



GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA.

FACULTAD DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. CURSO 2017/2018

TRABAJO DE FIN DE GRADO:

“Modificación de harinas sin gluten de alto valor nutricional por tratamiento microondas. Efecto sobre las fracciones proteicas”

Autora: Silvia Manso Refoyo

Tutor: Francisco Javier Arias Vallejo

Tutor externo: Felicidad Ronda Balbás

ÍNDICE:

RESUMEN	5
ABSTRAT	6
1.INTRODUCCIÓN	7
a) <i>Trigo sarraceno:</i>	7
b) <i>Tef:</i>	8
c) <i>Quinoa:</i>	8
d) <i>Alpiste:</i>	9
e) <i>Arroz:</i>	9
<i>Modificación física de harinas mediante tratamientos hidrotérmicos asistidos con microondas</i>	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	11
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1. MATERIAL DE LABORATORIO	12
4.1.1. <i>Harinas.</i>	12
4.1.2. <i>Equipos, material fungible y reactivos (anexo I)</i>	12
4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	13
a) <i>Humidificación de harinas:</i>	13
b) <i>Tratamiento microondas:</i>	13
c) <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)</i>	14
d) <i>Fraccionamiento proteico de tef y trigo sarraceno:</i>	15
e) <i>Hidrólisis de proteínas y Cromatografía Líquida de Alta Resolución:</i>	17
f) <i>Análisis estadístico:</i>	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5.1. <i>Humedad de las harinas tratadas con microondas:</i>	18
5.2. <i>Modificación del fraccionamiento proteico de tef y trigo sarraceno:</i>	19

5.3. Optimización de variables para el análisis proteico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico:	20
5.4. Análisis de la composición proteica de los extractos crudos de harinas de tef, trigo sarraceno, alpiste, quinoa y arroz mediante SDS-PAGE:.....	22
5.5. Análisis de la composición del fraccionamiento proteico en las harinas de tef y trigo sarraceno:	25
5.6. Análisis estadístico de los resultados de aminoácidos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución:	30
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36
8. ANEXOS	39
ANEXO I (Equipos y material fungible).....	39
ANEXO II (Contenido de Aa totales y libres expresados en mg/g muestra) ..	40

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Composición química de las muestras de harina.	12
Tabla 2. Humedad de las harinas tras aplicar tratamiento microondas.	18
Tabla 3. Composición de aminoácidos libres (mg/ g base seca) en las harinas de arroz, quinoa, tef y trigo sarraceno, con y sin tratamiento microondas (+/-).....	31
Tabla 4. Composición de aminoácidos totales (mg/ g base seca) en las harinas de arroz, quinoa, tef y trigo sarraceno, con y sin tratamiento microondas.	32
Tabla 5. Determinación de interacción entre los efectos principales (harina y MW) mediante P-valor en la composición de aminoácidos.	34

ÍNDICE DE FIGURAS:

Esquema 1.	16
Fig. 1. Comparación de buffers.....	20
Fig. 2. Comparación de tiempos de ebullición en condiciones reductoras y no reductoras en el tef.	21
Fig. 3. Extracción proteica (2h o 72h) de TS al 1% con y sin MW y tef al 4% con y sin MW.....	22
Fig. 4. Análisis de alpiste, quinoa y arroz en condiciones reductoras.....	23
Fig. 5. Análisis de alpiste, quinoa y arroz en condiciones no reductoras.....	23
Fig. 6. Análisis de TS y tef con y sin MW. Gel al 12%.	24
Fig. 7. Análisis de TS y tef con y sin MW. Gel al 15%.	24
Fig. 8. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones reductoras. Gel del 12%.....	26
Fig. 9. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones no reductoras. Gel del 12%.....	27
Fig. 10. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones reductoras. Gel del 15%.....	28
Fig. 11. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones no reductoras. Gel del 15%.....	28
Fig. 12. Fraccionamiento proteico del trigo sarraceno con y sin MW, en condiciones reductoras.	29

Fig. 13. Fraccionamiento proteico del trigo sarraceno con y sin MW, en condiciones no reductoras.29

ABREVIATURAS EMPLEADAS:

TG2: Transglutaminasa tisular	ALB: Albúminas
HPMC: Hidroxi-Propil-Metil-Celulosa	GLB: Globulinas
TS: Trigo sarraceno	PRL: Prolaminas
TSP: Trigo sarraceno polaco	GLT: Glutelinas
BWG: Globulina soluble en sal	HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
AGI: Ácidos grasos insaturados	DTT: 1,4 - dithiothreitol
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	ANOVA: Análisis de varianza
TB387: Tef blanco variedad 387	ASX: ASP (ácido aspártico) + ASN (asparagina)
ANPU: Arroz de granulometría gruesa	GLX: GLU (ácido glutámico) + GLN (glutamina)
ALP: Alpiste	Aa: Aminoácidos
QUI: Quinoa	
PLB: Protein loading buffer	

RESUMEN

Las harinas de cereales o pseudocereales sin gluten se usan cada vez más en la industria alimentaria debido a su alto valor nutricional y a su buena composición proteica. El uso del tratamiento hidrotérmico mediante microondas, se emplea para modificar físicamente estas harinas y mejorar sus características sensoriales y organolépticas. Aunque hay muchos estudios realizados sobre la influencia del microondas en el almidón de las harinas, no hay estudios sobre cómo afecta este tratamiento a las proteínas. Debido a esto, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto hidrotérmico del microondas sobre el contenido proteico de las harinas de tef, trigo sarraceno, alpiste, quinoa y arroz.

Tras humedecer las harinas al 30% y aplicarles el tratamiento microondas durante 8 min, la composición proteica de las harinas se ha analizado mediante diferentes técnicas. En el caso del tef y el trigo sarraceno, se realizó un fraccionamiento proteico para extraer las 4 fracciones proteicas descritas por Osborne. Las fracciones proteicas obtenidas y los extractos crudos de las harinas, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, al igual que las otras harinas. Mediante este análisis se observaron pocas diferencias entre las bandas proteicas de las harinas con y sin tratamiento, excepto en el caso del tef, donde no se apreciaban bandas en la harina tratada. Tras la hidrólisis ácida de las harinas y mediante HPLC se determinó la concentración de aminoácidos totales y libres. Tras el análisis estadístico de los datos, apenas hubo diferencias significativas entre las harinas tratadas y sin tratar en los Aa totales, pero en el caso de los Aa libres el tratamiento si ejerce un efecto significativo sobre las harinas.

Palabras clave: tef, trigo sarraceno, harinas sin gluten, tratamiento microondas, análisis proteico.

ABSTRACT

The cereal flours and gluten free pseudo cereals are used often every time in the food industry due to their high nutritional value and their good protein composition. The use of the hydrothermal treatment through microwaves is often used to physically modify these flours and improve their sense and organoleptic characteristics. Even that there are many studies made about the influence of microwave on the starch from the flours, there is no evidence of studies made about the affection of this treatment into the proteins. Due to this, in the present work it has been studied the hydrothermal effect of microwaves over the protein content of the tef, buckwheat, canaryseed, quinoa and rice flours.

After moisten the flours to 30% and apply to them the microwave treatment during 8 minutes, the protein composition of the flours has been analyzed through different technics. In case of the tef and buckwheat, it has been made a protein fractionation to obtain the four protein fractionations described by Osborne. The protein fractionations obtained and the flour raw extracts had been analyzed through SDS PAGE, as well as with the other flours. Throughout this analysis it was observed little differences between the protein bands from the flours with, or without treatment, except in case of the tef, where there are no bands in the treated flour. After the acid hydrolysis of the flours and with HPLC it was established the concentration of total and free amino acids. In the end, after the statistical analysis of the data, there was barely significant differences between the treated and non-treated flours in the total amino acids, but in the case of free amino acids, this treatment does establish a significant effect over the flours

Key words: tef, buckwheat, gluten-free flours, microwave treatment, protein analysis

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca es un trastorno inflamatorio crónico del intestino delgado, inducido de forma autoinmune por la ingestión de gluten. El gluten no se digiere y se acumulan fragmentos ricos en prolamina y glutamina, que en la lámina propia activan linfocitos CD4+ específicos con restricción de HLA-DQ2. Estos generan citocinas proinflamatorias y anticuerpos, que modificados por la transglutaminasa tisular (TG2) transforman la mucosa (Arranz & Garrote, 2010).

La Comisión Europea (Comisi & Europeas, 2009), define el “gluten” como la fracción proteínica del trigo, centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, que no toleran algunas personas y es insoluble en agua y en 0.5M NaCl. Los productos con “contenido muy reducido de gluten” son aquellos que no superan los 100mg/kg y los “exentos de gluten”, son los que no superan los 20mg/kg.

