*, 66, 128–132.
- Debet, M. R., & Gidley, M. J. (2006). Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*, 64, 452–465.
- Delcour, J.A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 469–92.
- Dhaka, V., Gulia, N., & Khatkar, B. S. (2012). Application of mixolab to assess the bread making quality of wheat varieties. *Open Access Scientific Reports*, 1, 1–8.
- Dobraszczyk, B. J., & Morgenstern, M. (2003). Rheology and the breadmaking process.

- Journal of Cereal Science*, 38, 229–245.
- Dobraszczyk, B. J., & Salmanowicz, B. P. (2008). Comparison of predictions of baking volume using large deformation rheological properties. *Journal of Cereal Science*, 47, 292–301.
- Don, C., Lichtendonk, W. J., Plijter, J. J., & Hamer, R. J. (2003). Understanding the link between GMP and dough: From glutenin particles in flour towards developed dough. *Journal of Cereal Science*, 38, 157–165.
- Dua, S., Lukow, O. M., Humphreys, G., & Adams, K. (2009). Effect of extraction methods and wheat cultivars on gluten functionality. *The Open Food Science Journal*, 3, 84–92.
- Esteller, M. S., Pitombo, R. N. M., & Lannes, S. C. S. (2005). Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. *Journal of Cereal Science*, 41, 19–21.
- Esteller, M. S., & Lannes, S. C. S. (2005). Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 802–806.
- Fernandes, A. F., Pereira, J., Germani, R., & Oiano-Neto, J. (2008). Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum* Lineu). *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 28, 56–65.
- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Rosell, C. M., & Barro, F. (2012). Significant down-regulation of  $\gamma$ -gliadins has minor effect on gluten and starch properties of bread wheat. *Journal of Cereal Science*, 56, 161–170.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 12–30.
- Hadna, M., Dap, T., Šimurina, O., & Filip, B. (2013). Empirical and fundamental rheological properties of wheat flour dough as affected by different climatic conditions. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1381–1391.
- Hoseney, R. C., Finney, K. F., & Pomeranz, Y. (1970). Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. VI. Gliadin-lipid-glutenin interaction in wheat gluten. *Cereal Chemistry*. Retrieved from <http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/abstracts/1970/cc1970a22.asp>
- Huang, W., Li, L., Wang, F., Wan, J., Tilley, M., & Ren, C. (2010). Effects of

- transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough quality. *Food Chemistry*, 121, 934–939.
- Khatkar, B. S., Barak, S., & Mudgil, D. (2013). Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 38–41.
- Khatkar, B. S., Bell, A. E., & Schofield, J. D. (1995). The dynamic rheological properties of glutens and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science*, 22, 29–44.
- Létang, C., Piau, M., & Verdier, C. (1999). Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *Journal of Food Engineering*, 41, 121–132.
- Lundh, G., & Macritchie, F. (1989). Size exclusion HPLC characterisation of gluten protein fractions varying in breadmaking potential. *Journal of Cereal Science*, 10, 247–253.
- Luyten, H., Plijter, J. J., & Vliet, T. O. N. V. A. N. (2004). Crispy/crunchy crusts of cellular solid foods: a literature review with discussion. *Journal of Texture Studies*, 35, 445–492.
- MacRitchie, F. (1987). Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 6, 259–268.
- MacRitchie, F. (2014). Requirements for a test to evaluate bread-making performance. *Journal of Cereal Science*, 59, 1–2.
- Marchetti, L., Cardós, M., Campaña, L., & Ferrero, C. (2012). Effect of glutens of different quality on dough characteristics and breadmaking performance. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 224–231.
- Melnyk, J. P., Dreisoerner, J., Marcone, M. F., & Seetharaman, K. (2012). Using the gluten peak tester as a tool to measure physical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 56, 561–567.
- Miller, K. A., & Hoseney, R. C. (1999). Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. *Cereal Chemistry*, 76, 105–109.
- Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. A. (2008). Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 112–119.
- Montenegro, F. M. (2011). Avaliação do desempenho tecnológico de misturas de farinhas de triticale e trigo em produtos de panificação, 94p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de

- Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- Oliveira, D. S., Telis-Romero, J., Da-Silva, R., & Franco, C. M. L. (2014). Effect of a *thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. *Food Chemistry*, *143*, 139–146.
- Oliveira, L. C., Rosell, C. M., & Steel, C. J. (2015). Original article Effect of the addition of whole-grain wheat flour and of extrusion process parameters on dietary fibre content , starch transformation and mechanical properties of a ready-to-eat breakfast cereal. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*, 1504–1514.
- Rosell, C. M., Santos, E., & Collar, C. (2010). Physical characterization of fiber-enriched bread doughs by dual mixing and temperature constraint using the Mixolab. *European Food Research and Technology*, *231*, 535–544.
- Roudaut, G., Dacremont, C., Valle, B., & Meste, M. Le. (2002). Crispness : a critical review on sensory and material science approaches. *Trends in Food Science & Technology* *13*, 217–227.
- Scanlon, M. G., & Zghal, M. C. (2001). Bread properties and crumb structure. *Food Research International*, *34*, 841–864.
- Schmiele, M., Jaekel, L. Z., Patricio, S. M. C., Steel, C. J., & Chang, Y. K. (2012). Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of pan bread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour. *International Journal of Food Science and Technology*, *47*, 2141–2150.
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*, *25*, 207–227.
- Singh, H., & Macritchie, F. (2001). Application of polymer science to properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, *33*, 231–243.
- Song, Y., & Zheng, Q. (2007). Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. *Trends in Food Science & Technology*, *18*, 132–138.
- Tronsmo, K. M., Magnus, E. M., Færgestad, E. M., & Schofield, J. D. (2003). Relationships between gluten rheological properties and hearth loaf characteristics. *Cereal Chemistry*, *80*, 575–586.
- van der Zalm, E. E. J., van der Goot, A. J., & Boom, R. M. (2011). Quality of shear

- fractionated wheat gluten – Comparison to commercial vital wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 53, 154–159.
- Wadhawan, C. K., & Bushuk, W. (1989). Studies on vitality of commercial gluten. I. Physical, chemical and technological characteristics. *Cereal Chemistry*, 66, 456–461.
- Wang, P., Xu, L., Nikoo, M., Ocen, D., Wu, F., Yang, N., Jin, Z., & Xu, X. (2014). Effect of frozen storage on the conformational, thermal and microscopic properties of gluten: Comparative studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocolloids*, 35, 238–246.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24, 115–9.
- Wieser, H., & Kieffer, R. (2001). Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Journal of Cereal Science*, 34, 19–27.
- Xu, J., Bietz, J. a., & Carriere, C. J. (2007). Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. *Food Chemistry*, 101, 1025–1030.
- Zhou, Y., Zhao, D., Foster, T. J., Liu, Y., Wang, Y., Nirasawa, S., Tatsumi, E., & Cheng, Y. (2014). Konjac glucomannan-induced changes in thiol/disulphide exchange and gluten conformation upon dough mixing. *Food Chemistry*, 143, 163–9.

## ARTIGO V.

---

### **Testes simples utilizados como ferramentas para avaliação de glúten vital**

Ortolan, Fernanda; Urbano, Karoline; Steel, Caroline Joy

Este artigo será submetido à:

*International Journal of Food Science and Technology*

## **V. Testes simples utilizados como ferramentas para avaliação de glúten vital**

Ortolan, Fernanda; Urbano, Karoline; Steel, Caroline Joy

### **Resumo**

O glúten vital é um ingrediente muito utilizado na indústria de panificação, porém comercializado com poucas especificações de suas proteínas e de suas propriedades viscoelásticas. Por outro lado, essas informações devem ser obtidas de forma rápida e com baixo custo. A vitalidade do glúten comercializado na forma de pó para a fortificação de farinha de trigo é, geralmente, avaliada através de teste de panificação. Embora este teste forneça respostas importantes para a avaliação da qualidade viscoelástica do glúten vital, requer muito tempo para sua realização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade viscoelástica de dois glúten vitais comerciais de diferentes origens (A e B) através de testes simples, e correlacionar os resultados obtidos nos testes simples com parâmetros reológicos da massa (farinografia e extensografia) e de qualidade dos pães (volume específico do pão e firmeza do miolo) obtidos da farinha de trigo fortificada com 7 g/100 g de glúten vital A ou glúten vital B. Os resultados dos testes simples mostraram diferenças nas propriedades viscoelásticas entre os glúten vitais; O glúten vital A apresentou-se mais elástico e menos extensível que o glúten vital B, e sua bola de glúten mostrou maior volume específico. As correlações indicaram que os testes simples podem ser utilizados para determinar o desempenho de glúten vital comercial quando utilizado na fortificação de farinhas, reforçando a ideia de sua utilização para aferir a qualidade viscoelástica. Além disso, os resultados evidenciam a necessidade de maiores informações sobre as proteínas do glúten vital para sua comercialização e uso.

Palavras chaves: glúten vital, teste de expansão, teste de extensibilidade, índice de glúten

### **V.1. Introdução**

O glúten vital é um concentrado proteico (com cerca de 80 g/100 g de proteínas), comercializado em forma de pó de cor branco-acinzentada que é utilizado para fortificar farinhas que não apresentam propriedades viscoelásticas adequadas para o processo de

panificação. O glúten vital é obtido da farinha de trigo, através da separação aquosa de proteínas e amido, e tem a capacidade de recuperar suas propriedades viscoelásticas quando hidratado, podendo ser aplicado às farinhas que não apresentam características tecnológicas adequadas para panificação (DAY et al., 2006; MAJZOBI; ABEDI, 2014).

Segundo a Associação Internacional de Glúten de Trigo (MARCHETTI et al., 2012), a comercialização pode ser realizada nas formas “não vital” e “vital”. Glúten “não vital” é aquele que foi submetido a um processo irreversível de desnaturação, e, desta forma, não pode ser “revitalizado”, apresentando apenas capacidade de absorver água em quantidade relativa ao tamanho e distribuição de suas partículas (TEDRUS et al., 2001). Por outro lado, o glúten “vital”, quando em contato com a água, pode ser hidratado e recuperar suas propriedades viscoelásticas (elasticidade e extensibilidade) (CZUCHAJOWSKA; PASZCZYNSKA, 1996).

As propriedades viscoelásticas do glúten estão relacionadas com a quantidade e qualidade de suas proteínas (KHATKAR; BARAK; MUDGIL, 2013; MARCHETTI et al., 2012). Essas propriedades influenciam a qualidade de textura, formato e expansão de produtos de panificação (ABANG ZAIDEL et al., 2008). As gliadinas são responsáveis pela extensibilidade da rede de glúten, e as gluteninas responsáveis pela elasticidade. Desta forma, um balanço apropriado entre gliadinas e gluteninas é determinante na reologia do glúten, porém não deve ser considerado o único fator para avaliação de sua qualidade (BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2013; DELCOUR et al., 2012; WANG; JIN; XU, 2015).

A vitalidade do glúten é geralmente avaliada pela sua habilidade em aumentar o volume e melhorar a textura do miolo de pães elaborados a partir de uma farinha padrão fortificada com o glúten vital (WADHAWAN; BUSHUK, 1989). Este é o teste de rotina realizado pelas indústrias de panificação para avaliação do nível de glúten vital necessário para fortificar a farinha de trigo (GUERRIERI; CERLETTI, 1996).

Para determinar as diferenças na funcionalidade do glúten vital, parâmetros de qualidade de farinha e determinação de volume do pão são usualmente utilizados (DUA et al., 2009). Diversos estudos (CZUCHAJOWSKA; PASZCZYNSKA, 1996; MARCHETTI et al., 2012; SONG; ZHENG, 2007) têm demonstrado a utilização de farinografia, extensografia e alveografia para testar a funcionalidade do glúten vital obtido por diferentes métodos de extração. Os testes físicos da massa formada pela adição de glúten vital à farinha de trigo são usados para avaliar o potencial de panificação, ou seja, a força e o desempenho do glúten sob

condições mecanizadas (DOBRASZCZYK; MORGENSTERN, 2003). Segundo Tronsmo et al. (2003), a avaliação reológica ajuda a prever o comportamento da massa e a qualidade dos produtos finais. A análise das características reológicas da massa também desempenha papel importante no controle de qualidade e na definição da especificação de ingredientes dos produtos elaborados (CODINA et al., 2010).

Somado a estas análises, os testes químicos preditivos, incluindo o estudo da proporção de gliadinas e gluteninas, a adição dessas frações isoladas sobre a farinha de trigo, e a solubilidade das proteínas do glúten em diferentes sistemas, tem sido utilizados para avaliar os efeitos das gliadinas e gluteninas sobre as propriedades reológicas, de pasta e de textura de massas (BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2014; CHANDI; SEETHARAMAN, 2012; KHATKAR et al., 2002; UTHAYAKUMARAN et al., 2001), ou ainda avaliar seus efeitos sobre a qualidade de produtos finais (BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2014). Porém, muitos destes testes demandam tempo, custos elevados, equipamentos específicos e mão de obra qualificada para o desenvolvimento da análise e interpretação dos resultados, portanto, dificultam a obtenção de resultados rápidos (CHANDI; SEETHARAMAN, 2012), que são essenciais para moinhos, padarias, e indústrias de panificação.

No Brasil, faltam especificações técnicas com relação as características das proteínas do glúten vital comercializado, dificultando sua aplicação nos produtos de panificação, já que a qualidade do produto final é influenciada pela qualidade do glúten vital adicionado à farinha (WEEGELS et al., 1994). Devido às exigências do mercado, técnicas que permitem uma rápida conclusão sobre a qualidade do glúten vital são necessárias.

Testes simples, como os teores de glúten úmido e seco e o índice de glúten, podem ser bons indicativos da qualidade tecnológica do glúten vital (KAUR et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2015). Um teste simples e muito comum é o teste de expansão do glúten, no qual o glúten é extraído da farinha de trigo por lavagem manual e assado para obtenção de uma bola de glúten expandida (CHEN et al., 1998; CHIANG; CHEN; CHANG, 2006; ORTOLAN et al., 2014). Este teste pode ser utilizado em indústrias de panificação e moinhos para calcular o percentual de proteínas da farinha de trigo [ $\text{Proteína (g/100 g)} = (\text{Peso do glúten assado/peso da farinha}) \times 100$ ], ou para avaliar a capacidade de expansão biaxial, indicando o quanto a rede de glúten suporta a pressão do vapor d'água formado no seu interior (MARTELO, 1998). Isso poderia estar associado ao volume de pães, pois a rede de glúten precisa suportar a

pressão dos gases que promove a expansão do pão no início do seu assamento. O volume específico da bola de glúten poderia ser utilizado para avaliação da qualidade de glúten vital.

Este estudo tem por finalidade avaliar a qualidade viscoelástica de glúten vitais comerciais de diferentes origens através de testes rápidos e simples, e correlacionar os resultados dos testes simples obtidos neste trabalho com parâmetros tecnológicos, considerados decisivos na avaliação da qualidade de glúten vital nas indústrias de panificação, moinhos e para verificar se estes testes simples refletem o comportamento tecnológico deste produto.

## **V.2. Material e Métodos**

### **V.2. 1. Material**

Duas amostras de glúten comercial de diferentes origens foram usadas neste estudo, sendo nomeadas de glúten vital A (GVA) e glúten vital B (GVB).

### **V.2.2. Métodos**

#### **V.2.2.1. Preparo do glúten**

Os glúten vitais foram misturados com amido de trigo nativo (Serrana Química Industrial Ltda., Porto Alegre, Brasil) para obtenção de um *blend* contendo 12 g/100 g de proteína total. A mistura de glúten em pó e amido de trigo foi realizada em batedeira elétrica planetária modelo K45SS (KitchenAid™, Benton Harbor, Estados Unidos), a 220 rpm, por um período de 15 minutos. Após isto, o *blend* foi armazenado em frascos fechados à temperatura ambiente e ao abrigo da umidade. Esse *blend* foi utilizado para a realização da avaliação viscoelástica de glúten vital, através de testes simples.

#### **V.2.2.2. Lavagem manual do glúten**

A lavagem manual do glúten foi realizada com os *blends* de GVA e GVB misturados ao amido, adicionando-se água suficiente para a hidratação das proteínas e formação da rede de glúten, de acordo com o método 38-10.02 da AACCI (2010).

#### V.2.2.3. Teores e índice de glúten

A determinação dos teores de glúten úmido (GU) e de glúten seco (GS) e do índice de glúten (IG) de GVA e GVB foi realizada com os *blends* dos glútenos misturados ao amido, pelo método 38-12.02 da AACCI (2010), utilizando-se o equipamento Glutomatic (Perten, Hägersten, Suíça).

#### V.2.2.4. Teste simples de extensibilidade

O teste de extensibilidade foi realizado com os *blends* de GVA e GVB com obtenção do glúten úmido pelo uso do Glutomatic (método 38-12.02 da AACCI, 2010), sem as etapas de centrifugação e secagem. Um equipamento simples, constituído de placa de madeira (15 cm x 30 cm) com marcações de 0 (zero) a 20 cm foi desenvolvida pelos autores para a realização do teste simples de extensibilidade. O glúten úmido foi colocado sobre um prego no topo da placa de madeira (Fig.1), com marcações para a medida da sua extensibilidade em centímetros. A placa foi pendurada a cerca de 2 metros de altura, em um local com condições ambiente de temperatura e umidade (UR ~85 %, T ~25 °C). O término da análise se deu quando, ao estirar-se por seu próprio peso, o glúten ficou completamente seco (tempo ~24 h). Esta análise foi realizada em triplicata.

#### V.2.2.5. Teste de expansão

O teste de expansão foi realizado pelo forneamento do glúten úmido que foi preparado com os *blends* de GVA e GVB, em Glutomatic, pelo método 38-12.02 da AACCI (2010), sem as etapas de centrifugação e secagem. Assim que foi retirado do equipamento, o glúten foi colocado em uma forma de alumínio retangular (38 cm x 28 cm x 5 cm) e levado ao forno elétrico de convecção modelo HPE80 (Prática Technicook-Technipan, Pouso Alegre-MG, Brasil), a 200 °C, por 20 minutos (MARTELO, 1998). Após este período, a bola de glúten assada foi resfriada à temperatura ambiente por aproximadamente uma hora, e então foi realizada a medida do volume (v) pelo deslocamento de sementes de painço, e a massa (m) em balança analítica modelo B-TEC 500 (Tecnal, Piracicaba-SP, Brasil), calculando-se o volume específico como a razão volume/massa (v/m).

### V.2.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada para atender os diferentes objetivos deste trabalho, desta forma, os testes simples para caracterização tecnológica dos glúten vitais foram realizados em triplicata e as suas médias foram submetidas ao teste T bicaudal ( $P < 0.05$ ) utilizando Microsoft Excel 2010.

A correlação de Pearson ( $P < 0.05$  e  $P < 0.01$ ), entre os dados de análises tecnológicas (farinografia, extensografia, firmeza do miolo do pão e volume específico do pão) realizadas com farinha de trigo fortificada com 7 g/100 g de GVA ou GVB (dados não apresentados), e os dados dos testes simples realizados neste estudo, foi realizada utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, Estados Unidos),

## V.3. Resultados e Discussão

### V.3.1. Características tecnológicas dos glúten vitais medidas por testes simples

#### V.3.1.1. Avaliação da quantidade e da qualidade do glúten

Os teores de glúten úmido e seco (obtidos da lavagem manual e pelo uso de Glutomatic) e o índice de glúten são ferramentas importantes na caracterização do glúten obtido de grãos e farinhas de trigo, e também servem para caracterizar o glúten vital. Esses resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Conteúdo de glúten úmido e seco (g/100 g) e índice de glúten de glúten vital A (GVA) e glúten vital B (GVB) obtidos por lavagem manual e uso do Glutomatic

|                                   | GVA          | GVB          | <i>p-valor</i> |
|-----------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| <b>Lavagem manual</b>             |              |              |                |
| Glúten úmido - GU (g/100 g, b.s.) | 34,16 ± 0,43 | 32,47 ± 0,64 | 0,019          |
| Glúten seco - GS (g/100 g, b.s.)  | 13,88 ± 0,44 | 12,99 ± 0,39 | 0,042          |
| Relação gluten úmido/gluten seco  | 2,46 ± 0,05  | 2,50 ± 0,00  | 0,312          |
| <b>Glutomatic</b>                 |              |              |                |
| Glúten úmido - GU (g/100 g, b.s.) | 34,45 ± 0,17 | 33,43 ± 0,96 | 0,041          |
| Glúten seco - GS (g/100 g, b.s.)  | 14,02 ± 0,97 | 12,39 ± 0,58 | 0,067          |
| Relação gluten úmido/gluten seco  | 2,46 ± 0,16  | 2,70 ± 0,06  | 0,092          |
| Índice de glúten - IG (%)         | 58,28 ± 1,28 | 8,86 ± 0,49  | 2,496E-06      |

GVA = glúten vital A, GVB = glúten vital B; b.s. = base seca. Médias na linha apresentam diferenças significativas pelo teste T bicaudal ( $P < 0,05$ ).

Os resultados pelos dois métodos apontaram diferenças no teor de glúten úmido (GU) e índice de glúten (IG) para os glúten vitais avaliados. Em ambos os casos, os teores de GU para GVA foram maiores que para GVB ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), assim como o IG (medido no sistema Glutomatic) foi maior para GVA que para GVB. GS apresentou diferença significativa apenas quando medido pela lavagem manual.

A capacidade de hidratação do glúten vital é relacionada principalmente à quantidade e qualidade das suas proteínas (DAHESH et al., 2016; NG; MCKINLEY, 2008), mas fatores físicos como a distribuição do tamanho de partícula também poderiam influenciar. Entretanto, GVA e GVB apresentaram aparentemente o mesmo tamanho de partícula, mas a capacidade de hidratação foi diferente entre eles, resultando em diferentes teores de glúten úmido, sendo maior para GVA que para GVB (Tabela 1).

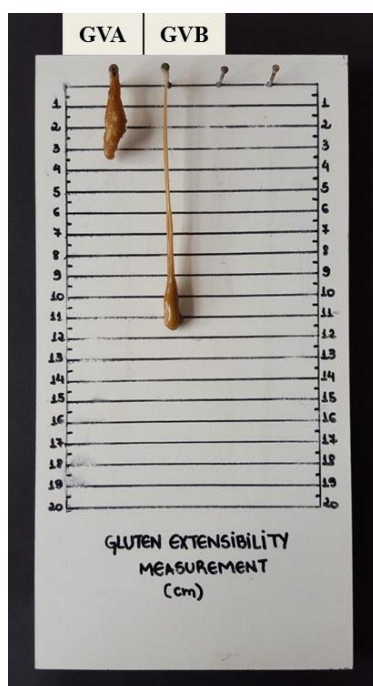
A quantidade e qualidade do glúten determinam a absorção de água e a viscoelasticidade da massa, que é favorável para a retenção do dióxido de carbono durante o processo de fermentação (CAUVAIN, 2015), contribuindo para o aumento do volume dos pães. Portanto, quando o glúten vital é adicionado à farinha de trigo, pode contribuir para o aumento da absorção de água, melhorando as propriedades reológicas da massa, consequentemente, melhorando a qualidade dos produtos finais.

Quando analisamos o IG obtido no Glutomatic observamos que GVA apresentou melhor qualidade para panificação que GVB, com uma rede mais elástica que extensível. O IG é calculado a partir da quantidade de glúten que fica retido na peneira depois da centrifugação do glúten úmido, sendo diretamente proporcional à sua qualidade (BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2014) e à elasticidade da rede de glúten formada (OIKONOMOU et al., 2015). O IG pode ser utilizado como um critério de classificação do glúten, podendo diferenciar os trigos que apresentam quantidade de proteínas similares. Segundo a classificação proposta por Oikonomou et al. (2015), GVA formou uma rede de glúten considerada normal (quando  $IG = 30$  até  $80\%$ ), enquanto GVB formou uma rede de glúten considerada fraca ( $IG < 30\%$ ).

#### V.3.1.2. Avaliação da extensibilidade por teste simples

Vários instrumentos têm sido utilizados para avaliar a capacidade de extensão da massa e do glúten, como a extensografia, texturômetros e reômetros (ABANG ZAIDEL et al.,

2008; DOBRASZCZYK; ROBERTS, 1994; DOBRASZCZYK; SALMANOWICZ, 2008; TRONSMO et al., 2003; WESOŁOWSKA-TROJANOWSKA et al., 2014; WIESER; KIEFFER, 2001). Neste estudo foi realizado um teste simples para avaliar a extensibilidade do glúten quando submetido a uma deformação prévia. Desta forma, a extensibilidade do glúten foi avaliada com o glúten úmido obtido no Glutomatic, sem as etapas de centrifugação e secagem e este foi esticado de maneira uniaxial pela ação de seu próprio peso. Os glúten avaliados por esta metodologia estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Teste simples de extensibilidade dos glutens vitais de diferentes origens (GVA e GVB).

Os resultados do teste de extensibilidade apresentaram diferenças significativas entre os glúten avaliados, sendo que as médias obtidas foram de  $3,57 \pm 0,32$  cm para GVA e  $11,40 \pm 0,66$  cm para GVB com *p*-valor de  $3,07 \times 10^{-5}$ . Avaliar a extensibilidade do glúten é importante, porque as massas dos pães crescem com a expansão dos gases formados na fermentação, sendo capazes de se estender sem romper (SINGH; MACRITCHIE, 2001), mas a rede de glúten desta massa deve ter força suficiente para evitar o colapso da estrutura.

Segundo Abang Zaidel et al. (2008), o principal problema encontrado nos testes de extensibilidade de glúten e massa é manter a amostra intacta sem seu rompimento até a aquisição do resultado. Neste teste simples desenvolvido, não houve a ruptura da amostra de glúten. Por outro lado, o tempo de análise foi maior (~24h) do que as técnicas que utilizam instrumentos, porque dependeu das condições climáticas de temperatura e umidade relativa do ar para a secagem completa do glúten estendido, como observado na Figura 1.

Entretanto, o método tem limitações, pois, segundo as nossas observações, se a umidade relativa do ar estiver muito baixa (<30 %) e/ou a temperatura ambiente estiver muito alta (>30 °C), o glúten úmido pode rapidamente perder água para o ambiente, reduzindo sua umidade e tornando-se seco mais rápido, sem que tenha se estendido pela placa. Isso prejudicaria o uso deste teste para avaliação da extensibilidade da rede de glúten.

Muitos fatores podem interferir na capacidade de extensão do glúten úmido, por exemplo, o tempo e o tipo de mistura para obtenção do glúten, que influencia no desenvolvimento da rede de glúten, a temperatura e a quantidade de água adicionada para a hidratação de suas proteínas (ABANG ZAIDEL; CHIN; YUSOF, 2010; DOMENEK et al., 2004). Quando o mesmo teste foi realizado com o glúten obtido pela lavagem manual, sem controle da força aplicada, muitas vezes, a amostra não se estendeu, impossibilitando a medida de sua extensibilidade. Desta forma, a padronização das condições de análise (processo de formação e lavagem do glúten, temperatura e umidade relativa do teste), mesmo que difícil nas instalações fabris pode garantir a observação de melhores resultados para diferenciar glúten vitais comerciais.

Pelos resultados observados, GVA apresentou menor extensibilidade que GVB, portanto, rede de glúten mais elástica, ratificando os resultados já encontrados em trabalhos anteriores para estes mesmos glúten vitais (ORTOLAN et al., 2017), pois GVA apresentou melhor balanço entre gliadinas e gluteninas que GVB (dados não apresentados). O teste de extensibilidade em placa é muito simples, mas fornece uma resposta importante em relação à qualidade do glúten vital utilizado. Um glúten mais extensível está relacionado a uma rede de glúten com características mais fracas, isto é, que rapidamente é formada, mas não apresenta boa estabilidade frente ao trabalho mecânico a que é submetida na etapa de mistura, apresentando também baixa resistência à extensão nas etapas posteriores de descanso, fermentação e forneamento (MELNYK et al., 2012).

### V.3.1.3. Avaliação da qualidade pelo teste de expansão

O teste de expansão é um teste simples que pode ser utilizado para avaliar a capacidade da bola de glúten expandir-se durante o forneamento. Após forneada e resfriada, a bola de glúten foi avaliada pela determinação de volume específico (Figura 2).



**Figura 2.** Teste de expansão dos glutens vitais de diferentes origens (GVA e GVB).

Observou-se claramente que GVA apresentou maior expansão, e, portanto, maior volume que GVB. O volume específico (VE) de GVA foi  $20,81 \pm 1,78$  mL/g e o de GVB  $12,77 \pm 1,27$  mL/g, com *p-valor* de 0,003, que indica diferença significativa entre os glutens avaliados. O teste de expansão é um teste simples que reflete o quanto a estrutura da rede de glúten formada suporta a expansão biaxial quando há aumento da pressão interna da bola de glúten ocasionada pela expansão dos gases e vapor d'água. Quanto maior o volume alcançado pela bola de glúten, maior é a pressão suportada por ela, apresentando uma rede proteica de melhor qualidade viscoelástica, mesmo formando uma estrutura interna de paredes mais finas que uma bola de glúten de menor volume (CHEN et al., 1998; CHIANG; CHEN; CHANG, 2006).

Neste estudo, GVA apresentou maior volume e com uma estrutura fina, porém rígida, enquanto GVB apresentou menor volume e estrutura fina, porém muito frágil ao toque.

Embora este teste seja simples e rápido, ele reflete a qualidade das proteínas formadoras do glúten, já que o glúten úmido utilizado pelo teste foi lavado para a retirada de proteínas solúveis e amido, restando apenas gliadinas e gluteninas no glúten úmido. Desta forma, GVA apresentou melhor qualidade para panificação que GVB pelo teste de expansão.

### V.3.2. Correlação entre os testes simples e parâmetros tecnológicos dos glútenos vitais

Para verificar se os testes simples predizem o comportamento dos glútenos vitais no processo de panificação, alguns parâmetros considerados importantes para avaliar a qualidade da massa no processo de mistura e no descanso da massa e dos pães produzidos com farinha de trigo fortificada com GVA e GVB (7 g/100 g), foi realizada análise de correlação Pearson (Tabela 2). Os parâmetros de qualidade de massas e pães utilizados para a análise de correlação foram medidos em trabalhos anteriores (ORTOLAN et al., 2017; Artigo IV), que utilizaram as mesmas amostras de glúten (GVA e GVB) e os mesmos níveis de fortificação da farinha de trigo controle (5 e 7 g/100 g).

Pela Tabela 2, foi possível verificar as correlações existentes entre os testes simples de avaliação da qualidade do glúten vital, e as análises reológicas das massas e dos pães obtidos da farinha de trigo fortificada com 7 g/100 g de GVA ou GVB. O volume específico da bola de glúten (VE-GV) não apresentou nenhuma correlação significativa com os parâmetros reológicos das massas e com os parâmetros de qualidade dos pães.