La dieta sin gluten de por vida es el único tratamiento efectivo para los celíacos, ya que se evita ingerir las prolaminas (fracción insoluble) del gluten, que son las responsables de la toxicidad. En sustitución del trigo, los productos sin gluten emplean harina de arroz o maíz, o mezclas con almidones de estos cereales o de tubérculos, como la patata o la tapioca. La eliminación del gluten en panificación genera deficiencias organolépticas y funcionales, por lo que se emplean ingredientes que mimetizan la función viscoelástica del gluten, entre los que destacan los ingredientes proteicos, emulsionantes, y, fundamentalmente, hidrocoloides, destacando el Hidroxi-Propil-Metil-Celulosa (HPMC), (Molina-Rosell, 2013).

Debido a la gran demanda comercial de productos libres de gluten de calidad entre los celíacos y personas que siguen estos hábitos dietéticos, se están formulando productos con cereales sin gluten de alto valor nutricional.

En este trabajo se han empleado harinas sin gluten de alto contenido proteico, que cada vez tienen más renombre en el mercado por sus buenas características sensoriales y nutricionales.

a) Trigo sarraceno:

El trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench) o alforfón (TS), es un pseudocereal perteneciente a la familia Polygonaceae que tiene un corto periodo de crecimiento y una alta adaptabilidad. Es originario de Asia, pero Polonia es el primer productor de TS en la UE. Su grano tiene forma piramidal.

Sus semillas contienen: 10-12.7% de proteína, 65-75% de almidón, 2-2.5% de lípidos y 2-2.5% de minerales. Su contenido proteico tiene alto valor biológico y gran

disponibilidad. La globulina soluble en sal (BWG), es la principal fracción proteica de la semilla y es la proteína de almacenamiento, similar a la leguminosa. Tiene un bajo contenido en prolaminas y glutelinas. Tiene alto valor nutricional debido a que la proteína es rica en aminoácidos esenciales, en especial lisina (6mg/100g de proteína) y arginina. Es rico en polifenoles y una buena fuente de antioxidantes como la rutina (Choi & Ma, 2005, 2006).

A las proteínas de las semillas de TS se le han atribuido efectos beneficiosos sobre la salud (supresión de grasa corporal, inhibición de células carcinógenas...) y buena actividad hipocolesterolemica (Tomotake, Shimaoka, Kayashita, Nakajoh, & Kato, 2002). Todo ello hace que la harina de TS tenga un elevado valor nutricional y represente una alternativa interesante como ingrediente alimentario, para la elaboración de productos sin gluten.

b) Tef:

El cereal tropical Tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) es un cultivo básico anual en Etiopía, Eritrea, Djibouti, sudeste de Sudán y norte de Kenia. Es un cultivo nativo muy importante en la producción de la injera, un pan plano de masa fermentada. El tamaño del grano es muy pequeño con una longitud entre 0.61-1.17mm. Se adapta a diferentes condiciones ambientales y resiste a plagas durante el almacenamiento.

Según varios autores (Abebe, Collar, & Ronda, 2015; Adebawale, Emmambux, Beukes, & Taylor, 2011; Hager, Wolter, Jacob, Zannini, & Arendt, 2012) el tef tiene un elevado contenido proteico en comparación con otros cereales. La cantidad proteica varía entre un 9-13% dependiendo de la variedad. Las prolaminas, son las proteínas de almacenamiento del tef y la fracción proteica mayoritaria. Presenta un buen equilibrio de aminoácidos esenciales.

El grano de tef también es rico en hidratos de carbono complejos con almidón de digestión lenta, en ácidos grasos insaturados (AGI) y en ácido linoleico. Destaca su alto contenido en hierro, calcio, potasio, fosfato y magnesio; y también la cantidad de polifenoles. Tiene importantes propiedades nutricionales y beneficios para la salud (Zhu, 2018).

c) Quinoa:

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) es una planta dicotiledónea anual. Este pseudocereal, es un cultivo tropical de la región de los Andes, pero gracias a su gran adaptabilidad en

diferentes condiciones de crecimiento y su alto valor nutricional se está extendiendo por el resto del mundo. El color de sus semillas varía del blanco al rojo o negro dependiendo del cultivar.

La quinoa es reconocida por la gran cantidad y calidad de sus proteínas (14-18% aprox.), y por el buen balance de aminoácidos con alto contenido en lisina y metionina. El contenido de almidón total ronda el 50% y tiene una alta proporción de ácido linoleico y AGI. También contiene una importante cantidad de fibra, minerales, vitamina E, esteroides vegetales y polifenoles (Li & Zhu, 2018; Sohaimy, Mohamed, Shehata, Mehany, & Zaitoun, 2018).

d) Alpiste:

El alpiste, *Phalaris canariensis* L., de la familia Poaceae (Gramineae) es un cereal de cultivo anual originario de Canadá y Argentina. En el pasado, su consumo solo era viable para pájaros ya que los pelos silíceos del casco de la semilla tienen efectos tóxicos para la salud humana. Pero en 1997, CDC María en Canadá, fue el primer cultivo de semillas sin pelo (Hairless Canary seeds) mediante mutagénesis, permitiendo así el consumo humano.

La proteína y el almidón del alpiste tienen características únicas para la industria alimentaria. El contenido proteico oscila entre el 21-24%, siendo la prolamina el 45% aprox. del total proteico. Las albúminas y globulinas representan un nivel muy bajo. Contiene una importante cantidad de triptófano, fenilalanina y arginina y poca lisina y prolina. El contenido en almidón es del 56%. Es una fuente rica de minerales (P, S, Mg, Ca, Fe), compuestos fenólicos y carotenoides, que actúan como antioxidantes (Abdel-Aal, Hucl, Patterson, & Gray, 2010; Abdel-Aal, Hucl, Shea Miller, Patterson, & Gray, 2011).

e) Arroz:

El arroz (*Oryza sativa*) de la familia Poaceae, es una planta anual de 0.6-1.5m.

El contenido proteico es muy bajo respecto a las otras harinas (7%) aunque tiene un buen balance de aminoácidos esenciales, sobre todo lisina, en comparación con cereales como el trigo. Las glutelinas son la mayor fracción proteica.

La harina de arroz es el producto sin gluten más usado en la industria, aunque su valor nutricional sea inferior al de otros cereales. El mayor componente estructural del arroz

es el almidón con casi un 80%. El pequeño tamaño de los gránulos de almidón y el contenido de amilosa proporciona buenas características para el desarrollo de productos en el mercado, donde es muy usado por su bajo coste. Aunque el almidón en su forma nativa tiene un uso limitado en la industria, sus variantes modificadas química o enzimáticamente se emplean con frecuencia para mejorar su funcionalidad y aumentar su estabilidad frente al procesado térmico o los medios de pH ácido. La modificación física de las harinas es una prometedora alternativa que se usa para producir mejoras en sus propiedades fisicoquímicas y además, permite un etiquetado “limpio” en los alimentos donde se utiliza, ya que no se considera aditivo ni debe identificarse en la etiqueta como tal (Zavareze, Storck, de Castro, Schirmer, & Dias, 2010).

Modificación física de harinas mediante tratamientos hidrotérmicos asistidos con microondas

Para mejorar la calidad nutricional y las características sensoriales de los productos elaborados con estas harinas sin gluten, se están empleando modificaciones físicas. Estas modificaciones físicas sobre el almidón y las proteínas permiten obtener productos de calidad que se asemejan a las características organolépticas de los productos con gluten.

El tratamiento hidrotérmico mediante radiación microondas es un método de calentamiento convencional donde las ondas electromagnéticas (frecuencias entre 1-300 GHz) son absorbidas por las moléculas polares e ionizables, generando un rápido aumento de la temperatura de la muestra (Villanueva, Harasym, Muñoz, & Ronda, 2018). La humedad de la harina está relacionada con la temperatura adquirida.

Dependiendo de la intensidad del tratamiento las proteínas pueden perder funcionalidad o sus enzimas pueden inactivarse. Algunos autores muestran que en la harina de trigo el tratamiento con microondas no tiene ningún efecto sobre las fracciones proteicas, es decir, que no hay desnaturalización ni diferencias en la intensidad de las bandas cuantificadas mediante SDS-PAGE (Lamacchia, Landriscina, & D’Agnello, 2016). Sin embargo, según Gianfrani *et al.*, 2017, el tratamiento microondas sí afecta a la solubilidad de la proteína ya que la cantidad e intensidad de la banda proteica es muy reducida respecto a la harina sin tratar.

Ya que la mayoría de los artículos se basan en cómo afecta positivamente el tratamiento térmico al almidón mejorando sus características organolépticas, pero no se centran en las proteínas, el fin es conocer qué efecto proteico origina el microondas en las harinas sin gluten.

2. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo forma parte de un estudio más amplio, realizado por el grupo de investigación PROCEREALtech en el Edificio LUCIA en la Universidad de Valladolid. Este grupo, ha usado el tratamiento hidrotérmico asistido con microondas para inactivar las enzimas presentes en la harina y así producir cambios en los almidones que permitan mejorar las masas panarias sin gluten y las características físicas y organolépticas de los panes resultantes. Teniendo en cuenta el estudio realizado por Puncha-Arnon & Uttapap, 2013, las diferencias producidas entre el almidón y la harina de arroz modificados mediante un tratamiento de calor-humedad determinan que las proteínas juegan un papel muy importante.