Um fato interessante observado neste estudo foi que nenhuma das respostas viscoelásticas dos glútenos (GVA e GVB), medidas pelos testes simples, influenciou os parâmetros reológicos da massa obtidos pela extensografia. Isso ocorreu, possivelmente, pelas interações entre as proteínas dos glútenos vitais e da farinha de trigo que foi suplementada com GVA e GVB, especialmente, devido ao grande tempo de descanso dado à massa durante a análise (135 min). O período de descanso de 135 min foi suficiente para ocorrer a interação entre as proteínas do glúten e da farinha e a estabilização da estrutura da matriz proteica formada, resultando em parâmetros extensográficos semelhantes entre a farinha suplementada com GVA e com GVB (dados não apresentados).

O índice de glúten do glúten vital (IG-GV) apresentou relação direta com TD ( $r = 0,98$ ), indicando que glútenos vitais elásticos adicionados à farinha de trigo formam massas que requerem maior tempo para o desenvolvimento completo da sua rede de glúten, e com maior estabilidade (EST) ( $r = 0,99$ ) na etapa de mistura do processo de panificação, reduzindo seu enfraquecimento quando exposto ao “*overmixing*” (ITM,  $r = -0,93$ ). Além disso, a adição de glúten elástico foi capaz de produzir pães com miolo com menor firmeza durante a sua vida de prateleira, como observado pelos coeficientes de correlação positivos entre IG e firmeza do miolo dos pães nos dias 1, 4 e 9 de armazenamento. Em trabalho anterior (dados não

divulgados), observou-se que a adição de 7 g/100 g de GVA (glúten mais elástico) produziu pão de forma de maior volume e com maior da redução da firmeza do miolo, quando comparado ao pão elaborado com 7 g/100 g de GVB (glúten mais extensível). Segundo Cauvain (2015), o volume afeta diretamente o aspecto visual do pão (na hora da compra), além das características de aparência, cor e maciez do miolo.

**Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade tecnológica dos glúten vitais A (GVA) e B (GVB) medidos através de testes simples, parâmetros farinográficos e extensográficos das massas, e parâmetros de qualidade dos pães elaborados com farinha de trigo fortificada com 7 g/100 g de glúten vital A (GVA) ou glúten vital B (GVB) medidos em trabalhos anteriores

| Parâmetros obtidos em trabalhos anteriores                                              | Parâmetros obtidos pelos testes simples     |                                    |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                                         | Volume específico da bola de glúten (VE-GV) | Índice de glúten do glúten (IG-GV) | Extensibilidade do glúten (EXT-GV) |
| <b>Parâmetros farinográficos da massa com farinha de trigo fortificada<sup>1</sup></b>  |                                             |                                    |                                    |
| Absorção de água – ABS (%)                                                              | -0,66                                       | -0,77                              | 0,80                               |
| Tempo de desenvolvimento – TD (min)                                                     | 0,81                                        | 0,98**                             | -1,00**                            |
| Estabilidade – EST (min)                                                                | 0,81                                        | 0,99**                             | -1,00**                            |
| Índice de tolerância à mistura – ITM (BU)                                               | -0,64                                       | -0,93**                            | 0,94**                             |
| <b>Parâmetros extensográficos da massa com farinha de trigo fortificada<sup>2</sup></b> |                                             |                                    |                                    |
| Resistência – R (mm)                                                                    | -0,22                                       | -0,56                              | 0,62                               |
| Resistência máxima – Rmax (mm)                                                          | -0,57                                       | -0,75                              | 0,78                               |
| Área abaixo da curva – A (cm <sup>2</sup> )                                             | -0,41                                       | -0,75                              | 0,75                               |
| Extensibilidade – EXT-massa (mm)                                                        | -0,30                                       | -0,56                              | 0,53                               |
| Relação Resistência/Extensibilidade – R/E                                               | 0,07                                        | -0,12                              | 0,17                               |
| <b>Parâmetros de qualidade dos pães<sup>1</sup></b>                                     |                                             |                                    |                                    |
| Volume específico do pão – VE-pão (mL/g)                                                | 0,80                                        | 0,74                               | -0,78                              |
| Firmeza do miolo no dia 1 (N)                                                           | -0,74                                       | -0,87*                             | 0,89*                              |
| Firmeza do miolo no dia 4 (N)                                                           | -0,74                                       | -0,89*                             | 0,94**                             |
| Firmeza do miolo no dia 9 (N)                                                           | -0,81                                       | -0,90*                             | 0,91*                              |

\*Coeficientes de correlação significativos,  $P < 0.05$ ; \*\* Coeficientes de correlação significativos,  $P < 0.01$ .<sup>1</sup>Artigo IV; <sup>2</sup>ORTOLAN et al. (2017).

Quando o glúten com características mais extensíveis foi adicionado à farinha de trigo, a massa produzida apresentou redução no TD ( $r = -1,00$ ) e na EST ( $r = -1,00$ ), e aumento no ITM ( $r = 0,94$ ), refletindo em uma massa com propriedades de mistura mais fracas, quando comparada àquela produzidas com farinha suplementada com glúten vital mais elástico. O glúten mais extensível adicionado à farinha para elaboração de pão de forma produziu pães com maior firmeza do miolo, demonstrados pelos coeficientes de correlação entre

extensibilidade do glúten úmido e firmeza do miolo nos diferentes dias de armazenamento dos pães.

Os testes simples podem ser boas alternativas para avaliação da qualidade de glúten vital comercial, apresentando correlação com importantes parâmetros tecnológicos de farinhas de trigo e pães. Desta forma, esses testes podem suprir algumas análises reológicas que demandam muito tempo, equipamentos específicos, pessoal treinado, e custos elevados, etc. Os testes simples favorecem a obtenção de resultados rápidos e com baixo custo, e de fácil interpretação, permitindo que as indústrias de panificação e moinhos estabeleçam a qualidade de glúten vitais comerciais, já que eles não recebem informações completas sobre a qualidade deste produto.

#### **V.4. Conclusões**

Os testes simples mostraram diferenças entre os glúten vitais comerciais analisados, onde GVA apresentou rede de glúten com maior elasticidade, e maior volume específico da sua bola de glúten, enquanto GVB formou rede de glúten mais extensível, e com menor volume específico para a sua bola de glúten. O índice de glúten mostrou relação direta com os parâmetros de mistura da massa (tempo de desenvolvimento e estabilidade), e inversa com o índice de tolerância à mistura e com a firmeza dos pães. Por outro lado, a extensibilidade apresentou relações opostas às aquelas obtidas para o índice de glúten, indicando que a adição de glúten mais elástico foi capaz de formar massas com melhores propriedades de mistura, e com menor possibilidade de enfraquecimento da sua rede de glúten, além de produzir pães com menor firmeza durante o armazenamento. O teste de expansão da bola de glúten foi o mais rápido para execução, porém não foi eficiente para predizer o comportamento viscoelástico de glúten vitais, em contrapartida, o índice de glúten e o teste de extensibilidade se mostraram eficientes para esta avaliação, mesmo sendo análises que exigem a utilização de um equipamento específico (Glutomatic), no caso da medida do índice de glúten, ou condições ambientais específicas ( $T \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $UR \sim 85\%$ ), no caso do teste de extensibilidade. Os resultados obtidos pelos testes simples podem auxiliar na adequação do tipo de glúten vital utilizado para a fortificação de farinha de trigo, a fim de alcançar a melhor qualidade do

produto final; além de ser uma alternativa de baixo custo para as indústrias de panificação e moinhos.

### Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (concessões números 163129/2013-4 e 123530/2015-6) através de bolsas aos autores Fernanda e Karoline, respectivamente. Os autores gostariam de agradecer a Labonathus® (São Paulo, SP) e a Granotec® (Curitiba, PR, Brasil) pela doação de glúten vital de trigo.

### Referências

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International. **Approved methods**, 11th ed., St. Paul, AACCI, 2010.
- ABANG ZAIDEL, D. N. et al. Rheological characterisation of gluten from extensibility measurement. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 549–556, jun. 2008.
- ABANG ZAIDEL, D. N.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A. A review on rheological properties and measurements of dough and gluten. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 20, p. 2478–2490, 2010.
- BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 211–217, abr. 2013.
- BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Influence of Gliadin and Glutenin Fractions on Rheological, Pasting, and Textural Properties of Dough. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. January 2015, p. 1428–1438, 2014.
- CAUVAIN, S. **Technology of breadmaking**. Third edit ed. New York: Springer, 2015.
- CHANDI, G. K.; SEETHARAMAN, K. Optimization of Gluten Peak Tester: a Statistical Approach. **Journal of Food Quality**, v. 35, n. 1, p. 69–75, 20 fev. 2012.
- CHEN, C. et al. Optimising the Frying Temperature of Gluten Balls using Response Surface Methodology. **Science**, v. 64, n. Thompson 1982, p. 64–70, 1998.
- CHIANG, S. H.; CHEN, C. S.; CHANG, C. Y. Effect of wheat flour protein compositions on the quality of deep-fried gluten balls. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 666–673, 2006.

- CODINA, G. G. et al. Mixolab versus alveograph and falling number. **Czech Journal Food Science**, v. 28, n. 3, p. 185–191, 2010.
- CZUCHAJOWSKA, Z.; PASZCZYNSKA, B. Is Wet Gluten Good for Baking ? **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 483–489, 1996.
- DAHESH, M. et al. Spontaneous gelation of wheat gluten proteins in a food grade solvent. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 1–10, 2016.
- DAY, L. et al. Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 82–90, fev. 2006.
- DELCOUR, J. A et al. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. **Annual review of food science and technology**, v. 3, p. 469–92, jan. 2012.
- DOBRSZCZYK, B. .; MORGENSTERN, M. . Rheology and the breadmaking process. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 3, p. 229–245, nov. 2003.
- DOBRSZCZYK, B. J.; ROBERTS, C. A. Strain hardening and dough gas cell-wall failure in biaxial extension. **Journal of Cereal Science**, v. 20, p. 265–274, 1994.
- DOBRSZCZYK, B. J.; SALMANOWICZ, B. P. Comparison of predictions of baking volume using large deformation rheological properties. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 292–301, mar. 2008.
- DOMENEK, S. et al. Swelling behavior and structural characteristics of wheat gluten polypeptide films. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 1002–8, 2004.
- DUA, S. et al. Effect of Extraction Methods and Wheat Cultivars on Gluten Functionality. **The Open Food Science Journal**, v. 3, n. 1, p. 84–92, 23 out. 2009.
- GUERRIERI, N.; CERLETTI, P. Effect of High-Temperature Short-Time Treatment of Wheat Flour on Gluten Vitality and Structure. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 6–9, 1996.
- KAUR, A. et al. Diversity in grain, flour, dough and gluten properties amongst Indian wheat cultivars varying in high molecular weight subunits (HMW-GS). **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 63–72, ago. 2013.
- KHATKAR, B. S. et al. Functional Properties of Wheat Gliadins . II . Effects on Dynamic Rheological Properties of Wheat Gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 307–313, 2002.
- KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International journal of biological macromolecules**, v. 53, p. 38–41, mar. 2013.

- MAJZOABI, M.; ABEDI, E. Effects of pH changes on functional properties of native and acetylated wheat gluten. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 1219–1224, 2014.
- MARCHETTI, L. et al. Effect of glutens of different quality on dough characteristics and breadmaking performance. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 224–231, abr. 2012.
- MARTELO, E. **Panificação: básico para padeiro**. Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. SENAI: Porto Alegre. 95p., 1998.
- MELNYK, J. P. et al. Using the Gluten Peak Tester as a tool to measure physical properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 561–567, nov. 2012.
- NG, T. S. K.; MCKINLEY, G. H. Power law gels at finite strains: The nonlinear rheology of gluten gels. **Journal of Rheology**, v. 52, n. 2, p. 417–449, 2008.
- OIKONOMOU, N. A. et al. Gluten Index for Wheat Products : Main Variables in Affecting the Value and Nonlinear Regression Model Gluten Index for Wheat Products : Main Variables in Affecting the Value and Nonlinear Regression Model. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. September, p. 1–11, 2015.
- ORTOLAN, F. et al. **Correlations between vital wheat gluten protein fractions, gluten index and specific volume obtained from a gluten expansion test**. AACC International Annual Meeting. **Anais...** Providence, Rhode Island, USA: 2014 Annual Meeting Abastract, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/hae.12083>
- ORTOLAN, F. et al. Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride. **LWT - Food Science and Technology**, v.79, p. 647-654.
- SINGH, H.; MACRITCHIE, F. Application of Polymer Science to Properties of Gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p. 231–243, 2001.
- SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 132–138, mar. 2007.
- TEDRUS, G. D. A. S. et al. Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães 1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 20–25, 2001.
- TRONSMO, K. M. et al. Relationships between gluten rheological properties and hearth loaf characteristics. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 575–586, 2003.

UTHAYAKUMARAN, S. et al. Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 138–141, 2001.

WADHAWAN, C. K.; BUSHUK, W. Studies on vitality of commercial gluten. I. Physical, chemical and technological characteristics. **Cereal Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 456–461, 1989.

WANG, P.; JIN, Z.; XU, X. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives.

**Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, Part A, p. 189–198, 2015.

WEEGELS, P. L. et al. Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 31–38, 1994.

WESOŁOWSKA-TROJANOWSKA, M. et al. Rheological properties of gluten obtained from polish wheat cultivars. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 20, n. 5, p. 1221–1226, 2014.

WIESER, H.; KIEFFER, R. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 19–27, 2001.

### 3. DISCUSSÃO GERAL

#### 3.1. Características químicas e estruturais dos glútenos vitais

As características químicas e aminoacídicas dos glútenos vitais comerciais (GV) e do glúten não vital (GNV) foram similares, especialmente, no teor de proteínas, que foi de 80 % em base seca, e no teor de umidade, que foi inferior a 10 %. Essas são geralmente as informações fornecidas pelos produtores de glúten vital, e que são utilizadas para a classificação do produto como “concentrado proteico” (BRASIL, 2005), porém não refletem a sua qualidade. Usualmente, os testes para determinação do teor de proteína são testes destrutivos, isto é, que não preservam a estrutura da proteína, por isso, estes testes não são capazes de fornecer informações sobre o tipo e a estrutura das proteínas que constituem o GV, dificultando a definição da sua aplicação na panificação.

O fracionamento sequencial de proteínas foi desenvolvido por Osborne (1907) e representa grande importância na avaliação dos tipos e quantidades relativas de proteínas que constituem as frações do GV. Muitos desafios estão presentes nesta técnica, pois a agregação das proteínas, em especial, gliadinas e gluteninas, dificulta a sua separação. Isso pode levar à contaminação das diferentes frações, ou ainda aumentar a insolubilidade dessas proteínas nos solventes, podendo ser erroneamente quantificadas como resíduos. No fracionamento, o fenômeno de agregação das proteínas do GV pode ocorrer pelo uso de diferentes solventes, e também devido à desnaturação mecânica e/ou térmica a que essas proteínas são submetidas durante o processo de obtenção do glúten vital.

Segundo Fu; Sapirstein; Bushuk (1996), a utilização de NaCl na primeira etapa do fracionamento possibilita a agregação entre gliadinas e gluteninas, interferindo na solubilidade dessas proteínas nos demais solventes. Por outro lado, a mistura da farinha e água para obtenção da massa, que leva à desnaturação mecânica do glúten (DOBRA SZCZYK, 2004) e a secagem, que leva à desnaturação térmica do glúten (JEANJEAN; DAMIDAUX; FEILLET, 1980; LAGRAIN et al., 2008; MICARD; GUILBERT, 2000; SCHOFIELD et al., 1983; SINGH; MACRITCHIE, 2004; STATHOPOULOS et al., 2008; TATHAM; DRAKE; SHEWRY, 1985; WEEGELS et al., 1994) resultam em modificações estruturais de suas proteínas.

A desnaturação mecânica promove modificações estruturais pela exposição dos resíduos de aminoácidos apolares, que antes estavam localizados em uma região central da molécula de proteína, para a sua superfície, ficando em contato com o ar introduzido com a agitação. Enquanto isso, os aminoácidos polares ficam expostos à fase aquosa, criando uma interface ar-líquido (CAUVAIN, 2015; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA 2010). À medida que a energia nessas interfaces aumenta, novas orientações moleculares podem levar a alterações estruturais, resultando em agregados proteicos insolúveis.

O tratamento térmico pode levar a uma nova conformação molecular, podendo modificar a quantidade de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias de proteínas. Por outro lado, as interações hidrofóbicas, que são exotérmicas até aproximadamente 70 °C (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA 2010), podem se estabilizar, levando à formação de agregados proteicos insolúveis, mesmo na presença de agente redutor, a exemplo do  $\beta$ -mercaptoetanol.

Os resultados encontrados para o fracionamento das proteínas mostrou que GVA apresentou quantidades relativas de proteínas nas frações de albuminas/globulinas e de gluteninas semelhantes a GVB, e maior quantidade de proteínas na fração de gliadinas que GVB. Possivelmente, isso ocorreu pela agregação das gliadinas e gluteninas de GVB que dificultou sua separação. A possível alteração da estrutura pelo tratamento térmico das proteínas de GVB foi comprovada pela comparação com glúten não vital (GNV). O GNV apresentou maior quantidade de proteínas na fração de gluteninas que GVA e GVB, refletindo a agregação de gliadinas e gluteninas, pelo efeito da temperatura, resultando na maior quantidade de proteínas na fração de glutenina, por se tratar de agregados solúveis em condições redutoras.

Além disso, os resultados do fracionamento revelaram que GVA apresentou melhor balanço entre gliadinas e gluteninas extraíveis, devido às quantidades relativas de proteínas semelhantes entre suas frações, sendo considerado o principal fator para a qualidade viscoelástica da rede de glúten. Segundo Dahesh et al. (2016); Khatkar; Barak; Mudgil (2013); Khatkar; Bell; Schofield (1995); Lookhart et al. (1993), tanto as gliadinas, quanto as gluteninas, interferem na qualidade viscoelástica da rede de glúten, por isso, quando há um equilíbrio nas quantidades dessas proteínas, a rede de glúten apresenta melhor qualidade, com equilíbrio entre as propriedades de extensibilidade e elasticidade (BEKES; GIANIBELLI;

WRIGLEY, 2004; DELCOUR et al., 2012; WANG; JIN; XU, 2015), refletindo em melhor qualidade dos produtos de panificação, a exemplo dos pães de forma.

Não apenas o fracionamento sequencial foi utilizado para avaliar as frações proteicas existentes no GV, mas também as análises qualitativas de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* – SDS-PAGE) em condições redutoras (pelo uso de  $\beta$ -mercaptoetanol) e não redutoras (sem  $\beta$ -mercaptoetanol) e cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (*size exclusion high-performance liquid chromatography* – SEC-HPLC) foram utilizadas para observar a massa molecular aparente das proteínas do GV. Os resultados dessas análises confirmaram a existência de proteínas de diferentes massas moleculares que constituem as frações de albuminas/globulinas, gliadinas e gluteninas de GVA, GVB e GNV; além de agregados proteicos insolúveis, mesmo em condições redutoras e não redutoras na análise de eletroforese, em especial para GVB e GNV. Provavelmente, esses agregados se formaram nessas amostras pela exposição de suas proteínas à alta temperatura.

As interações entre proteínas podem ser avaliadas através da solubilização dos agregados proteicos em solventes específicos (SCHMIELE, 2014). As interações proteicas do glúten envolvem as interações químicas covalentes, principalmente as ligações dissulfeto e em menor grau as ligações cruzadas de tirosina, e as interações químicas não covalentes (interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, entre outras). Os tipos de interações proteicas que ocorrem nos glúten vitais podem influenciar no mecanismo de formação da rede de glúten, refletindo em diferentes comportamentos viscoelásticos na panificação.

Os resultados da avaliação das interações proteicas deste trabalho mostraram evidências de que as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio são fundamentais para a estabilização dos agregados proteicos, tanto para GVA quanto para GVB. As ligações SS, embora em pequenas quantidades, também têm papel importante na formação dos agregados, principalmente, por participarem do mecanismo de intercâmbio entre SH/SS. Já, o GNV, apresentou baixa solubilidade em todos os sistemas utilizados para avaliação das interações químicas, provavelmente porque o tratamento térmico provocou alterações estruturais que impossibilitaram a solubilização de seus agregados nos solventes utilizados.

As interações SS, geralmente, ocorrem em menor quantidade que as interações não covalentes, mesmo assim são relevantes na estabilização de agregados e na formação da rede (HUEQNER et al., 1977; WALL, 1971), e isso foi observado para GVA e GVB. A pequena quantidade de SH livre encontrada nos GV e no GNV foi também confirmada pela técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy* – FTIR). Pelo FTIR, foi possível verificar a presença das estruturas secundárias das proteínas presentes nos GV e no GNV, e confirmou-se a pequena quantidade de grupos SH livres, pela presença da banda de cistina em detrimento da banda de SH livre (banda em  $2560\text{ cm}^{-1}$ ), indicando que a cisteína foi oxidada à cistina por meio de ligações SS. As estruturas secundárias encontradas foram  $\alpha$ -hélice ( $1648\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -folha ( $1623\text{-}1641\text{ cm}^{-1}$  e  $1674\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -volta ( $1662\text{-}1686\text{ cm}^{-1}$ ), e estruturas desordenadas ( $1642\text{-}1657\text{ cm}^{-1}$ ) (TATTINI JR; PARRA; PITOMBO, 2006; WANG; GUO; ZHU, 2016).

Muito embora tenham sido observadas pequenas diferenças químicas entre GVA e GVB, a microscopia eletrônica de varredura revelou que ambos os GV formaram rede de glúten uniforme e contínua com estruturas semelhantes, podendo ser utilizados na panificação. Porém, os tipos de interações moleculares que ocorrem entre as gliadinas e gluteninas de GVA ou GVB podem levar a diferenças nas propriedades viscoelásticas de suas redes quando hidratados e submetidos ao trabalho mecânico. Desta forma, os testes reológicos fundamentais e empíricos podem ser boas ferramentas para melhor entender as diferenças entre os glútenos vitais comerciais.

### 3.2. Reologia fundamental x reologia empírica

A formação da rede de glúten é crucial para muitos produtos da indústria de panificação, de um modo especial para os pães (LAGRAIN et al., 2008). As características deste produto, como volume do pão e maciez, são impactadas pela formação de uma rede viscoelástica contínua. Portanto, as características viscoelásticas do glúten são decisivas para garantir a qualidade do produto final. Com isso, o glúten vital (GV) se torna um ingrediente de destaque na indústria de panificação.

A suplementação da farinha de trigo com glúten vital tende a melhorar as propriedades viscoelásticas da massa, mas estas dependem de fatores como o tipo de proteína

que constitui o GV, como se dá a interação destas proteínas com as proteínas da farinha de trigo, o tipo de processo para obtenção da massa, e os ingredientes utilizados no processamento dos pães (MARCHETTI et al., 2012). Como anteriormente discutido, as propriedades viscoelásticas da rede de glúten dependem mais do equilíbrio na relação entre gliadinas e gluteninas (BEKES; GIANIBELLI; WRIGLEY, 2004; DELCOUR et al., 2012; WANG; JIN; XU, 2015), presentes tanto no GV como na farinha de trigo, do que de seus teores isolados. Isto, porque a rede de glúten formada na massa deve apresentar resistência frente ao trabalho mecânico e à extensão, mas também deve conseguir se estender sem romper diante da pressão exercida pelos gases formados na etapa de fermentação de pães e nas etapas iniciais do seu forneamento.

O módulo de energia de armazenamento ( $G'$ ) medido pelos testes reológicos fundamentais contribuiu com a avaliação das propriedades viscoelásticas da rede formada no Glutomatic (glúten úmido) a partir dos glúten vitais reconstituídos com amido de trigo (12% proteína) e das farinhas fortificadas com 5 e 7 g/100 g de GVA ou GVB, submetendo-as a diferentes taxas de deformação e variações de frequência e temperatura. Estas análises foram realizadas com água e com solução salina (2 g/ 100 mL de NaCl), para observar o comportamento da rede de glúten formada por GVA ou GVB sem e com a interferência do sal, que é comumente utilizado na indústria de panificação.

Através da varredura de deformação (taxa de deformação de 0,1 a 10 %) foi possível definir a zona linear para todas as amostras. Verificou-se também que GVA apresentou maior  $G'$  que GVB, indicando que a rede proteica formada por ele no glúten úmido e na massa, foi mais elástica que GVB, tanto na presença quanto na ausência de sal. Um fato interessante foi que os glúten úmidos preparados apenas com água apresentaram maior  $G'$  que aquelas preparadas com sal. O mesmo comportamento em relação ao módulo de elasticidade ( $G'$ ) entre água e sal foi observado para as varreduras de frequência e temperatura.

Pela varredura de frequência foi observado que a rede de glúten, no glúten úmido, apresentou  $G'$  dependente da frequência, onde  $G'$  aumentou com o aumento da frequência, resultando em redução da mobilidade das cadeias de proteínas dentro da rede de glúten formada. Além disso, os glúten úmidos de GVA e GVB (obtidos a partir de farinha reconstituída ou de farinha fortificada) também demonstraram que a rede de glúten de todas

as amostras exibiu dependência da lei de potência na frequência, que é característica das redes poliméricas no ponto de gel (NG; MCKINLEY, 2008; NG; MCKINLEY; EWOLDT, 2011; TANNER; QI; DAI, 2008; UTHAYAKUMARAN et al., 2014). Novamente, GVA mostrou maior  $G'$  que GVB, tanto na avaliação do glúten úmido obtido de farinhas reconstituídas, como de farinhas fortificadas.

Na varredura de temperatura, foram observadas em quais temperaturas ocorrem alterações na estrutura das proteínas que constituem os GV. A mesma tendência foi encontrada para GVA e GVB; GVA mostrou maior  $G'$  que GVB para os glúten úmidos, e as alterações estruturais ocorreram em dois estágios diferentes: o primeiro em temperatura próxima a 35 °C, que se estendeu até aproximadamente 60 °C, indicando que parte das proteínas que constituem o GV apresenta alteração estrutural dentro desta faixa pelo aumento da porção viscosa ( $G''$ ) em detrimento da porção elástica ( $G'$ ) da rede; e o segundo em temperatura próxima a 80 °C, onde ocorreu alteração estrutural mais pronunciada, observada pelo aumento do módulo de elasticidade da rede de glúten. Estes resultados estão de acordo com a literatura (LEON; ROSELL; BENEDITO DE BARBER, 2003), que apresenta temperaturas de desnaturação para gliadinas de 58 °C e para gluteninas de 80 °C.

Nos testes fundamentais, GVA apresentou maior  $G'$  que GVB, assim como as amostras preparadas com água apresentaram maior  $G'$  que as amostras preparadas com sal. Por outro lado, quando as farinhas de trigo fortificadas com 5 e 7 g/100 g de GVA ou GVB foram submetidas ao teste de extensografia usando água ou sal (2 g/100 mL de NaCl), foram verificados resultados opostos aos testes reológicos fundamentais.

Utilizando a extensografia, como teste reológico empírico, observou-se que as massas elaboradas com a adição de sal apresentaram melhores características de resistência à extensão que aquelas preparadas com água. O sal (2 g/100 mL de NaCl) atuou como agente reforçador da rede de glúten, reduzindo a repulsão eletrostática existente entre as cadeias proteicas, fortalecendo a rede pelo alinhamento e aproximação das cadeias de gliadinas e gluteninas (ANGIOLONI; DALLA ROSA, 2005; FU; SAPIRSTEIN; BUSHUK, 1996; SIMSEK; MARTINEZ, 2015), possibilitando que novas interações químicas ocorram entre elas.

Os resultados opostos encontrados entre os testes reológicos fundamentais e empíricos ocorreram, possivelmente, pelas diferenças no preparo das amostras (o Glutomatic

foi usado para preparar o glúten úmido para ser avaliado no reômetro, tanto a partir de farinha reconstituída, como de farinha fortificada, enquanto o farinógrafo foi utilizado para preparar a massa para ser avaliada no extensógrafo), e pelo tipo e magnitude das forças aplicadas sobre as amostras nos diferentes testes reológicos. Em testes reológicos empíricos, ocorrem predominantemente forças de tração (DOBRA SZCZYK, 2004), a exemplo da extensão da massa que ocorre durante a medida de resistência e resistência máxima na extensografia (UTHAYAKUMARAN et al., 2014); nos testes reológicos fundamentais, há predominância das forças de cisalhamento (VAN DER ZALM; VAN DER GOOT; BOOM, 2011), podendo perceber-se que a rede de glúten, quando elaborada com sal, respondeu melhor às forças de tração do que às forças de cisalhamento. Já as diferenças observadas entre os glútenes avaliados por testes reológicos fundamentais e empírico estão relacionadas, provavelmente, à constituição de suas proteínas.

Quando observado o efeito da adição de GV à farinha de trigo na extensografia, percebeu-se melhoria das características viscoelásticas da massa para a produção de pães, com aumento da resistência à extensão ( $R$ ) e da resistência máxima ( $R_{max}$ ), e da relação entre resistência e extensibilidade ( $R/E$ ), comparadas com as massas produzidas com farinha de trigo controle (FTC). A extensibilidade aumentou para as massas com fortificação de GV quando avaliadas com água, e permaneceu igual à massa controle quando avaliadas na presença de sal. O aumento da resistência da massa, com consequente aumento da área da curva, ocorreu pela suplementação de proteínas com funcionalidade, especificamente gliadinas e gluteninas, com redução proporcional da quantidade de amido e outros componentes da farinha de trigo.

### 3.3. Características tecnológicas das massas e dos pães elaborados com fortificação da farinha de trigo com glúten vital

O uso de glúten vital (GV) pela indústria de panificação é uma boa alternativa para correções de farinhas, pela suplementação com proteínas do glúten, contribuindo para melhorar as características viscoelásticas das massas. O GV é um ingrediente que não apresenta restrições em relação à quantidade a ser utilizada; seu uso é restrito apenas para aquelas pessoas que são intolerantes ou alérgicas ao glúten. Para verificar a qualidade do

glúten vital, a fortificação de farinha de trigo com GV é a primeira alternativa usada pelas indústrias de panificação e moinhos; desta forma, são desenvolvidos testes reológicos empíricos e testes de panificação (WADHAWAN; BUSHUK, 1989). Isso porque a descrição do produto não contempla dados sobre a sua qualidade tecnológica, com exceção da capacidade de absorção de água, e os GV comercialmente disponíveis apresentam comportamentos tecnológicos diferentes entre si.

A análise da composição química da farinha de trigo controle (FTC) e da FTC fortificada com 5 e 7 g/100 g de GVA ou GVB apresentou semelhança entre as amostras, com exceção do teor de proteínas que, como esperado, aumentou para as farinhas fortificadas, proporcionalmente ao aumento do nível de fortificação. Quando avaliados os teores de glúten úmido e seco através do Glutomatic, foi possível observar um aumento nesses teores em comparação à FTC, especialmente, porque houve redução dos compostos solúveis e do amido na composição das farinhas fortificadas. Por outro lado, quando o índice de glúten (IG) foi avaliado, observou-se redução do IG das farinhas fortificadas em comparação à FTC. No entanto, foi possível verificar as diferenças na viscoelasticidade entre GVA e GVB, porque as farinhas adicionadas de GVA apresentaram maior IG que as farinhas com GVB, indicando que GVA apresentou glúten com maior elasticidade que GVB. A determinação do IG confirmou os dados obtidos pela reologia fundamental, onde GVA apresentou maior  $G'$  que GVB.