Por ello, en este estudio se ha visto conveniente estudiar con más profundidad qué les ocurre a las proteínas de estas harinas durante el tratamiento hidrotérmico con microondas.

Pérez-Quirce, Ronda, Lazaridou, & Biliaderis, 2017; Pérez-Quirce, Ronda, Melendre, Lazaridou, & Biliaderis, 2016; Villanueva *et al.*, 2018, son algunos de los trabajos que este grupo ha realizado empleando la modificación física de harinas. Además de conocer cómo afecta el tratamiento hidrotérmico asistido por microondas a las proteínas de las harinas, ya que no hay determinaciones proteicas previas, se pretende contribuir en la mejora de productos sin gluten para la industria alimentaria. Los métodos encontrados para el análisis de proteínas deben optimizarse para valorar los resultados, ya que en la literatura no hay estudios previos sobre proteínas de harina sin gluten tratada.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es determinar el efecto del tratamiento térmico con microondas sobre el contenido proteico en las harinas de tef, trigo sarraceno, quinoa, arroz y alpiste. Esto pretende mejorar la calidad nutricional y sensorial de productos sin gluten en la industria alimentaria mediante la modificación estructural del almidón y las proteínas.

Como objetivos secundarios:

- Puesta a punto de los métodos de caracterización proteica empleados
- Análisis y estudio de las diferentes harinas con o sin tratamiento microondas
- Análisis de la composición de aminoácidos libres y totales de las harinas e interpretación de los resultados

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL DE LABORATORIO

4.1.1. Harinas.

- Harina de trigo sarraceno polaco (TSP): el grano fue suministrado por la empresa Grupa Producentów Ekologicznych “Dolina Gryki” Sp Z O de Miedzylesie, Polonia. La harina se obtuvo por molienda del grano en molino Perten con un tamiz de 1mm.
- Harina de tef blanco (TB387): la variedad Dz-Cr-387, procede del Centro Debre Zeit del Instituto Etíope de Investigación Agraria de la campaña del 2016.
- Harina de arroz NPU (ANPU): la variedad índica con granulometría gruesa fue suministrada por la empresa HerbaRicemills, Valencia.
- Harina de alpiste (ALP): el alpiste para consumo humano proviene de Canadá, de la cosecha de 2016. Es importado por la empresa Legumbres-Imperial S.A, Illescas (Toledo) y nos fue suministrado por la empresa Fitopal.
- Harina de quinoa (QUI): la variedad Titikaka (la mejor adaptada a las condiciones climáticas europeas), fue cultivada en Rodilana, Valladolid. La empresa suministradora fue “Extremeña de arroces”, Cáceres.

Tabla 1. Composición química de las muestras de harina. La humedad se determinó en el laboratorio (AACC Method 44-15A), y los valores de proteína y fibra dietética fueron determinados por el laboratorio Agrolab Ibérica S.L.U. en Burgos.

Composición química	Tipos de harinas				
	Trigo sarraceno	Tef	Arroz NPU	Alpiste	Quinoa
Humedad (g/100g muestra)	12.56%	9.87%	12.5%	10.43%	9.68%
Proteína (g/100g m.s)	12.6%	11.4%	8.13%	17.57%	14.03%
Fibra dietética (g/100g m.s)	4.4%	7.4%	<1%	5.54%	n.d

n.d: no determinado

4.1.2. Equipos y material fungible (ver ANEXO I)

4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

a) Humidificación de harinas:

Para determinar la humedad de las distintas harinas, se pesaron 2 g de cada muestra en cápsulas de metal, que se secaron en la estufa a 130°C durante 1h. Después se dejaron enfriando otra hora en el desecador, y se pesaron de nuevo para obtener el valor final mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(\text{peso cápsula vacía} + \text{peso de la muestra}) (g) - \text{peso final tras estufa} (g)}{\text{peso de la muestra} (g)} \times 100$$

Una vez obtenido el porcentaje de humedad de cada harina, hay que conseguir llegar a un porcentaje de humedad del 30%. Para ello, dependiendo de la humedad inicial de la muestra se añade una cantidad concreta de agua. En una batidora/mezcladora se vierte la harina y se pulveriza poco a poco el agua calculada hasta conseguir el peso final.

La harina hidratada se guardó en un bote de polietileno, que se refrigeró durante 24h a 3°C para equilibrar la humedad requerida. Pasado ese tiempo, se calculó de nuevo el porcentaje de humedad final para corroborar que era la adecuada. Las muestras se congelaron a -20°C en bolsas de polipropileno y poliamida a la espera del tratamiento térmico.

b) Tratamiento microondas:

El procedimiento microondas descrito por Villanueva *et al.*, 2018 se aplicó a las muestras de harina humedecidas al 30% (obtenidas según lo explicado en el apartado 4.2.a).

El tratamiento hidrotérmico se realizó en un microondas modificado por los investigadores de 900W de potencia máxima (modelo R342INW, Sharp). El proceso requiere de 100 g de harina que se introducen en un recipiente cilíndrico de polietileno, cerrado con una película de plástico al que se hace unos pequeños agujeros. Esto se somete a un giro continuo dentro del microondas gracias a un motor externo con una velocidad de 60-70 rpm, para que la radiación electromagnética se distribuya homogéneamente. La aplicación del microondas se llevó a cabo durante 24 min, de los cuales, en cada minuto, 20 s está en funcionamiento y 40 s está parado para recuperar el vapor de agua. La harina sufrió tratamiento térmico durante 8 min a máxima potencia (900W), alcanzando la harina en el microondas una temperatura de 160°C.

Tras el tratamiento, se molió con un mortero para que quedase bien homogeneizada y fina.

c) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Como método de análisis de proteínas se empleó la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), según el método Laemmli (1970). La separación proteica depende de la masa molecular de la muestra bajo la acción de un campo eléctrico, y se realiza en condiciones desnaturizantes. Para separar las proteínas, se emplea un gel de desarrollo (resolving gel) del 12 o 15%, en el que se separan las proteínas y un gel de apilamiento (stacking gel) al 4%, que concentra la muestra.

El protein loading buffer x5 (PLBx5) o tampón de carga estaba compuesto por:

Componente**	Cantidad usada	Concentración Final
Tris 1M pH 6.5	1.56 mL	312.5 mM
SDS	0.5 g	10 %
Glicerol	2.5 mL	50 %
2-ME*	1.25 mL	25 %
Azul de bromofenol 2%	16 µl	0.625

*le otorga al tampón las condiciones reductoras. El PLB para condiciones no reductoras, no lleva 2-ME.

** los componentes empleados son de la empresa Sigma.

Para disolver las muestras, se empleó el PLBx5 o el PLBx1 (dilución 5 veces del x5).

Para estimar los pesos moleculares de los polipéptidos se empleó como referencia un estándar de pesos moleculares proteicos (Thermo Scientific protein biology): β -galactosidasa (116kDa), albúmina de suero bovino (66.2kDa), ovoalbúmina (45kDa), lactato deshidrogenasa (35kDa), REase Bsp98I (25kDa), β -lactoglobulina (18.4kDa) y lisozima (14.4kDa).

Todos los análisis se realizaron a una intensidad fija de 25mA por gel y 300V, durante 1h30min aproximadamente. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue durante media hora y después de destiñeron con agua destilada para poder observar y fotografiar las bandas proteicas.

d) Fraccionamiento proteico de tef y trigo sarraceno:

El esquema de fraccionamiento publicado por Osborne, 1924, clasifica las proteínas en base a su solubilidad y las divide en:

- **Albúminas (ALB)**, solubles en agua;
- **Globulinas (GLB)**, solubles en sal;
- **Prolaminas (PRL)**, solubles en alcohol y
- **Glutelinas (GLT)**, solubles en ácidos o bases.