Pela farinografia, observou-se aumento da absorção de água para as farinhas adicionadas de GVA e GVB, pois as proteínas, em maior quantidade nessas amostras, são as principais responsáveis pelo aumento de absorção de água da mescla, já que absorvem de 2,7 a 3 vezes o seu peso em água (HOSENEY 1998). Avaliando os demais parâmetros, observou-se que as farinhas fortificadas com GVA (5 e 7 g/100 g) apresentaram maior tempo de desenvolvimento da massa (TD) e estabilidade da massa frente à mistura (EST) que FTC e aquelas fortificadas com GVB (5 e 7 g/100 g). Já as farinhas com adição de GVB apresentaram maior índice de tolerância à mistura (ITM), quando comparadas à FTC e às farinhas adicionadas de GVA (5 e 7 g/100 g), resultando em massas que não suportam longos períodos de mistura.

Os parâmetros alveográficos mostraram que a adição de GV à farinha de trigo melhorou as características de elasticidade (P), extensibilidade (L) e força do glúten (W),

tanto para GVA quanto para GVB, nos dois níveis analisados, quando comparados à FTC. Isso indica que, independente da qualidade das proteínas, o GV pode contribuir com as propriedades viscoelásticas das massas. Porém, o teste de alveografia, que é utilizado como medida de classificação de grãos e farinhas de trigo no Brasil (BRASIL, 2010), não foi capaz de distinguir as diferenças entre os glúten vitais comerciais usados para a fortificação de FTC neste trabalho.

Um novo instrumento para avaliação da qualidade de farinha de trigo, e também de glúten vital, que vem sendo utilizado recentemente é o Mixolab (Chopin). Este equipamento é capaz de medir as propriedades de mistura da massa e o comportamento da pasta de amido durante o aquecimento (CODINA et al., 2010; DHAKA; GULIA; KHATKAR, 2012; ROSELL; SANTOS; COLLAR, 2010). O Mixolab consegue abranger as propriedades das proteínas e do amido da farinha, com um tempo relativamente curto (45 minutos) e pequena quantidade de amostra (CHOPIN, 2012). Por este teste foi possível verificar que a adição de 5 g/100 g de GV, que é o nível comumente utilizado na indústria de panificação no Brasil, mostrou diferenças entre os glúten avaliados, indicando que as melhores propriedades viscoelásticas da rede de glúten ocorreram quando GVA foi adicionado à FTC.

Ao nível de 7 g/100 g de fortificação, comparado à FTC, foram observados aumento na absorção de água (ABS) e tempo de desenvolvimento da massa (TD), e redução nos parâmetros de C3 (viscosidade máxima, aumento da temperatura até 95 °C), C4 (quebra - redução da viscosidade, temperatura constante a 95 °C) e C5 (retrogradação - viscosidade final, redução da temperatura até 50 °C) para ambos os glúten. Estes resultados podem estar relacionados ao aumento de proteínas responsáveis pela formação da rede de glúten, e também à redução da quantidade de amido na mescla de farinha e glúten, refletindo em alterações dos parâmetros tecnológicos avaliados quando comparados à FTC. Para Barak; Mudgil; Khatkar (2013), farinhas com grandes quantidades de proteínas, em especial, aquelas com boa relação entre gliadinas e gluteninas, apresentam menor quebra e menor viscosidade final.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos para determinar as características reológicas das massas (ABANG ZAIDEL et al., 2008; DOBRASZCZYK; MORGENSTERN, 2003; JANSSEN; VLIET; VEREIJKEN, 1996; KHATKAR et al., 2002; SCHMIELE et al.,

2012; UTHAYAKUMARAN et al., 2002) e do glúten (JANSSEN; VAN VLIET; VEREIJKEN, 1996a; KHATKAR et al., 2002; SONG; ZHENG, 2008; TRONSMO et al., 2003; WIESER; KIEFFER, 2001), e suas propriedades afetam a qualidade do produto final, como o volume do pão (DOBRASZCZYK; SALMANOWICZ, 2008; JANSSEN; VAN VLIET; VEREIJKEN, 1996b; TRONSMO et al., 2003) e a textura (UTHAYAKUMARAN et al., 2002).

Os pães elaborados com farinha de trigo fortificada com GV foram avaliados no dia de produção, e também durante sua vida de prateleira de nove dias, em ambiente com temperatura controlada ( $\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Um dos principais parâmetros de qualidade dos pães avaliado foi o volume específico (VE), pois o volume pode afetar diretamente o aspecto visual do pão (na hora da compra), além das características de aparência, cor e maciez do miolo. Neste trabalho, apenas o pão elaborado com 7 g/100 g de GVA apresentou volume específico maior que os demais pães obtidos pela fortificação de farinha de trigo com GVA (5 g/100 g) ou GVB (5 e 7 g/100 g) e FTC, e alcançou valor de 4,13 mL/g. Os demais pães não apresentaram diferenças significativas entre si. Possivelmente, o maior VE alcançado no pão com 7 g/100 g de GVA ocorreu pela melhor qualidade das proteínas deste GV, que apresentou valores consideráveis de gliadinas e gluteninas, contribuindo para a formação de uma rede que suportou maior quantidade de gases formados na fermentação e nos estágios iniciais do forneamento.

Com relação às análises de cor do miolo, teor de umidade do miolo e da casca, e atividade de água do miolo e da casca, os pães obtidos com GVA e GVB apresentaram pequenas diferenças entre si, e também quando comparados ao pão controle. A análise de cor do miolo mostrou que os pães com adição de 5 e 7 g/100 g de GVA apresentaram-se mais claros que o pão elaborado com FTC e aqueles elaborados com 5 e 7 g/100 g de GVB. Isto provavelmente ocorreu porque os pães com GVA apresentaram estrutura do miolo mais uniforme, além do pão com 7 g/100 g de GVA apresentar maior volume. Além disso, a cor dos pães foi afetada pela cor dos glúten vitais em pó. Com isso, os pães com GVA (5 e 7 g/100 g) apresentaram-se com tonalidade mais amarelada que o pão elaborado com 5 g/100 g de GVB, e não diferiram com relação à cor dos pães produzidos com FTC e 7 g/100 g de GVB. Os teores de umidade e atividade de água do miolo e da casca não apresentaram

grandes diferenças entre as amostras, por isso não representaram resultados interessantes para avaliar a diferença entre os glúten vitais comerciais avaliados neste trabalho.

A firmeza de pães é medida como a força necessária para ocasionar deformação ou rompimento da amostra e pode ser correlacionada com a mastigação humana. A força máxima avaliada para produtos panificados depende da formulação (qualidade da farinha, quantidade de açúcares, gorduras, emulsificantes, enzimas, adição de glúten e melhoradores de farinha), umidade da massa e conservação (tempo de fabricação do produto e embalagem) (ESTELLER; PITOMBO; LANNES, 2005; LUYTEN; PLIJTER; VLIET, 2004; ROUDAUT et al., 2002). Sendo assim, observou-se que os valores de firmeza dos pães no dia 9 foram maiores do que no dia 4, que por sua vez, foram maiores do que aqueles obtidos no primeiro dia, ou seja, a firmeza dos pães aumentou com o decorrer da vida de prateleira. Esse fato ocorre devido ao processo de retrogradação da amilopectina presente no pão e pela migração da água do miolo para a casca do pão, processo que ocorre durante a estocagem deste produto. Além disso, o pão da mescla com 7 g/100 g de GVA apresentou o menor valor de firmeza quando comparado às demais amostras dentro dos mesmos dias de avaliação. Isto aconteceu, pois GVA apresentou melhores características viscoelásticas, conforme resultados discutidos anteriormente, resultando em maior volume específico do pão (7 g/100 g de GVA), que contribuiu para a redução da firmeza do miolo.

A análise da estrutura dos miolos dos pães de forma obtidos de um processo de panificação convencional indica que as formulações contendo glúten vital não promoveram alterações com relação ao número, área e perímetro dos alvéolos, com exceção do pão elaborado com 5 g/100 g de GVA que apresentou o maior número de alvéolos, não diferindo apenas do pão com 7 g/100 g de GVB, e a menor área média dos alvéolos quando comparado aos demais. Isso significa que o pão com 5 g/100 g de GVA apresentou uma grande quantidade de alvéolos, mas com pequena abertura, portanto, uma estrutura mais fechada. Quando observamos o perímetro, apenas houve diferença significativa entre os pães com 7 g/100 g de GVA e 5 g/100 g de GVB, os demais apresentaram resultados semelhantes entre eles.

### 3.4. Testes simples para avaliar a qualidade tecnológica do glúten vital

Embora se saiba que a adição de glúten vital contribui para as características viscoelásticas das massas, e para o volume e textura de pães, a avaliação de sua qualidade ainda tem se restringido ao teste de panificação ou testes reológicos fundamentais e empíricos que demandam tempo, quantidade relativamente grande de amostra, equipamentos específicos e mão de obra qualificada para a execução e interpretação dos resultados. Nesse sentido, os testes simples se tornam uma alternativa para a redução de custo e tempo, e podem prever o comportamento de glúten vitais comerciais quando estes são utilizados na indústria de panificação.

A medida do teor de glúten úmido e seco do glúten vital em pó é importante, e pode ser facilmente realizada por lavagem manual, a qual não necessita de equipamentos específicos, ou pelo uso do equipamento Glutomatic. Essa medida serve para verificar a capacidade de absorção de água pelas proteínas, e também a quantidade de glúten que o GV pode formar. Esta pode ser uma análise interessante para detectar fraudes, quando são adicionadas outras proteínas vegetais ao produto, com o intuito de garantir/aumentar o teor mínimo de proteínas no GV que será comercializado.

A lavagem manual é facilmente executada, porém não apresenta muito controle, visto que a qualidade da rede de glúten formada depende, além de outros fatores, do tipo e magnitude da força aplicada no processo de mistura, assim como da temperatura da água para formar a massa e realizar a lavagem dos constituintes solúveis e amido, e do tempo de lavagem. Por outro lado, o uso do Glutomatic proporciona um método mais padronizado, com poucas variações entre as amostras testadas, além de possibilitar a avaliação da qualidade viscoelástica da rede de glúten extraída do GV, através da medida do índice de glúten (IG).

Nesse sentido, os teores de glúten úmido de GVA e GVB mostraram diferenças, tanto na medida por lavagem manual quanto pelo uso do Glutomatic. GVA apresentou maior capacidade de absorção de água que GVB, apresentando maior teor de glúten úmido em ambos os testes. Para o teor de glúten seco, pela lavagem manual observou-se diferença entre GVA e GVB, sendo o maior teor de glúten seco obtido para GVA, porém pelo uso do Glutomatic, este teor foi semelhante para os dois glúten. Ao analisar a qualidade do glúten pelo Glutomatic, verificaram-se resultados muito diferentes. Enquanto GVA apresentou IG de

58,28, GVB apresentou IG de 8,86. Este resultado confirma todos os outros que foram discutidos anteriormente, onde GVA mostrou formar uma rede de glúten com características mais elásticas que GVB, sendo consequência da constituição de suas proteínas.

Como os testes que avaliam os teores de glúten úmido e seco (lavagem manual ou Glutomatic) nem sempre fornecem respostas suficientes para entender a qualidade tecnológica do glúten vital, outros dois testes podem ser utilizados para garantir maiores informações sobre este produto: o teste de extensibilidade e o teste de expansão. Ambos utilizam o glúten úmido obtido pela lavagem do glúten.

O teste de extensibilidade desenvolvido neste trabalho (pela utilização de uma placa de madeira com marcações em centímetros que foi colocada a 2 metros de altura do solo), foi realizado em ambiente com condições de umidade relativa de ~85 % e temperatura de ~25 °C. Porém, algumas vezes, os moinhos e as indústrias de panificação (onde este teste pode ser utilizado de forma rápida) apresentam condições de temperatura e umidade muito altas ou muito baixas, dificultando a execução do teste. Desta forma, para o seu desenvolvimento nos ambientes fabris, recomenda-se o controle destas condições, garantindo a obtenção de resultados mais reprodutíveis. Embora simples, esta análise apresentou resultados interessantes, e que confirmaram os resultados já obtidos por análises instrumentais mais sofisticadas. A extensibilidade de GVA foi de 3,57 cm, e a de GVB foi de 11,40 cm, ratificando os resultados já encontrados, onde GVA foi mais elástico, e por isso não se estendeu muito pela ação da gravidade, e GVB foi mais extensível, com seu glúten estendendo-se ao longo da placa, pela ação da gravidade. Este resultado comprovou que um teste simples é capaz de fornecer respostas sobre a qualidade viscoelástica da rede de glúten formada pelo GV, e também melhorou o entendimento de como utilizar este produto na indústria de panificação.

Da mesma forma, o teste de expansão da bola de glúten também confirmou resultados obtidos de análises instrumentais para a avaliação da qualidade de GV. GVA expandiu-se mais durante o forneamento da bola de glúten que GVB. O resultado desta análise foi obtido pelo volume específico da bola forneada, e os valores encontrados foram de 20,81 mL/g para GVA e 12,77 mL/g para GVB, indicando que a rede formada por GVA consegue expandir-se mais sem a sua ruptura (ou seja, suporta maior pressão dos gases), mantendo a sua estrutura, que GVB, demonstrando o equilíbrio de suas propriedades de

extensibilidade e elasticidade (relação gliadina/glutenina). Muito embora, numericamente, o resultado obtido pelo teste de expansão tenha sido maior para GVA, não apenas o volume deve ser levado em consideração, mas também, a estrutura da bola após o forneamento. Desta forma, GVA apresentou maior volume, com uma estrutura fina, porém rígida, enquanto GVB apresentou menor volume, com uma estrutura fina, porém sensível ao toque, indicando a fragilidade da rede formada.

Todos estes testes simples podem ser facilmente utilizados por indústrias de panificação antes da realização de testes de panificação para verificar a qualidade do produto a ser adquirido, que influenciará a qualidade do produto final (pão).

### 3.5. Teste de correlação

O teste de correlação de Pearson foi utilizado para mostrar as relações existentes entre os testes simples de avaliação da qualidade viscoelástica do glúten vital e as características reológicas de massas e os parâmetros de qualidade de pães elaborados com farinha de trigo fortificada com 7 g/100 g de glúten vital. Verificaram-se as seguintes correlações significativas:

- (a) Índice de glúten do glúten úmido apresentou relações positivas com tempo de desenvolvimento ( $r = 0,98$ ) e estabilidade da massa ( $r = 0,99$ ), avaliadas pela farinografia; e relações negativas com o índice de tolerância à mistura ( $r = -0,93$ ), medida pela farinografia, e com a firmeza dos pães durante toda a sua vida de prateleira ( $r = -0,87$  para dia 1,  $r = -0,89$  para dia 4,  $r = -0,90$  para dia 9).
- (b) Extensibilidade do glúten mostrou-se diretamente proporcional ao índice de tolerância à mistura ( $r = 0,94$ ) medida pela farinografia e à firmeza dos pães durante toda a sua vida de prateleira ( $r = 0,89$  para dia 1,  $r = 0,94$  para dia 4,  $r = 0,91$  para dia 9); e inversamente proporcional ao tempo de desenvolvimento ( $r = 1,00$ ) e estabilidade da massa ( $r = 1,00$ ), medidos pela farinografia.
- (c) Volume específico da bola de glúten não apresentou coeficientes de correlação significativos com nenhum parâmetro de qualidade de massas e pães.