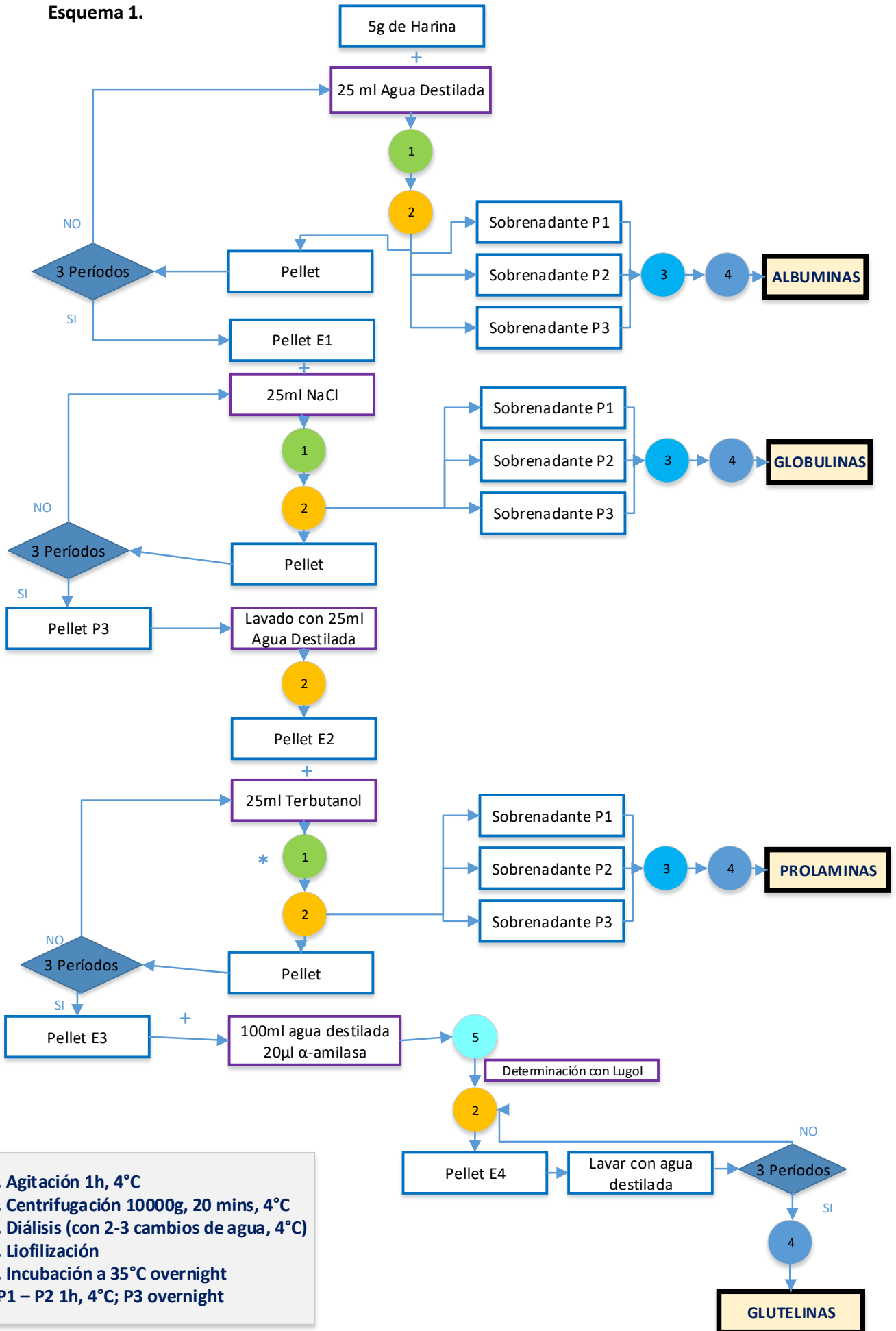
En nuestro trabajo se siguió el fraccionamiento propuesto por Adebowale *et al.*, 2011 y Taylor, Lottelore Schüssler, & van der Walt, 1984, para harinas sin desgrasar. A partir de éste, con pequeñas modificaciones, realizamos el fraccionamiento de las harinas de TS y tef con y sin tratamiento térmico que se explica a continuación (**Esquema 1**).

Extracción de albúminas: se partió de 5g de harina de cada muestra. Se añadieron 25mL de agua destilada agitando continuamente durante 1h a 4°C y se repitió este período 3 veces. Después de cada extracción se obtuvo un sobrenadante por centrifugación a 10000 g, 20 min, 4°C. Los 3 sobrenadantes obtenidos se dializaron juntos contra 25L de agua destilada a 4°C durante 72h (con 2 cambios de agua). El extracto dializado fue congelado y liofilizado, para obtener la fracción de las albúminas.

Extracción de globulinas: al pellet resultante del último centrifugado en el paso anterior se le añadieron 25 mL de 1.25 M NaCl (1:5 w/v) (PanReac). Se agitó continuamente a 4°C (2 veces toda la noche y una vez 1h) y se centrifugó tras cada extracción a 10000 g, 20 min, 4°C. Los 3 sobrenadantes salinos se dializaron contra 25L de agua destilada a 4°C durante 48h (con 3 cambios de agua). El extracto dializado (globulinas) se liofilizó. Para eliminar bien los restos de NaCl, el último pellet se lavó con 25 mL de agua destilada, se agitó 1h y se centrifugó, desechando el sobrenadante obtenido.

Extracción de prolaminas: al último pellet libre de sales, se le añadió 25 mL de tercbutanol 60% (v/v) (Sigma) a temperatura ambiente. La extracción se repitió 2 veces durante 1h y otra vez toda la noche, con posterior centrifugación a 10000 g, 20 min, 4°C. Los extractos se recuperaron dializando los sobrenadantes durante 48h (con 2 cambios de agua), y después se liofilizaron.

Esquema 1.



Extracción de glutelinas: el residuo obtenido después de la extracción de prolaminas, se resuspendió en 100 mL de agua destilada, con 20µL de α -amilasa (Termamyl 2X, Novozymes). Se dejó incubando toda la noche a 35°C. Tras esto, se echaron unas gotas de la solución de Lugol para determinar que no quedase almidón, y se centrifugó a 10000 g durante 20 min, desechando el sobrenadante. Al pellet resultante se le añadió agua destilada con posterior centrifugación, durante 3 periodos, para eliminar la α -amilasa y los azúcares. El sedimento final obtenido, donde están las glutelinas, se liofilizó.

e) Hidrólisis de proteínas y Cromatografía Líquida de Alta Resolución:

Este método se realizó por duplicado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, Edificio I+D del Campus Miguel Delibes en la Universidad de Valladolid.

Se determinó la concentración de aminoácidos libres y aminoácidos hidrolizados mediante cromatografía líquida de alta resolución en muestras de harina tratadas y sin tratar de tef, trigo sarraceno, quinoa y arroz.

Para extraer y poder cuantificar los aminoácidos libres, se emplearon dos métodos diferentes. En el primer método, se añadió HCl 0.1M a la harina y se agitó 40 min en un agitador/mezclador, filtrándose posteriormente. El segundo método difiere en que la agitación de la muestra se realizó mediante ultrasonidos.

Para obtener los aminoácidos totales, 30mg de cada muestra de harina se hidrolizaron en medio ácido (HCl 6N + fenol 90%) con un microondas y atmósfera inerte de nitrógeno. A continuación, se eliminó el medio ácido por secado mediante el evaporador con corriente de nitrógeno a 60°C. Se redisolvió en HCl 0.1N y se filtró con membranas de nylon 0.22µm. Se realizó una derivatización precolumna con OPA y FMOC, para analizarse mediante HPLC.

El método empleado en nuestras muestras fue un HPLC analítico con detector de ultravioleta a una longitud de onda de 338 nm para aminoácidos primarios (OPA-aminoácidos) y a 262 nm para la prolina (FMOC-aminoácidos). La columna empleada fue una C18 apolar (Zorbax Eclipse AAA 4.6µm x 150nm, 3µm); y una precolumna C18 (4.6µm x 12.5nm, 5µm). Los agentes de derivatización, para poder recibir la señal con UV y cuantificar los aminoácidos fueron el OPA y FMOC. El flujo de la fase móvil era de 2ml/min con rampa de eluyentes: eluyente A (buffer NaH₂PO₄·H₂O a pH 7.8) y eluyente B (AcN:MetOH:miliQ (45:45:10)). Para ajustar los tiempos de retención e identificar los picos, se insertó un multipatrón comercial de 2500 ppm (Sigma Aldrich). El patrón

permite integrar el área de cada pico que es directamente proporcional a la concentración del aminoácido.

f) Análisis estadístico:

La cuantificación de aminoácidos se realizó por duplicado. Para evaluar el impacto del tratamiento microondas y el tipo de harina sobre la composición de aminoácidos, se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies Inc.).

Todos los datos se presentaron como valores medios y se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), empleando el test LSD de Fisher ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio surge de la necesidad de mejorar la calidad de los productos sin gluten en la industria, mediante la modificación física con tratamiento microondas de las propiedades de las harinas sin gluten. Por ello se muestran las modificaciones realizadas y la variación de algunas variables, para mejorar las técnicas empleadas en el fraccionamiento y en el análisis proteico. Tras la puesta a punto de los métodos empleados, se analizan los resultados obtenidos en las harinas con y sin tratamiento.

Con esto se pretende dar una idea y ayudar en la futura investigación de la influencia del tratamiento microondas sobre las proteínas, mostrando los resultados mejorables y los avances conseguidos.

5.1. Humedad de las harinas tratadas con microondas:

Antes de aplicar el tratamiento microondas durante 8 min, todas las harinas deben humedecerse. La humedad de todas las harinas se normaliza al 30% y después se realiza el tratamiento. Tras esto, se determina la humedad de las harinas tratadas como se describe en el apartado 4.2.a.