Os coeficientes correlação indicam que um glúten vital com maior índice de glúten (mais elástico) e menor extensibilidade, quando adicionado à farinha de trigo em

concentração de 7 g/100 g, foi capaz de melhorar as propriedades de mistura da massa, com maior tempo de desenvolvimento e maior estabilidade. Por outro lado, um glúten com grande extensibilidade, adicionado à farinha, produziu massa com menor estabilidade frente à mistura, levando ao enfraquecimento da sua rede quando submetida ao *overmixing*. Além disso, os pães elaborados com GV elástico apresentaram miolo mais macio, em comparação aos pães elaborados com farinha suplementada com glúten vital com maior extensibilidade.

A análise de correlação de Pearson mostrou que os testes de índice de glúten e de extensibilidade foram capazes de fornecer dados que apresentam relações com parâmetros farinográficos e com parâmetros de qualidade de pães. Desta forma, estes dois testes podem ser utilizados para prever o comportamento do glúten vital no processo de mistura, e como este produto pode afetar a qualidade dos pães de forma durante sua vida de prateleira. Em contrapartida, o teste de expansão da bola de glúten foi capaz de refletir a qualidade viscoelástica do glúten vital, pois foram observadas diferenças entre os glúten avaliados, porém não apresentou correlações significativas com parâmetros de qualidade de massas e pães, quando esse foi utilizado na fortificação da farinha de trigo.

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho foi desenvolvido para estudar as características físico-químicas das proteínas do glúten vital que influenciam a sua qualidade tecnológica, quando usado na panificação, pois apenas determinar o conteúdo proteico deste produto – como é feito atualmente para a sua comercialização - pode ser importante para classificar o produto de acordo com a legislação, mas não expressa a qualidade da proteína que o constitui. Pelos resultados encontrados, foram observadas diferenças entre os glúten vitais avaliados, comercializados no Brasil.

As características químicas que se mostraram diferentes entre os glúten foram a quantidade relativa de proteínas nas frações de gliadinas e gluteninas e os tipos de interações que podem estar envolvidas na formação da rede de glúten. As características tecnológicas revelaram diferenças associadas ao comportamento elástico da rede de glúten formada por eles, e também diferenças associadas aos parâmetros de qualidade das massas durante as etapas de mistura e descanso, e aos parâmetros de qualidade dos pães relacionados ao volume específico e à firmeza do miolo dos pães de forma.

A qualidade do glúten vital pode ser medida por diferentes testes, sendo que a maioria deles é complexa para sua execução e interpretação, por isso os testes simples, como os desenvolvidos nesta Tese, foram importantes para verificar a qualidade viscoelástica do produto comercializado e também, o efeito da adição de glúten vital na qualidade dos pães de forma, reduzindo custos e a necessidade de mão de obra qualificada para a execução de testes mais complexos e interpretação de seus resultados. As relações encontradas sugerem que os glúten vitais com características mais elásticas, medidas através do teste simples de extensibilidade e do índice de glúten, apresentam maior tempo de desenvolvimento da rede de glúten durante o desenvolvimento das massas, com maior estabilidade e menor índice de tolerância à mistura, além de menor firmeza do miolo dos pães.

Acreditamos que esta Tese pode contribuir para as indústrias de panificação e moinhos que necessitam compreender o papel do glúten vital na elaboração de produtos como os pães de forma, colaborando para o entendimento da complexidade do mecanismo de formação da rede de glúten.

## 5. REFERÊNCIAS GERAIS

- AACCI. American Association of Cereal Chemists International. **Approved methods**, 11th ed., St. Paul: AACCI. 2010.
- ABANG ZAIDEL, D. N. et al. Analysis and correlation studies on gluten quantity and quality during production. **Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1686–1694, 2009.
- ABANG ZAIDEL, D. N. et al. Rheological characterisation of gluten from extensibility measurement. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 549–556, jun. 2008.
- ABANG ZAIDEL, D. N.; CHIN, N. L.; YUSOF, Y. A. A review on rheological properties and measurements of dough and gluten. **Journal of Applied Sciences**, v. 10, n. 20, p. 2478–2490, 2010.
- ABITRIGO. **Associação Brasileira da Indústria do Trigo**. Estatísticas. 2016. Disponível em: < [http://abitrito.com.br/associados/arquivos/5.prod\\_trigo.pdf](http://abitrito.com.br/associados/arquivos/5.prod_trigo.pdf) >
- ANDERSON, R. A. et al. Pilot-plant studies on the continuous batter process to recover gluten from wheat flour. **Cereal Chemistry**, v. 37, p. 180–188, 1960.
- ANGIOLONI, A. et al. Small and large deformation tests for the evaluation of frozen dough viscoelastic behaviour. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 4, p. 527–531, 2008.
- ANGIOLONI, A.; DALLA ROSA, M. Dough thermo-mechanical properties: Influence of sodium chloride, mixing time and equipment. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 327–331, 2005.
- ARNTFIELD, S. D.; MURRAY, E. D. The Influence of Processing Parameters on Food Protein Functionality I. Differential Scanning Calorimetry as an Indicator of Protein Denaturation. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 289–294, jan. 1981.
- ATTENBURROW, G. et al. Rheological properties of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 1990.
- AUTRAN, J. Recent perspectives on the genetics , biochemistry and functionality of wheat proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. 11, p. 358–364, 1993.
- BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Influence of gliadin and glutenin fractions on rheological, pasting, and textural properties of dough. **International Journal of Food**

**Properties**, v. 17, n. January 2015, p. 1428–1438, 2014.

BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 211–217, abr. 2013.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica**, v. 1767, p. 1073–1101, 2007.

BECK, M.; JEKLE, M.; BECKER, T. Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast-leavened products. I. Rheological attributes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 585–592, 2012.

BECKWITH, A.; WALL, J. Reduction and reoxidation of wheat glutenin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.130, p. 155–162, 1966.

BEKES, F.; GIANIBELLI, M. C.; WRIGLEY, C. Grain Proteins and Flour Quality. **Australian Journal of Agricultural Research**, p. 416–423, 2004.

BELTON, P. S. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 203–211, 2005.

BELTON, P. S. On the Elasticity of Wheat Gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 29, n. 2, p. 103–107, 1999.

BENNION, B. J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. Track II, p. 5142–5147, 2003.

BERNARDES FILLHO, R.; OTSUKA, R.; COLNAGO, L. A. **Análise das estruturas secundárias das proteínas do glúten de trigo em estado sólido por FTIR**. São Carlos, São Paulo, Brasil: [s.n.]. Disponível em:

<[www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=CT24\\_98.pdf](http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php?file=CT24_98.pdf)>.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J.; NAKAI, S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 49–51, 1974.

BIETZ, J. A.; LOOKHART, G. L. Properties and non-food potential of gluten. **Cereal Foods World**, v. 41, n. 5, p. 377–382, 1996.

BIETZ, J. A.; SIMPSON, D. G. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: Available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. **Journal of Chromatography**, v. 624, n. 1–2, p. 53–80, 1992.

- BOCK, J. E.; DAMODARAN, S. Bran-induced changes in water structure and gluten conformation in model gluten studied by Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 146–155, 2013.
- BOLAND, M. et al. Global and U.S. wheat gluten industries: structure, competition, and trade. **Agricultural Marketing Policy Center**, n. 76, 2005.
- BOZKURT, F. et al. Distribution and location of ethanol soluble proteins (Osborne gliadin) as a function of mixing time in strong wheat flour dough using quantum dots as a labeling tool with confocal laser scanning microscopy. **Food Research International**, v. 66, p. 279–288, 2014.
- BRASIL. **Regulamento técnico do trigo**. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2010. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=01/12/2010&jornal=1&pagina=2&totalArquivos=136>>
- BRASIL. **Regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal**. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, 2005. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=371&data=23/09/2005>>
- CALLEJO, M. J. et al. Effect of gluten addition and storage time on white pan bread quality: instrumental evaluation. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung**, v. 208, n. 1, p. 27–32, 1999.
- CAUVAIN, S. **Technology of breadmaking**. Third edit ed. New York: Springer, 2015.
- CHAN, K. Y.; WASSERMAN, B. P. Direct Colorimetric Assay of Free Thiol-Groups and Disulfide Bonds in Suspensions of Solubilized and Particulate Cereal Proteins. **Cereal Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 22–26, 1993.
- CHANDI, G. K.; SEETHARAMAN, K. Optimization of Gluten Peak Tester: a Statistical Approach. **Journal of Food Quality**, v. 35, n. 1, p. 69–75, 20 fev. 2012.
- CHEN, C. et al. Optimising the Frying Temperature of Gluten Balls using Response Surface Methodology. **Science**, v. 64, n. Thompson 1982, p. 64–70, 1998.
- CHEN, J. SHENG et al. Effect of Gluten on Pasting Properties of Wheat Starch. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 12, p. 1836–1844, 2010.

- CHERIAN, G.; CHINACHOTI, P. H Nuclear Magnetic Resonance Mobility, and Glass Transition Behavior of Gluten. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. C, p. 312–317, 1997.
- CHIANG, A. **Protein-protein interaction of Soybean Protein from Extrusion Processing**. [s.l.] University of Missouri-Columbia, 2007.
- CHIANG, S. H.; CHEN, C. S.; CHANG, C. Y. Effect of wheat flour protein compositions on the quality of deep-fried gluten balls. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 666–673, 2006.
- CHITTUR, K.K. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. **Materials Engineering**, v.19, p.357-369. 1998.
- CHOPIN. **Mixolab applications handbook**. Rheological and enzyme analyses. Chopin Technologies, p.1-163, 2012.
- COCCHI, M. et al. Classification of bread wheat flours in different quality categories by a wavelet-based feature selection/classification algorithm on nir spectra. **Analytica Chimica Acta**, v.544, p.100–107. 2005.
- CODEX ALIMENTARIUS. **FAO / WHO Food standards programme Codex Alimentarius Comission**. Thirty first Session. Geneva , Switzerland, 30 June - 5 July 2008 , Bad Neuenahr-Ahrweiler , Germany.
- CODINA, G. G. et al. Mixolab versus alveograph and falling number. **Czech Journal Food Science**, v. 28, n. 3, p. 185–191, 2010.
- CUBADDA, R., CARCEA, M.; PASQUI, L. A. Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina. **Cereal Foods World**, v. 37, p.866–869, 1992.
- CZAJA, T.; MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantification of gluten in wheat flour by FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 211, p. 560–563, 2016.
- CZUCHAJOWSKA, Z.; PASZCZYNSKA, B. Is Wet Gluten Good for Baking ? **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 483–489, 1996.
- CZUCHAJOWSKA, Z.; POMERANZ, Y.; JEFFERS, H. C. Water activity and moisture content of dough and bread. **Cereal Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 128–132, 1989.
- DAHESH, M. et al. Spontaneous gelation of wheat gluten proteins in a food grade solvent. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 1–10, 2016.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4ªed. Porto Alegre: Artmed. p.179-342. 2010.

- DAY, L. et al. Wheat-gluten uses and industry needs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 2, p. 82–90, fev. 2006.
- DAY, L. Wheat gluten: production, properties and application. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P.A. **Handbook of Food Proteins**. Sawston: Woodhead Publishing, p.267–288. 2011.
- DEBET, M. R.; GIDLEY, M. J. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 452–465, 2006.
- DELCOUR, J. A et al. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. **Annual review of food science and technology**, v. 3, p. 469–92, jan. 2012.
- DHAKA, V.; GULIA, N.; KHATKAR, B. S. Application of Mixolab to Assess the Bread Making Quality of Wheat Varieties. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 3, p. 1–8, 2012.
- DOBRSZCZYK, B. .; MORGENSTERN, M. . Rheology and the breadmaking process. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 3, p. 229–245, nov. 2003.
- DOBRSZCZYK, B. J. The physics of baking: rheological and polymer molecular structure–function relationships in breadmaking. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 124, n. 1–3, p. 61–69, dez. 2004.
- DOBRSZCZYK, B. J.; ROBERTS, C. A. Strain hardening and dough gas cell-wall failure in biaxial extension. **Journal of Cereal Science**, v. 20, p. 265–274, 1994.
- DOBRSZCZYK, B. J.; SALMANOWICZ, B. P. Comparison of predictions of baking volume using large deformation rheological properties. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 292–301, 2008.
- DOMENEK, S. et al. Swelling behavior and structural characteristics of wheat gluten polypeptide films. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 1002–8, 2004.
- DON, C. et al. Glutenin macropolymer: a gel formed by glutenin particles. **Journal of Cereal Science**, v. 37, n. 1, p. 1–7, 2003b.
- DON, C. et al. The effect of mixing on glutenin particle properties: Aggregation factors that affect gluten function in dough. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 1, p. 69–83, 2005.
- DON, C. et al. Understanding the link between GMP and dough: From glutenin particles

in flour towards developed dough. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 2, p. 157–165, 2003.

DREESE, P.; FAUBION, J.; HOSENEY, R. C. Dynamic rheological properties of flour, gluten, and gluten-starch doughs. I. Temperature-dependent changes during heating. **Cereal Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 348–353, 1988.

DUA, S. et al. Effect of Extraction Methods and Wheat Cultivars on Gluten Functionality. **The Open Food Science Journal**, v. 3, n. 1, p. 84–92, 23 out. 2009.

EL HADDAD, L. et al. Erratum: Relationships between polymeric glutenin and the quality characteristics for seven common wheats (*Triticum aestivum*) grown in the field and greenhouse (Cereal Chemistry (Nov.-Dec. 1995) 72:6 (599)). **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 152, 1996.

ESTELLER, M. S.; LANNES, S. C. S. Parâmetros complementares para fixação de identidade e qualidade de produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25, 802-806, 2005.

ESTELLER, M. S.; PITOMBO, R. N. M.; LANNES, S. C. S. Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 1, p. 19–21, jan. 2005.

EWART, J. A. D. Amino acid analyses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 18, p. 176–183, 1967.

EWART, J. A. D. Cappelle-Desprez p-gliadin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 28, n. February, p. 849–851, 1977b.

EWART, J. A. D. Isolation of two  $\gamma$ -gliadins from Cappelle-Desprez. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 28, n. February, p. 843–848, 1977a.

FABIAN, H.; MÄNTELE, W. Infrared spectroscopy of proteins biochemical applications infrared spectroscopy of proteins. In: CHALMERS, J.M.; GRIFFITHS, P.R. **Handbook of vibrational spectroscopy**. Vol 1. Hoboken: Wiley. p.1-27. 2002.

FALCÃO-RODRIGUES, M. M.; MOLDÃO-MARTINS, M.; BEIRÃO-DA-COSTA, M. L. Thermal properties of gluten proteins of two soft wheat varieties. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 459–465, 2005.

FERNANDES, A. F. et al. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum* Lineu). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28,

p. 56–65, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, F. **What Is Gluten-Free ? FDA Has an AnswerConsumer Health Information**. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<[https://www.in.gov/isdh/files/Gluten\\_Free\\_Article\\_October\\_2013.pdf](https://www.in.gov/isdh/files/Gluten_Free_Article_October_2013.pdf)>.

FORATO, L. A. et al. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de ftir para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 146–150, 1997.

FORATO, L. A.; BERNARDES-FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy. **Analytical biochemistry**, v. 259, n. November, p. 136–141, 1998.

FREDERIX, S. .; COURTIN, C. .; DELCOUR, J. . Influence of process parameters on yield and composition of gluten fractions obtained in a laboratory scale dough batter procedure. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 1, p. 29–36, jan. 2004.

FU, B. X.; SAPIRSTEIN, H. D. Procedure for isolating monomeric proteins and polymeric glutenin of wheat flour. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 143–152, 1996.

FU, B.X.; SAPIRSTEIN, H.D.; BUSHUK, W. Salt-Induced Disaggregation/ Solubilization of Gliadin and Glutenin Proteins in Water. **Journal of Cereal Science**, v. 24, n. 3, p. 241–246, 1996.

GARIDEL, P.; SCHOTT, H. Fourier-Transform Midinfrared Spectroscopy for Analysis and Screening of Liquid Protein Formulations Part 2: Details Analysis and Applications. **BioProcess International**, v. 1, p. 48–55, 2006.

GIL-HUMANES, J. et al. Significant down-regulation of  $\gamma$ -gliadins has minor effect on gluten and starch properties of bread wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 161–170, set. 2012.

GOESAERT, H. et al. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 12–30, jan. 2005.

GÓMEZ, A. V. et al. Analysis of soluble proteins/aggregates derived from gluten-emulsifiers systems. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 62–68, 2012.

GUARIENTI, E.M. 1996. **Qualidade industrial de trigo**. 2nd ed. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT. p1-36.

- GUERRIERI, N. et al. Use of spectroscopic and fluorescence techniques to assess heat-induced molecular modifications of gluten. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 368–374, 1996.
- GUERRIERI, N.; CERLETTI, P. Effect of High-Temperature Short-Time Treatment of Wheat Flour on Gluten Vitality and Structure. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 6–9, 1996.
- GUPTA, R. B.; KHAN, K.; MACRITCHIE, F. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distributon of polymeric protein. **Journal of Cereal Science**, v. 18, p. 23–41, 1993.
- HADNA, M. et al. Empirical and fundamental rheological properties of wheat flour dough as affected by different climatic conditions. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, p.1381–1391, 2013.
- HAMER, R.J.; MACRITCHIE, F.; WEEGELS, P.L. Structure and functional properties of gluten. In: KHAN, K.; SHEWRY, P.R. **Wheat: chemistry and technology**. St. Paul: AACC International. p 153–178. 2009.
- HAMER, R.J.; VAN VLIET, T. Understanding the structure and properties of gluten: an overview. In: SHEWRY, P.R.; TATHAM, A.S. **Wheat gluten**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. p. 125–131. 2000.
- HAYTA, M.; SCHOFIELD, J. D. Heat and additive induced biochemical transitions in gluten from good and poor breadmaking quality wheats. **Journal of Cereal Science**, v. 40, p. 245–256, 2004.
- HESSER, J. M. World food uses of vital wheat gluten. In: APPLEWHITE, T. H. **Proccedings of the World Congress on vegetable protein utilization in human food and animal feedstuffs**. Urbana: The American Oil Chemists Society, p.117-122. 1989.
- HILL, J. J.; SHALAEV, E. Y.; ZOGRIFI, G. The Importance of Individual Protein Molecule Dynamics in Developing and Assessing Solid State Protein Preparations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2605–2614, 2014.
- HOSENEY, R. C.; FINNEY, K. F.; POMERANZ, Y. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. VI. Gliadin-lipid-glutenin interaction in wheat gluten. **Cereal Chemistry**, 1970. Disponível em: <<http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/abstracts/1970/cc1970a22.asp>>

- HOSENEY, R.C. **Principles of cereal science and technology**. 2nd St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1998
- HUANG, W. et al. Effects of transglutaminase on the rheological and Mixolab thermomechanical characteristics of oat dough q. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 934–939, 2010.
- HUEQNER, F. R. et al. Disulfide bonds: key to wheat protein functionality. **Protein Crosslinking**, p. 1–15, 1977.
- IGNÁCIO, A. K. F. et al. Efeito da substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio em pão francês Effect of the substitution of sodium chloride by potassium chloride in French rolls. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, p. 1–11, 2013.
- JANSENS, K. J. A. et al. Effect of temperature, time and wheat gluten moisture content on wheat gluten network formation during thermomolding. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 3, p. 434–441, nov. 2011.
- JANSSEN, A. M.; VAN VLIET, T.; VEREIJKEN, J. M. Rheological behaviour of wheat glutens at small and large deformations. Comparisons of two glutens differing in breadmaking potential. **Journal of Cereal Science**, v. 23, p. 19–31, 1996b.
- JANSSEN, A. M.; VAN VLIET, T.; VEREIJKEN, J. M. Rheological Behaviour of Wheat Glutens at Small and Large Deformations. Effect of Gluten Composition. **Journal of Cereal Science**, v. 23, n. 1, p. 33–42, 1996a.
- JEANJEAN, M. F.; DAMIDAUX, R.; FEILLET, P. Effect of heat treatment on protein solubility and viscoelastic properties of wheat gluten. **Cereal Chemistry**, v. 57, p. 325–331, 1980.
- JEKLE, M.; BECKER, T. Wheat dough microstructure: The relation between visual structure and mechanical behavior. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. February 2014, p. 369–382, 2013.
- JOYE, I. J.; LAGRAIN, B.; DELCOUR, J. A. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking – A review. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 11–21, 2009.
- KAUR, A. et al. Diversity in grain, flour, dough and gluten properties amongst Indian wheat cultivars varying in high molecular weight subunits (HMW-GS). **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 63–72, ago. 2013.

KHATKAR, B. S. et al. Functional properties of wheat gliadins. II. Effects on dynamic rheological properties of wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 307–313, 2002.

KHATKAR, B. S.; BARAK, S.; MUDGIL, D. Effects of gliadin addition on the rheological, microscopic and thermal characteristics of wheat gluten. **International journal of biological macromolecules**, v. 53, p. 38–41, mar. 2013.

KHATKAR, B. S.; BELL, A. E.; SCHOFIELD, J. D. The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 22, n. 1, p. 29–44, jul. 1995.

KHATKAR, B. S.; BELL, A. E.; SCHOFIELD, J. D. The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 22, p.29–44, 1995.

KIEFFER, R. et al. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. **Journal of Cereal Science**, v.27, p. 53-60, 1998.

KIEFFER, R. et al. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. **Journal of Cereal Science**, v. 45, n. 3, p. 285–292, maio 2007.

KINSELLA, J. E.; HALE, M. L. Hydrophobic associations and gluten consistency: effect of specific anions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1054–1056, 1984.

KOEHLER, P.; KIEFFER, R.; WIESER, H. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten III. Studies on gluten films. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 1, p. 140–145, jan. 2010.

KONTOGIORGOS, V. Microstructure of hydrated gluten network. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2582–2586, nov. 2011.

KRULL, L. H.; WALL, J. S. Relationship of Amino Acid Composition and Wheat Protein Properties. **Bakers Digest**, v. 43, n. 4, p. 30–34, 1969.

KUKTAITE, R. et al. Structure and morphology of wheat gluten films: From polymeric protein aggregates toward superstructure arrangements. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1438–1448, 2011.

- LABUSCHAGNE, M. T.; AUCAMP, U. The use of size exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) for wheat quality prediction in South Africa. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 21, n. 1, p. 8–12, jan. 2004.
- LAGRAIN, B. et al. Mechanism of gliadin–glutenin cross-linking during hydrothermal treatment. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 753–760, mar. 2008.
- LAGRAIN, B.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. Impact of redox agents on the physico-chemistry of wheat gluten proteins during hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 44, n. 1, p. 49–53, jul. 2006.
- LARSSON, H.; ELIASSON, A. Phase separation of wheat flour dough studied by ultracentrifugation and stress relaxation. II. Influence of mixing time, ascorbic acid, and lipids. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 25–31, 1996.
- LEFEBVRE J, POPINEAU Y, CORNEC M. Viscoelastic properties of gluten proteins: Influence of prolamin composition and of temperature. In: **Gluten Proteins 1993**. Detmold: Association of Cereal Research, p.180-189. 1994.
- LEON, A.; ROSELL, C. M.; BENEDITO DE BARBER, C. A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 1, p. 13–16, 1 jul. 2003.
- LEON, A.; ROSELL, C. M.; BENEDITO DE BARBER, C. A differential scanning calorimetry study of wheat proteins. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 1, p. 13–16, 1 jul. 2003.
- LÉTANG, C.; PIAU, M.; VERDIER, C. Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. **Journal of Food Engineering**, v. 41, p. 121–132, 1999.
- LI, M.; LEE, T.-C. Effect of cysteine on the functional properties and microstructures of wheat flour extrudates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 846–853, 1998.
- LIU, K.; HSIEH, F. H. Protein-protein interactions during high-moisture extrusion for fibrous meat analogues and comparison of protein solubility methods using different solvent systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2681–2687, 2008.
- LOOKHART, G. L. et al. Comparison of high-molecular-weight subunits of glutenin and

baking performance of flours varying in bread-making quality. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 26, p. 301–306, 1993.

LUNDH, G.; MACRITCHIE, F. Size exclusion HPLC characterisation of gluten protein fractions varying in breadmaking potential. **Journal of Cereal Science**, v. 10, n. 3, p. 247–253, nov. 1989.

LUYTEN, H.; PLIJTER, J. J.; van VLIET, T. O. N. Crispy/crunchy crusts of cellular solid foods: a literature review with discussion. **Journal of Texture Studies**, 35, 445–492, 2004.

LYNCH, E. J. et al. Fundamental studies on the reduction of salt on dough and bread characteristics. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 885–891, 2009.

MACRITCHIE, F. Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking. **Journal of Cereal Science**, v. 6, n. 3, p. 259–268, nov. 1987.

MACRITCHIE, F. Wheat proteins: characterization and role in flour functionality. **Cereal Foods World**, v. 44, p.188-193, 1999.

MACRITCHIE, F. Requirements for a test to evaluate bread-making performance. **Journal of Cereal Science**, v. 59, n. 1, p. 1–2, 2014b.

MACRITCHIE, F. Theories of glutenin / dough systems. **Journal of Cereal Science**, v. 60, p. 733–735, 2014a.

MAJZOBI, M. .; ABEDI, E. Effects of pH changes on functional properties of native and acetylated wheat gluten. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 1219–1224, 2014.

MAMONE, G. et al. Characterization of wheat gliadin proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, p. 2859–2865, 2005.

MANINGAT, C. C.; BASSI, S. D. Wheat starch production. In TUMBLESON, M.; YANG, P.; ECKHOFF, S. **Proceedings of international starch technology conference**. Urbana: University of Illinois. p.26-40. 1999.

MANOI, K.; RIZVI, S. S. H. Physicochemical changes in whey protein concentrate texturized by reactive supercritical fluid extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 627–635, 2009.

MARCHETTI, L. et al. Effect of glutens of different quality on dough characteristics and

breadmaking performance. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 224–231, abr. 2012.

MARTELO, E. **Panificação: básico para padeiro**. Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial. Porto Alegre: SENAI. 95p., 1998.

MCCANN, T. H.; DAY, L. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 3, p. 444–452, 2013.

MEKURIA, B.; ADMASSU, S. Grain quality evaluation and characterization of vital gluten powder from bread wheat varieties grown in Arsi and Bale, Ethiopia. **European African Journal Science**, v.5, p.35–41, 2011.

MELANDER, W.; HORVÁTH, C. Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 183, p. 200–215, 1977.

MELNYK, J. P. et al. Using the Gluten Peak Tester as a tool to measure physical properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 3, p. 561–567, nov. 2012.

MICARD, V.; GUILBERT, S. Thermal behavior of native and hydrophobized wheat gluten , gliadin and glutenin-rich fractions by modulated DSC. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 229–236, 2000.

MILLER, K. A.; HOSENEY, R. C. Dynamic rheological properties of wheat starch-gluten doughs. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 105–109, 1999.

MIRSAEEDGHAZI, H.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, S. M. A. Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 10, n. 1, p. 112–119, 2008.

MOHAMED, A. et al. Thermal and mechanical properties of compression-molded pMDI-reinforced PCL/gluten composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 2778–2790, 2010.

MONTENEGRO, F. M. **Avaliação do desempenho tecnológico de misturas de farinhas de tritcale e trigo em produtos de panificação**, 94p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

- MOREIRA, R.; CHENLO, F.; TORRES, M. D. Rheology of gluten-free doughs from blends of chestnut and rice flours. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 6, p. 1476–1485, 2013.
- NG, T. S. K.; MCKINLEY, G. H. Power law gels at finite strains: The nonlinear rheology of gluten gels. **Journal of Rheology**, v. 52, n. 2, p. 417–449, 2008.
- NG, T. S. K.; MCKINLEY, G. H.; EWOLDT, R. H. Large amplitude oscillatory shear flow of gluten dough: A model power-law gel. **Journal of Rheology**, v. 55, n. 3, p. 627, 2011.
- NG, T. S. K.; MCKINLEY, G. H.; PADMANABHAN, M. Linear to non-linear rheology of wheat flour dough linear to non-linear rheology of wheat flour dough. **International Symposium on Food Rheology and Structure**, n. 6, p.1-9, 2006.
- OIKONOMOU, N. A. et al. Gluten Index for Wheat products : main variables in affecting the value and nonlinear regression model. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. September, p. 1–11, 2015.
- OLIVEIRA, D. S. et al. Effect of a thermoascus aurantiacus thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. **Food Chemistry**, v. 143, p. 139–146, 2014.
- OLIVEIRA, L. C.; ROSELL, C. M.; STEEL, C. J. Original article Effect of the addition of whole-grain wheat flour and of extrusion process parameters on dietary fibre content , starch transformation and mechanical properties of a ready-to-eat breakfast cereal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1504–1514, 2015.
- ORTOLAN, F. et al. **Correlations between vital wheat gluten protein fractions, gluten index and specific volume obtained from a gluten expansion test**. AACC International Annual Meeting. **Anais...**Providence, Rhode Island, USA: 2014 Annual Meeting Abastract, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/hae.12083>>
- ORTOLAN, F. et al. Rheological properties of vital wheat glutens with water or sodium chloride. **LWT - Food Science and Technology**, v.79, p. 647-654.
- OSBORNE, T. B. The Proteins of the Wheat Kernel. **Science**, v. 26, n. 677, p. 865–865, 1907.
- PAYNE, P. I. et al. Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 304, p. 359–371, 1984.

PEÑA, E. et al. Do tyrosine crosslinks contribute to the formation of the gluten network in common wheat (*Triticum Aestivum* L.) dough?" **Journal of Cereal Science**, v.44, p.144–153, 2006.

PIZZINATTO, A. **Qualidade da farinha de trigo: conceitos, fatores determinantes, parâmetros de avaliação e controle**. Campinas: ITAL. p1-62. 1997.

PRESTON, K. R. Effects of neutral salts of the lyotropic series on the physical dough properties of a Canadian Red Spring Wheat flour. **Cereal Chemistry**, v. 66, p. 144–148, 1989.

PYLER, E.J. **Baking Science and Technology**, 3rd Ed. Kansas City: Sosland Publishing Company, p.357–377. 1988.

RAKITA, S. D. S. et al. Determination of free sulphydryl groups in wheat gluten under the influence of different time and temperature of incubation: Method validation. **Food Chemistry**, v. 150, p. 166–173, 2014.

RAKITA, S. D. S. et al. Determination of free sulphydryl groups in wheat gluten under the influence of different time and temperature of incubation: Method validation. **Food Chemistry**, v. 150, p. 166–173, 2014.

RASHEED, F. et al. Structural architecture and solubility of native and modified gliadin and glutenin proteins: non-crystalline molecular and atomic organization. **RSC Adv.**, v. 4, n. 4, p. 2051–2060, 2014.

ROBERTSON, G. H. et al. Modification of vital wheat gluten with phosphoric acid to produce high free swelling capacity. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 1–11, 2013.

ROBERTSON, G. H.; CAO, T. K.; ONG, I. Wheat gluten swelling and partial solubility with potential impact on starch-from-gluten separation by ethanol washing. **Cereal Chemistry**, v. 76, n. C, p. 843–845, 1999.