Tabla 2. Humedad de las harinas tras aplicar tratamiento microondas.

Tipos de harinas	Trigo sarraceno	Tef	Arroz NPU	Alpiste	Quinoa
Humedad (g/100g muestra)	8.69	6.75	9.63	10.65	8.28

El contenido de agua de las muestras con una humedad del 30% tras el tratamiento microondas desciende hasta valores en torno al 10%, tal y como indicaban Villanueva *et al.*, 2018 en sus estudios. Esto sugiere que la temperatura alcanzada en el microondas disminuye la humedad de la muestra tratada debido a la evaporación del agua gracias a los orificios del bote donde se trata.

5.2. Modificación del fraccionamiento proteico de tef y trigo sarraceno:

Realizamos un estudio previo para valorar y conseguir las condiciones óptimas del fraccionamiento proteico, descritas en el apartado 4.2.d.

En esta puesta a punto del fraccionamiento proteico solo se empleó harina de tef nativo y tratado con microondas. La extracción de albúminas, globulinas y LMWN se realizó de manera conjunta. Tras realizar la diálisis y antes de liofilizar, se centrifugó la muestra a 40000g durante 20min. Se obtuvo una mayor cantidad de pellet en el tef nativo, y el sobrenadante obtenido de cada harina se liofilizó.

En la obtención del extracto de prolaminas, tras la diálisis, las tripas duplicaron su tamaño y se volvieron más turgentes. Se centrifugó el dializado a 40000g, 20min y después se liofilizó el sobrenadante.

Con esto observamos que, al dializar contra agua destilada, las globulinas y las prolaminas volvían a precipitar. Los extractos quedaban en el pellet tras la centrifugación después de la diálisis y no en el sobrenadante que es lo que se liofilizó para analizar posteriormente. De modo que la centrifugación tras la diálisis se descartó en el siguiente procedimiento, y se liofilizó todo el dializado obtenido para no perder ninguna fracción proteica.

Taylor *et al.*, 1984, usaron tercbutanol y el agente reductor, 1,4-ditiotreitól (DTT), para extraer las prolaminas. Para analizar la fracción proteica de las prolaminas mediante SDS-PAGE, prescindían del DTT por lo que en nuestro procedimiento no usamos el DTT, para que no interfiriese en las condiciones no reductoras de la electroforesis posterior.

Para la extracción de las glutelinas Taylor *et al.*, 1984, no emplearon ningún disolvente para solubilizarlas, y aunque el pellet obtenido no tiene ni almidón ni azúcares, si hay otros compuestos además de las glutelinas.

5.3. Optimización de variables para el análisis proteico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico:

La técnica básica de análisis de la composición proteica en las harinas es la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico. Inicialmente se evaluaron 2 tampones o PLB diferentes para la preparación de la muestra. Uno de los tampones de estudio fue el descrito por Abebe *et al.*, 2015 para la caracterización proteica de muestras de harinas de tef y trigo sarraceno.

Las muestras se prepararon a dos concentraciones, al 1 y al 2% w/v, es decir, disolviendo 1 o 2 mg de harina en 100 μ l de buffer en condiciones reductoras. Este buffer estaba compuesto por: 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.02% (v/v) glicerol, 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) azul de bromofenol y 0.005% (v/v) de 2-ME. Para analizar las muestras bajo condiciones reductoras, las muestras se hirvieron durante 1 min, como indica el artículo, antes de la centrifugación durante 5 min a 15,800 g. Este buffer se comparó a su vez con el PLB descrito en el apartado 4.2.c, para ver cuál extraía mejor las muestras. Las muestras de harina al 1 y 2% de tef y TS, disueltas en este tampón se hirvieron durante 5 min antes de la centrifugación. La centrifugación de las muestras permite analizar solo la parte soluble de las muestras. Posteriormente, tras la centrifugación de todas las muestras, se cargaron 12 μ l de sobrenadante en cada pocillo del gel de electroforesis al 12% (fig.1).

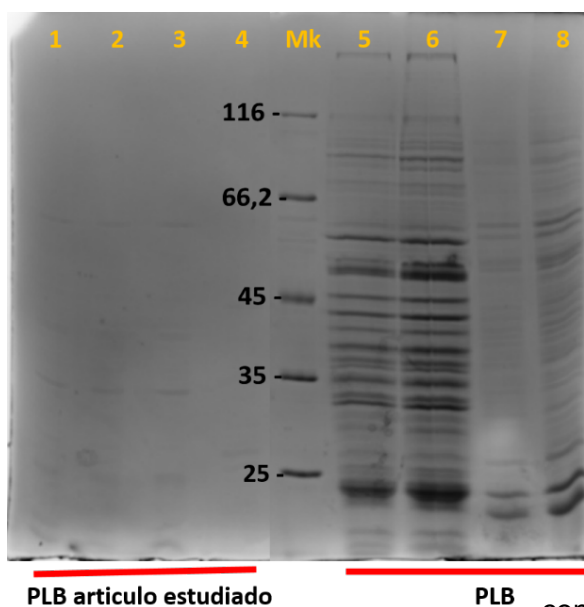


Fig. 1. Comparación de buffers. TS 1% (1), TS 2% (2), Tef 1% (3), Tef 2% (4), disuelto en el buffer del artículo empleado con 1 min de ebullición; TS 1% (5), TS 2% (6), Tef 1% (7), Tef 2% (8), disuelto en el PLB con 5 min de ebullición.

El buffer empleado por Abebe *et al.*, 2015, no consigue extraer las proteínas de nuestras muestras. Esto posiblemente se debe a la baja concentración del 2-ME que no consigue destruir los puentes disulfuro, y a la escasa cantidad de SDS, que no consigue desnaturizar las proteínas ni extraerlas. Por ello, éste fue descartado y en el resto de geles se empleó el PLB.

También se observó que las bandas del tef tenían muy poca intensidad en comparación con las del TS, probablemente debido a la poca cantidad de harina empleada. De modo que las muestras de tef se prepararon posteriormente al 4%, para aumentar la presencia de proteínas extraídas.

Además, para comprobar cuál era la extracción proteica más efectiva, se probaron diferentes tiempos de ebullición en las muestras de tef nativo (1 min, 5 min y 10 min). La ebullición de las muestras ayuda a desnaturalizar más fácilmente las proteínas permitiendo que el SDS actúe mejor. Tras hervir las muestras se centrifugaron a 15000g durante 5 min, y se cargaron 15 μ L del sobrenadante por pocillo. Esto se estudió por separado, en condiciones reductoras (con β -ME) y no reductoras (sin β -ME), en geles del 12% (**fig.2**).

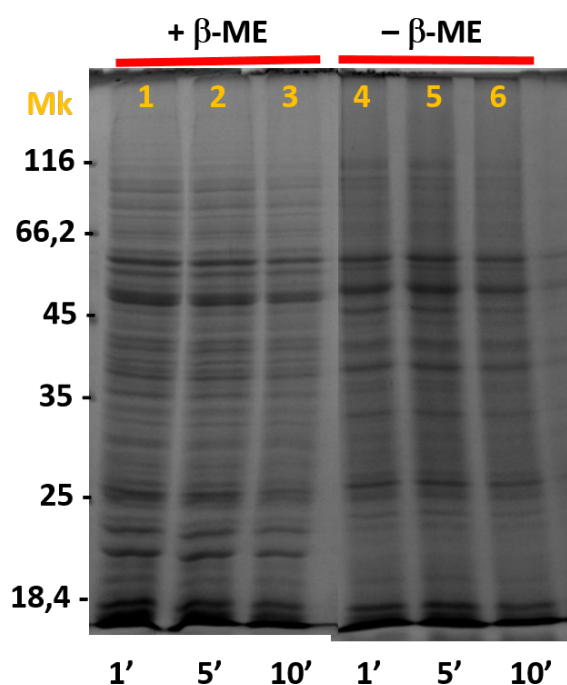


Fig. 2. Comparación de tiempos de ebullición en condiciones reductoras y no reductoras en el tef. 1 min (1), 5 min (2), 10 min (3), en condiciones reductoras; 1 min (4), 5 min (5), 10 min (6), en condiciones no reductoras.

La figura 2 muestra que un tiempo de ebullición de 5 min en ambas condiciones es suficiente para una buena extracción proteica. En condiciones reductoras y no reductoras, la resolución del gel es diferente.

La última variable estudiada fue la propuesta por Gianfrani *et al.*, 2017, quienes dejaban incubando la muestra con el PLB x1 durante 2h en agitación continua con posterior centrifugación, sin hervir la muestra. Para averiguar si con este método se conseguía extraer una mayor cantidad de proteína, se comparó un tiempo de extracción de 2h sin ebullición con un tiempo de extracción de 72h con ebullición de 5 min. Para comprobar esto, también analizamos las harinas de TS (1%) y tef (4%) tratadas con microondas y realizamos la electroforesis bajo condiciones reductoras (**fig. 3**). En cada pocillo del gel

del 12%, se cargaron 20 μ L del sobrenadante obtenido en la centrifugación de las muestras.

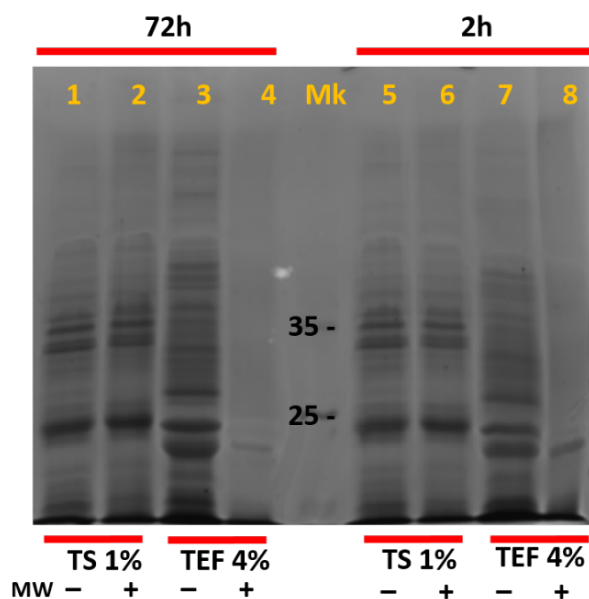


Fig. 3. Extracción proteica (2h o 72h) de TS al 1% con y sin MW y tef al 4% con y sin MW. TS- 1% (1), TS+ 1% (2), Tef- 4% (3), Tef+ 4% (4), durante 72h de extracción; TS- 1% (5), TS+ 1% (6), Tef- 4% (7), Tef+ 4% (8), durante 2h de extracción.

Como se observa una mayor intensidad en las bandas donde la extracción proteica ha tenido lugar más tiempo y con ebullición, establecemos para los siguientes geles un periodo de extracción de la muestra con el PLB de 24h en agitación continua, con una ebullición posterior de 5 min.

5.4. Análisis de la composición proteica de los extractos crudos de harinas de tef, trigo sarraceno, alpiste, quinoa y arroz mediante SDS-PAGE:

Una vez determinadas las mejores condiciones y las variables óptimas para obtener una mejor extracción proteica, estudiamos las diferentes harinas tratadas en el microondas y sin tratar.

En el caso del tef y el TS, las harinas se estudian con más profundidad ya que también analizaremos las fracciones proteicas obtenidas. En las harinas de alpiste, arroz, y quinoa, se aporta un estudio previo que da idea de la cantidad proteica pero que habrá que seguir estudiando en trabajos futuros.

La harina de alpiste se analiza al 2%, la de quinoa al 1 y 3%, y la de arroz al 3%, con y sin tratamiento de microondas. La extracción de las muestras con el PLB x1 con o sin β -ME, se produjo durante 24h, con una ebullición posterior de 5 min y una centrifugación de 5 min a 20000g. Se prepararon dos geles al 12%, uno en condiciones reductoras (**fig. 4**) y el otro en no reductoras (**fig. 5**), donde se pincharon 20 μ L de muestra soluble en cada pocillo.

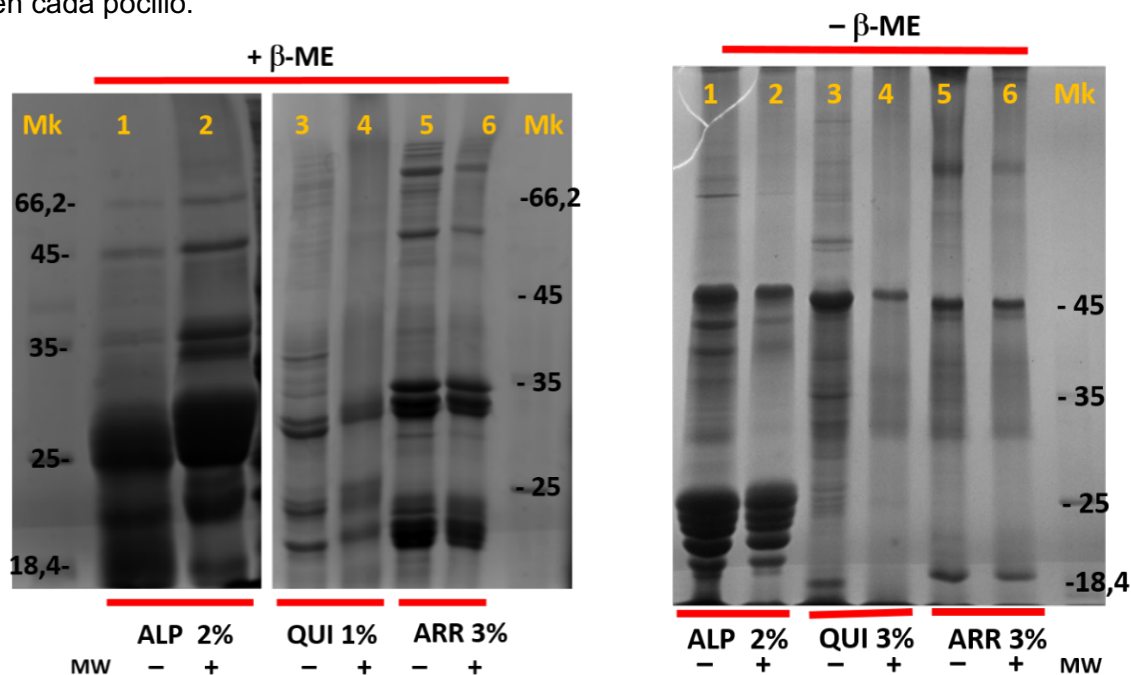


Fig. 4. Análisis de alpiste, quinoa y arroz en condiciones reductoras. ALP- 2% (1), ALP+ 2% (2), QUI- 3% (3), QUI+ 3% (4), ARR- 3% (5), ARR+ 3% (6)

Fig. 5. Análisis de alpiste, quinoa y arroz en condiciones no reductoras. ALP- 2% (1), ALP+ 2% (2), QUI- 3% (3), QUI+ 3% (4), ARR- 3% (5), ARR+ 3% (6).

En condiciones reductoras, la mayor cantidad de proteínas del extracto crudo en la harina nativa de alpiste está entre los 18.4-25 kDa, siendo la más intensa en torno a los 25 kDa. También se observa alguna banda proteica de 35, 45 y 66.2 kDa. En el alpiste tratado, parece que la cantidad proteica aumenta en torno a los 25, 35 y 45 kDa frente a la harina sin tratar, es decir, que el tratamiento con microondas no ejerce un efecto significativo sobre la presencia de las proteínas. Por otro lado, en condiciones no reductoras, el alpiste nativo tiene alta concentración proteica entre 18.5-25 y 45 kDa al igual que el tratado, pero en éste desaparecen las bandas correspondientes a los tamaños entre 25 y 35 kDa. En el análisis proteico realizado por Boye *et al.*, 2013, la mayor cantidad proteica está entre 20-25 kDa. El alpiste en condiciones reductoras tiene mala resolución y habría que optimizar mejor la muestra, ya que un 2% de alpiste parece

ser una cantidad excesiva para el análisis, lo cual está en consonancia con la alta concentración proteica descrita en estas harinas.

En condiciones reductoras, se aprecian diferencias entre la quinoa tratada y la no tratada. Las bandas proteicas más intensas en la harina nativa tienen un tamaño de 19, 23, 30 y 38 kDa, mientras que en la quinoa tratada se observan bandas proteicas de baja intensidad hasta los 35 kDa, destacando las bandas de 20, 25 y 33 kDa. En general parece que el tratamiento sobre la harina de quinoa reduce la presencia de proteínas y que desde el principio su harina no tiene una alta concentración de las mismas.

La harina de arroz bajo condiciones reductoras tiene un patrón similar en la harina sin tratar y tratada, aunque con un ligero descenso en esta última, que no podría admitirse como significativo. Hay una fuerte intensidad de las bandas en 22, 30 y 35 kDa. En el análisis de arroz nativo de Abebe *et al.*, 2015, también se observa la alta concentración de proteínas en la banda de 22 kDa. Por el contrario, en las condiciones no reductoras, las proteínas se localizan en la banda de 18 y 45 kDa.

Las harinas de TS al 1% y tef al 4% las analizamos con y sin tratamiento microondas, bajo condiciones reductoras. La extracción de las muestras tuvo lugar durante 24h en agitación continua con el PLB x1, después se hirvieron durante 5 min y, por último, se centrifugaron a 20000g durante 5 min. Se preparó un gel de desarrollo al 12% (**fig.6**) y otro al 15% (**fig.7**), para observar mejor las proteínas de bajo peso molecular. Al cargar 20 μ L de muestra en cada pocillo, estamos cargando 20 μ g de proteína de TS y 80 μ g de proteína de tef.