ROBERTSON, G. H.; CAO, T. K.; ORTS, W. O. Effect on dough functional properties of partial fractionation, redistribution, and in situ deposition of wheat flour gluten proteins exposed to water, ethanol, and aqueous ethanol. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 599–606, 2008.

- ROSELL, C. M.; COLLAR, C.; HAROS, M. Assessment of hydrocolloid effects on the thermo-mechanical properties of wheat using the Mixolab. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 3, p. 452–462, 2007.
- ROSELL, C. M.; SANTOS, E. Impact of fibers on physical characteristics of fresh and staled bake off bread. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 2, p. 273–281, 2010.
- ROSELL, C. M.; SANTOS, E.; COLLAR, C. Physical characterization of fiber-enriched bread doughs by dual mixing and temperature constraint using the Mixolab. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 535–544, 2010.
- ROUDAUT, G. et al. Crispness : a critical review on sensory and material science approaches. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 217–227, 2002.
- ROUSSEL, P.; CHIRON, H. **Le pains Français, évolution, qualité, production**. 2<sup>ème</sup> édition. Conflandey: MAÉ-ERTI Editeurs. p.1-433. 2005.
- SALVADOR, A.; SANZ, T.; FISZMAN, S. M. Dynamic rheological characteristics of wheat flour-water doughs. Effect of adding NaCl, sucrose and yeast. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 6, p. 780–786, 2006.
- SAYASLAN, A. Wet-milling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 499–515, ago. 2004.
- SAYASLAN, A.; SEIB, P. A.; CHUNG, O. K. Wet-milling properties of waxy wheat flours by two laboratory methods. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 167–178, 2006.
- SCANLON, M. G.; ZGHAL, M. C. Bread properties and crumb structure. **Food Research International**, v. 34, n. 10, p. 841–864, 2001.
- SCHIEDT, B. et al. Short- and Long-Range Interactions Governing the Viscoelastic Properties during Wheat Dough and Model Dough Development. **Journal of Texture Studies**, v. 44, n. 4, p. 317–332, 17 ago. 2013.
- SCHLUENTZ, E. J.; STEFFE, J. F.; NG, P. K. W. Rheology and microstructure of wheat dough developed with controlled deformation. **Journal of Texture Studies**, v. 31, p. 41–54, 2000.
- SCHMIELE, M. et al. Determinação da concentração de diferentes sistemas de solventes na solubilização de proteínas de análogo de carne. **Ciência Rural**, p. 1–6, 2013.
- SCHMIELE, M. et al. Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of pan bread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour.

**International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2141–2150, 2012.

SCHMIELE, M. **Interações físicas e químicas entre isolado protéico de soja e glúten vital durante a extrusão termoplástica a alta e baixa umidade para a obtenção de análogo de carne**. [s.l.] Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SCHOBER, T. J.; DOCKERY, P.; ARENDT, E. K. Model studies for wheat sourdough systems using gluten, lactate buffer and sodium chloride. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 3, p. 235–243, 2003.

SCHOFIELD, J. D. et al. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. **Journal of Cereal Science**, v. 1, p. 241–253, 1983.

SHEWRY, P. R. et al. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 357, n. 1418, p. 133–142, 2002.

SHEWRY, P. R. et al. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 433–441, 2001.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 947–58, abr. 2002.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 25, p. 207–227, 1997.

SIMSEK, S.; MARTINEZ, M. O. Quality of Dough and Bread Prepared with Sea Salt or Sodium Chloride. **Journal of Food Process Engineering**, p.1-9, 2015.

SINGH, H., & MACRITCHIE, F. Application of polymer science to properties of gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p. 231–243, 2001.

SINGH, H.; MACRITCHIE, F. Changes in proteins induced by heating gluten dispersions at high temperature. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 297–301, mar. 2004.

SINGH, N. K. et al. Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the

absence of reducing agents. **Cereal Chemistry**, v.67, n.2, p.150-161, 1990.

SINGH, N. K.; SHEPHERD, K. W.; CORNISH, G. B. A simplified SDS—PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. **Journal of Cereal Science**, v. 14, n. 3, p. 203–208, nov. 1991.

SINGH, S.; SINGH, N. Relationship of polymeric proteins and empirical dough rheology with dynamic rheology of dough and gluten from different wheat varieties. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 342–348, dez. 2013.

SINGH, S.; SINGH, N.; MACRITCHIE, F. Relationship of polymeric proteins with pasting, gel dynamic- and dough empirical-rheology in different Indian wheat varieties. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 19–24, jan. 2011.

SIVAM, A. S. et al. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. **Food Research International**, v. 50, p. 574–585, 2013.

SLUIMER, P. **Principles of breadmaking**. St. Paul: AACCI. p.1-212. 2005.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 3, p. 132–138, mar. 2007.

SONG, Y.; ZHENG, Q. Influence of gliadin removal on strain hardening of hydrated wheat gluten during equibiaxial extensional deformation. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 1, p. 58–67, jul. 2008.

STATHOPOULOS, C. E. et al. Effect of heat on rheology, surface hydrophobicity and molecular weight distribution of gluteins extracted from flours with different bread-making quality. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 134–143, mar. 2008.

TANNER, R. I.; QI, F.; DAI, S. C. Bread dough rheology and recoil. I. Rheology. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 148, n. 1–3, p. 33–40, 2008.

TATHAM, A. S.; DRAKE, A. F.; SHEWRY, P. R. A conformational study of a glutamine- and proline-rich cereal seed protein, C hordein. **The Biochemical journal**, v. 226, n. 2, p. 557–62, 1985.

TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 2, p. 79–99, 2012.

TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. D. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da

albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 127–136, 2006.

TEDRUS, G. D. A. S. et al. Estudo da adição de vital glúten à farinha de arroz, farinha de aveia e amido de trigo na qualidade de pães 1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 20–25, 2001.

THANATUKSORN, P. et al. Effects of ball-milling on the glass transition of wheat flour constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. December 2008, p. 430–435, 2009.

TILLEY, K.A. et al. Tyrosine cross-links : molecular basis of gluten structure and function. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.2627–2632, 2001.

TOMIC, J. et al. Changes in the content of free sulphydryl groups during postharvest wheat and flour maturation and their influence on technological quality. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 3, p. 495–501, 2013.

TRONSMO, K. M. et al. A Study of how Size Distribution of Gluten Proteins, Surface Properties of Gluten and Dough Mixing Properties Relate to Baking Properties of Wheat Flours. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 201–214, 2002.

TRONSMO, K. M. et al. Relationships between gluten rheological properties and hearth loaf characteristics. **Cereal Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 575–586, 2003.

TUHUMURY, H. C. D.; SMALL, D. M.; DAY, L. The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 1, p. 229–237, 2014.

ULLSTEN, N.H. et al. Properties of extruded vital wheat gluten sheets with sodium hydroxide and salicylic acid. **Biomacromolecules**, v.10, p.479–488, 2009.

UMBACH, S. L.; DAVIS, E. A.; GORDON, J. <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of conventional and microwave heated vital wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 28, n. 3, p. 233–242, nov. 1998.

UTHAYAKUMARAN, S. et al. Effects of gliadin fractions on functional properties of wheat dough depending on molecular size and hydrophobicity. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 138–141, 2001.

UTHAYAKUMARAN, S. et al. Relationships between traditional and fundamental dough-testing methods. **Cereal Research Communications**, v. 42, n. 2, p. 282–292,

2014.

UTHAYAKUMARAN, S. et al. Small and large strain rheology of wheat gluten. **Rheologica Acta**, v. 41, n. 1–2, p. 162–172, 2002.

VAN DEN BROECK, H. C. et al. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 877, n. 10, p. 975–82, 1 abr. 2009.

VAN DER BORGHT, A. et al. Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 221–237, 2005.

VAN DER ZALM, E. E. J.; VAN DER GOOT, A. J.; BOOM, R. M. Quality of shear fractionated wheat gluten – Comparison to commercial vital wheat gluten. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 2, p. 154–159, mar. 2011.

VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 42, n. February 2014, p. 179–208, 2002.

VOJNOVICH, C. et al. Vital wheat gluten by drum drying. **Cereal Chemistry**, v. 37, p. 422–435, 1960.

WADHAWAN, C. K.; BUSHUK, W. Studies on vitality of commercial gluten. I. Physical, chemical and technological characteristics. **Cereal Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 456–461, 1989a.

WADHAWAN, C. K.; BUSHUK, W. Studies on vitality of commercial gluten. II. Solubility fractionation, electrophoresis, and fluorescence results. **Cereal Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 461–466, 1989b.

WALL, J. S. Disulfide bonds: determination, location, and influence on molecular properties of proteins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 19, n. 4, p. 619–625, 1971.

WANG, C.; DAMODARAN, S. Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 5, p. 1158–1164, 1990.

- WANG, K.-Q. et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation. **Food Chemistry**, v. 214, p. 393–399, 2017.
- WANG, P. et al. Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 187–194, 2014.
- WANG, P.; JIN, Z.; XU, X. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage – A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 189–198, 2015.
- WANG, X. Y.; GUO, X. N.; ZHU, K. X. Polymerization of wheat gluten and the changes of glutenin macropolymer (GMP) during the production of Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 201, p. 275–283, 2016.
- WEEGELS, P. L. et al. Depolymerisation and Re-polymerisation of Wheat Glutenin During Dough Processing . I . Relationships between Glutenin Macropolymer Content and Quality Parameters. **Journal of Cereal Science**, v. 23, p. 103–111, 1996.
- WEEGELS, P. L. et al. Effects on gluten of heating at different moisture contents. II. Changes in physico-chemical properties and secondary structure. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 39–47, 1994a.
- WEEGELS, P. L. et al. Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 31–38, 1994b.
- WEEGELS, P. L.; MARSEILLE, J. P.; HAMER, R. J. Small Scale Separation. **Starch**, v. 40, n. 9, p. 342–346, 1988.
- WELLNER, N. et al. Changes in Protein Secondary Structure during Gluten Deformation Studied by Dynamic Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 255–261, 2005.
- WELLNER, N. et al. Selected hofmeister anions on the secondary structure and dynamics of wheat prolamins in gluten. **Cereal Chemistry**, v. 80, p.596-600. 2003.
- WESOŁOWSKA-TROJANOWSKA, M. et al. Rheological properties of gluten obtained from polish wheat cultivars. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 20, n. 5, p. 1221–1226, 2014.
- WHITE, J. A; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of automatic chemistry**, v. 8, n.

4, p. 170–7, jan. 1986.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115–9, abr. 2007.

WIESER, H. Investigations on the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung**, v. 207, p. 128–132, 1998.

WIESER, H.; KIEFFER, R. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. **Journal of Cereal Science**, v. 34, p. 19–27, 2001.

XU, J.; BIETZ, J. A.; CARRIERE, C. J. Viscoelastic properties of wheat gliadin and glutenin suspensions. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1025–1030, 2007.

ZHOU, Y. et al. Konjac glucomannan-induced changes in thiol/disulphide exchange and gluten conformation upon dough mixing. **Food chemistry**, v. 143, p. 163–169, 15 jan. 2014.

ZHU, J.; KHAN, K. Quantative variation of HMW glutenin subunits from hard red spring wheats grown in different environments. **Cereal Chemistry**, v.79, p.783-786, 2002.



## **ANEXOS**

## Anexo 1 - Autorização para uso do Artigo I

O Anexo 1 mostra a cópia do email do Editor Científico do Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety.

16/02/2017

E-mail de Instituto Federal Farroupilha - Request for the use of the manuscript - CRF3-2016-0008.R1



Fernanda Ortolan &lt;fernanda.ortolan@iffarroupilha.edu.br&gt;

---

### Request for the use of the manuscript - CRF3-2016-0008.R1

---

Fred Kroger &lt;kv7@psu.edu&gt;

10 de fevereiro de 2017 16:43

Para: Fernanda Ortolan &lt;fernanda.ortolan@iffarroupilha.edu.br&gt;, kv7@email.psu.edu, Caroline Steel &lt;carolinejsteel@gmail.com&gt;

Cc: Fred Kroger &lt;kv7@psu.edu&gt;

Dear Fernanda:

Yes, you may refer to the paper. However, until it has been given a proper journal citation (most likely in the May issue), the title must be followed by the notation "accepted on February 1st, 2017, for publication in CRFSFS."

Sincerely,

Manfred Kroger, Ph.D.

Scientific Editor, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety

Professor of Food Science Emeritus

---

**From:** Fernanda Ortolan <fernanda.ortolan@iffarroupilha.edu.br>
**Date:** Friday, February 10, 2017 at 11:45 AM**To:** <kv7@email.psu.edu>, Caroline Steel <carolinejsteel@gmail.com>**Subject:** Request for the use of the manuscript - CRF3-2016-0008.R1

[Texto das mensagens anteriores oculto]

## Anexo 2 - Autorização para uso do Artigo IV

O Anexo 2 mostra o Copyright da LWT – Food Science and Technology.

The image shows two screenshots of the Elsevier website. The top screenshot is the 'Copyright' page, which describes the rights related to the publication and distribution of research. It includes a navigation bar with links for 'Journal author rights', 'Government employees', 'Elsevier's rights', 'Protecting author rights', and 'Open access'. The bottom screenshot is the 'Personal use' page, which outlines the conditions under which authors can use their articles for non-commercial purposes.

**Copyright**

Describes the rights related to the publication and distribution of research. It governs how authors (as well as their employers or funders), publishers and the wider general public can use, publish and distribute articles or books.

[Journal author rights](#) [Government employees](#) [Elsevier's rights](#) [Protecting author rights](#) [Open access](#)

**Journal author rights**

In order for Elsevier to publish and disseminate research articles, we need publishing rights. This is determined by a publishing agreement between the author and Elsevier. This agreement deals with the transfer or license of the copyright to Elsevier and authors retain significant rights to use and share their own published articles. Elsevier supports the need for authors to share, disseminate and maximize the impact of their research and these rights, in Elsevier proprietary journals\* are defined below:

| For subscription articles                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | For open access articles                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Authors transfer copyright to the publisher as part of a journal publishing agreement, but have the right to:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Share their article for <a href="#">Personal Use</a>, <a href="#">Internal Institutional Use</a> and <a href="#">Scholarly Sharing</a> purposes, with a DOI link to the version of record on ScienceDirect (and with the Creative Commons <a href="#">CC-BY-NC-ND license</a> for author manuscript versions)</li> <li>Retain patent, trademark and other intellectual property rights (including research data).</li> <li>Proper attribution and credit for the published work.</li> </ul> | <p>Authors sign an exclusive license agreement, where authors have copyright but license exclusive rights in their article to the publisher**. In this case authors have the right to:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Share their article in the same ways permitted to third parties under the relevant user license (together with <a href="#">Personal Use</a> rights) so long as it contains a <a href="#">CrossMark logo</a>, the <a href="#">end user license</a>, and a DOI link to the version of record on ScienceDirect.</li> <li>Retain patent, trademark and other intellectual property rights (including research data).</li> <li>Proper attribution and credit for the published work.</li> </ul> |

\*Please note that society or third party owned journals may have different publishing agreements. Please see the journal's guide for authors for journal specific copyright information.

**Personal use**

Authors can use their articles, in full or in part, for a wide range of scholarly, non-commercial purposes as outlined below:

- Use by an author in the author's classroom teaching (including distribution of copies, paper or electronic)
- Distribution of copies (including through e-mail) to known research colleagues for their personal use (but not for Commercial Use)
- Inclusion in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- Use in a subsequent compilation of the author's works
- Extending the Article to book-length form
- Preparation of other derivative works (but not for Commercial Use)
- Otherwise using or re-using portions or excerpts in other works

These rights apply for all Elsevier authors who publish their article as either a subscription article or an open access article. In all cases we require that all Elsevier authors always include a full acknowledgement and, if appropriate, a link to the final published version hosted on Science Direct.