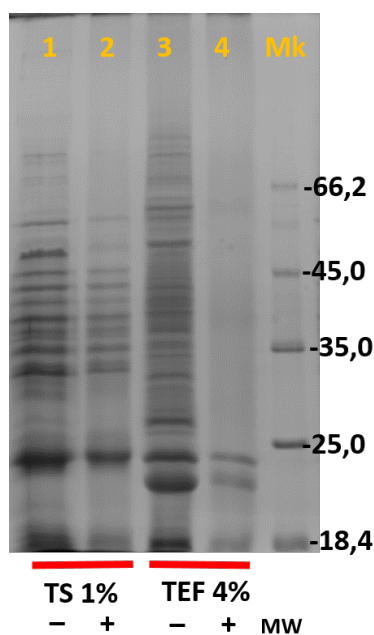


Fig. 6. Análisis de TS y tef con y sin MW. Gel al 12%.
TS- 1% (1), TS+ 1% (2), Tef- 4% (3), Tef+ 4% (4).

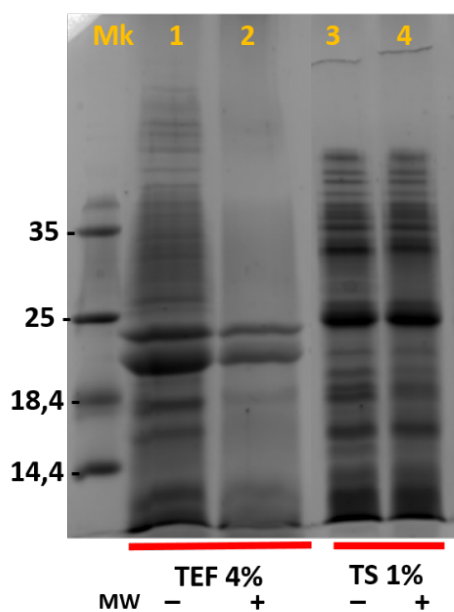


Fig. 7. Análisis de TS y tef con y sin MW. Gel al 15%.
TS- 1% (1), TS+ 1% (2), Tef- 4% (3), Tef+ 4% (4).

En la harina de tef nativa, predominan las bandas proteicas de alta intensidad entre 16-25 kDa, aunque se observan muchas bandas proteicas de mayor peso molecular. En cambio, Abebe *et al.*, 2015, determinaron que la mayor cantidad de proteína del tef se encuentra entre 45-67 kDa. En el tef con tratamiento microondas, la reducción de proteínas en el extracto crudo es drástico, y solo se observan bandas proteicas por debajo de los 25 kDa, con una mayor cantidad entre 18.4-25 kDa. En la harina de TS nativa, los resultados concuerdan con los observados por Hager *et al.*, 2012. Predominan las proteínas con un peso molecular de 25 kDa, y hay una alta concentración entre 28-60 kDa. En el TS tratado, predominan las mismas bandas proteicas, pero con menor contenido proteico, aunque en el gel del 15% este descenso no es tan evidente por lo que no puede afirmarse que sea significativo.

Aunque todas las muestras están normalizadas para poder ser comparadas, se ven grandes diferencias entre el TS y el tef. En el TS observamos que el tratamiento microondas tiene una pequeña influencia sobre las proteínas, ya que en las bandas proteicas disminuye ligeramente su intensidad. Sin embargo, en el tef tratado vemos que casi todas las proteínas han desaparecido y solo se mantienen las de peso molecular inferior a 25kDa.

La ausencia de proteínas en el tef modificado con microondas, crea la incógnita de averiguar qué pasa con sus proteínas. Con lo estudiado, la mala solubilización de las proteínas en el tampón de extracción es una posibilidad acerca de lo que les puede ocurrir. Ya que en todos los análisis proteicos realizados siempre se observa esta ausencia de proteínas vemos que no es un problema de la técnica electroforética. Esta desaparición de proteínas será objeto de próximos estudios.

5.5. Análisis de la composición del fraccionamiento proteico en las harinas de tef y trigo sarraceno:

Tras realizar el fraccionamiento de las harinas de tef y TS propuesto por (Adebowale *et al.*, 2011) y modificado según se expone en el apartado 4.2.d, las 4 fracciones proteicas obtenidas se liofilizaron. El análisis de la composición de cada extracto proteico liofilizado se realizó de nuevo mediante SDS-PAGE.

Para la preparación de las muestras, partimos de una muestra concentrada. Disolvimos 2 mg de cada liofilizado obtenido en 200 μ L de PLB x1 sin β -ME para obtener una solución concentrada de 10 μ g/ μ L. De la solución concentrada cogimos 40 μ L y le añadimos 120 μ L de PLB con o sin 2-ME, dependiendo de si el gel estaba preparado en

condiciones reductoras o no. Con la dilución de 2.5 µg/µL obtenida, en cada pocillo se cargaron 25 µg de proteína. Tras la extracción de la muestra diluida, esta se hirvió durante 10 min y se realizó un centrifugado a 20000xg. Además de esto, también se prepararon muestras de tef al 4% y TS al 1% (como se ha explicado ya anteriormente en el apartado 5.4) para poder comparar las fracciones proteicas obtenidas con el perfil del extracto crudo de harina.

Las fracciones proteicas del tef nativo bajo condiciones reductoras (**fig. 8**), muestran resultados muy diferentes a los obtenidos por otros autores. Adebowale *et al.*, 2011 muestran que las prolaminas son la fracción más representativa del tef con casi un 40% y que las bandas monoméricas de mayor intensidad son las de 20.3 y 22.8 kDa. Al comparar su resultado con otros estudios en los que las prolaminas eran la fracción menos predominante (3-15%), explican que las diferencias obtenidas pueden deberse al método de extracción o al solvente que haya sido empleado. Por el contrario Shumoy, Pattyn, & Raes, 2018, muestran un contenido del 2% de prolaminas, siendo la banda de 21 kDa más abundante en éstas, y un 12% de globulinas, de peso molecular entre 14 y 66 kDa. Por esto afirman que la diferencia puede deberse a los disolventes de extracción, y que el uso de tercbutanol más DTT es lo más efectivo para extraer las prolaminas, como usaron Adebowale *et al.*, 2011 en su fraccionamiento, y que este fraccionamiento debe optimizarse mejor.

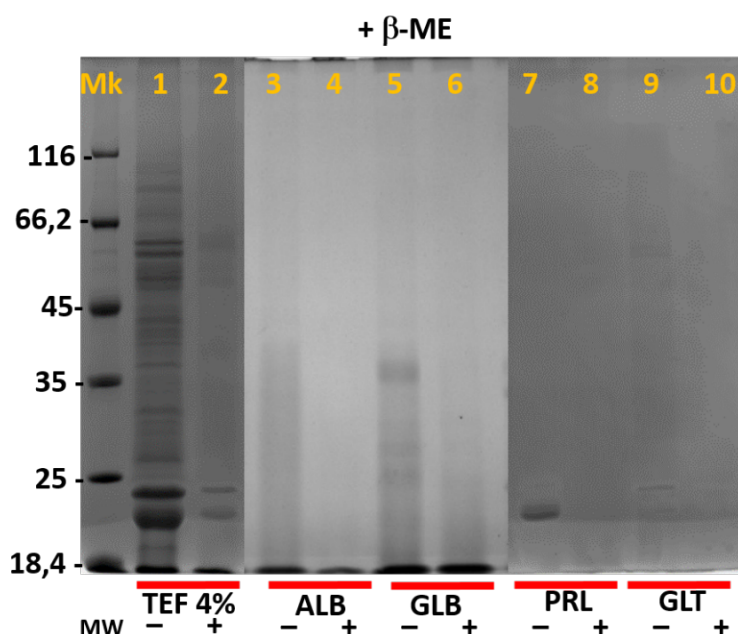


Fig. 8. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones reductoras. Gel del 12%. Tef- (1), tef+ (2), ALB- (3), ALB+ (4), GLB- (5), GLB+ (6), PRL- (7), PRL+ (8), GLT- (9), GLT+ (10)

En nuestro caso, observamos una ligera concentración de albúminas hasta los 40 kDa y un contenido de globulinas un poco superior, donde se nota una banda más intensa en torno a los 35 kDa. Vemos que las prolaminas no representan la mayor fracción

proteica del tef ya que solo aparece una pequeña cantidad entre 18.4 y 25 kDa. Esto podría deberse como bien dicen los autores ya mencionados, a que no hemos empleado el agente reductor DTT durante la extracción de esta fracción. Por último, se puede observar la casi ausencia de glutelinas como ya mencionaron Shumoy *et al.*, 2018, donde apenas representaba el 0.27%.

En la harina de tef con tratamiento microondas, no se observa ninguna fracción proteica en condiciones reductoras. Sin embargo, en condiciones no reductoras (**fig. 9**) si destacan globulinas entre 20 y 30 kDa y ligeramente albúminas hasta los 25 kDa.

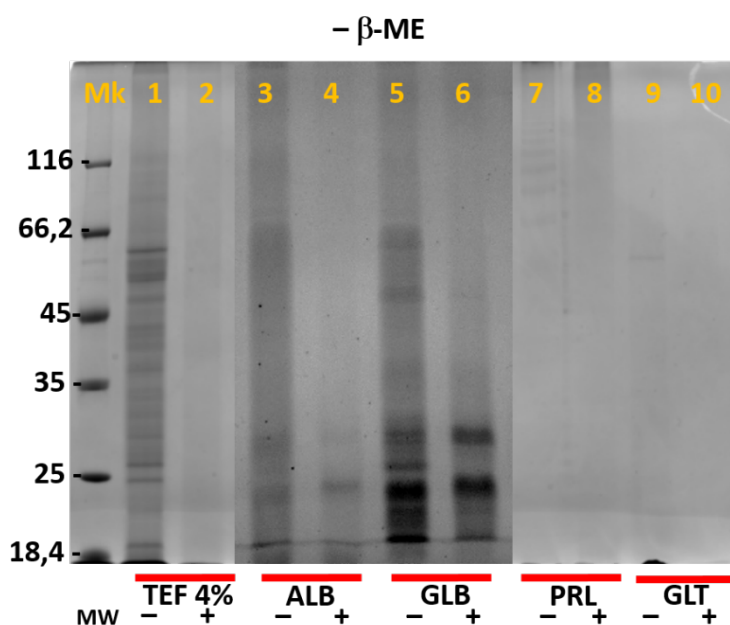


Fig. 9. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones no reductoras. Gel del 12%. Tef- (1), tef+ (2), ALB- (3), ALB+ (4), GLB- (5), GLB+ (6), PRL- (7), PRL+ (8), GLT- (9), GLT+ (10)

Debido a que la cantidad proteica observada era muy reducida en todas las fracciones proteicas estudiadas, se prepararon nuevas muestras, pero con doble concentración de proteína, es decir, se cargaron 50 μ g de proteína por pocillo. Además de aumentar la concentración de la muestra, se prepararon geles al 15% (uno bajo condiciones reductoras (**fig. 10**) y el otro, en condiciones no reductoras (**fig. 11**).

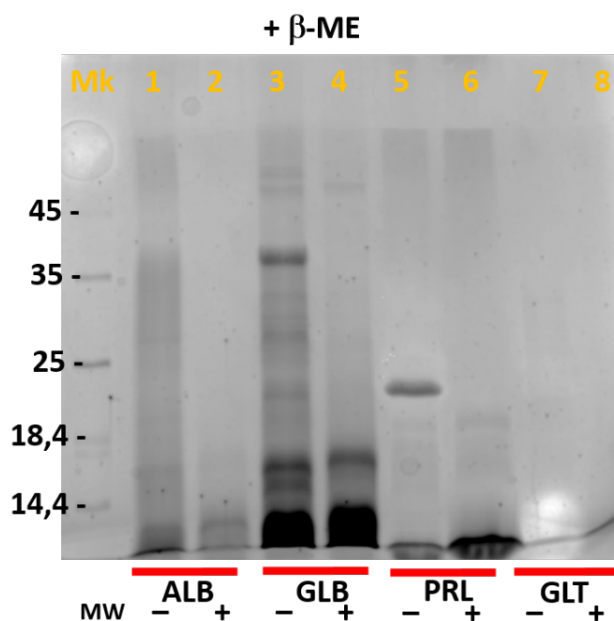


Fig. 10. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones reductoras. Gel del 15%. ALB- (1), ALB+ (2), GLB- (3), GLB+ (4), PRL- (5), PRL+ (6), GLT- (7), GLT+ (8)

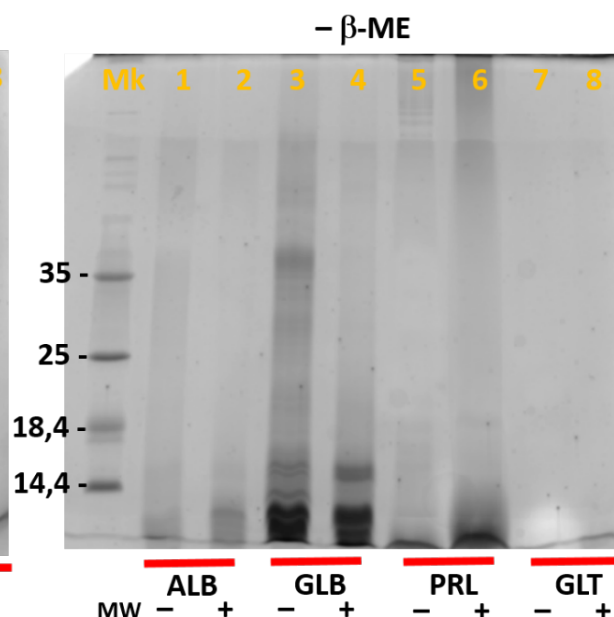


Fig. 11. Fraccionamiento proteico del tef con y sin MW, en condiciones no reductoras. Gel del 15%. ALB- (1), ALB+ (2), GLB- (3), GLB+ (4), PRL- (5), PRL+ (6), GLT- (7), GLT+ (8)

En ambas condiciones, observamos el mismo patrón de bandas que en los geles del 12% pero ya apreciamos mayor cantidad e intensidad proteica en las bandas. Una diferencia importante es que por debajo de 18.4 kDa, hay una abundante cantidad de globulinas en el tef nativo y con tratamiento. También hay albúminas de peso molecular inferior a 14.4 kDa, en la harina con y sin tratamiento. Todo esto indica que, aumentando la cantidad de muestra analizada, podemos estudiar mejor la concentración proteica de cada fracción, y que una buena parte de la proteína fraccionada es de bajo peso molecular.

En el caso del trigo sarraceno, empleamos el mismo método de fraccionamiento que para el tef. Sin embargo, este procedimiento no es el mismo que usan otros autores para obtener las fracciones proteicas del TS. Choi & Ma, 2006, solo se centran en la extracción de las globulinas, ya que son la fracción más abundante y representativa del TS. Para extraer las globulinas solubles en sal (BWG) emplearon como disolvente 0.5M NaCl (w/v), y para analizar las BWG de la harina de TS nativa realizaron SDS-PAGE. En condiciones no reductoras de la electroforesis, observaron 3 bandas proteicas abundantes en 50, 56 y 65 kDa, habiendo proteínas también entre 17-65 kDa. En

condiciones reductoras, observaron la disociación de los componentes de alto peso molecular en polipéptidos con menor PM, y el mayor componente de BWG estaba en las bandas de 23 y 35 kDa.

En el análisis proteico de nuestras fracciones de harina de TS con y sin tratamiento, también vemos que las albúminas y globulinas son las fracciones representativas del TS, ya que no hay prolaminas ni glutelinas.

Empleando β -ME (**fig. 12**), las bandas proteicas más intensas en el caso de las albúminas están en torno a los 25 y 35 kDa, siendo similar en la harina con y sin tratamiento. Los resultados obtenidos para las globulinas son muy similares a los obtenidos por Choi & Ma, 2006 para la harina nativa. La banda de BWG más abundante está en torno a los 23 kDa, aunque también se observan otras bandas importantes entre 33-45 kDa. En el caso de la BWG en el TS tratado, se pierde la banda de 33 kDa, pero el resto de bandas son bastante similares a la nativa.

Por otro lado, en condiciones no reductoras (**fig. 13**), apreciamos albúminas y globulinas entre 20-60 kDa para la harina con y sin tratamiento. Las bandas proteicas que representan la mayor cantidad de BWG en la harina nativa son las de 23 y 27 kDa.

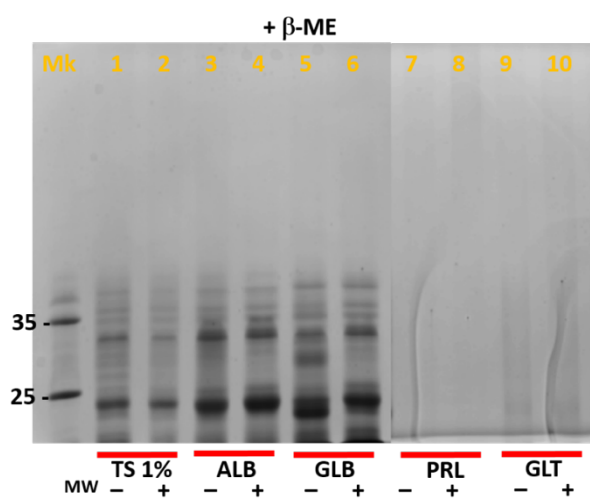


Fig. 12. Fraccionamiento proteico del trigo sarraceno con y sin MW, en condiciones reductoras. TS- (1), TS+ (2), ALB- (3), ALB+ (4), GLB- (5), GLB+ (6), PRL- (7), PRL+ (8), GLT- (9), GLT+ (10)

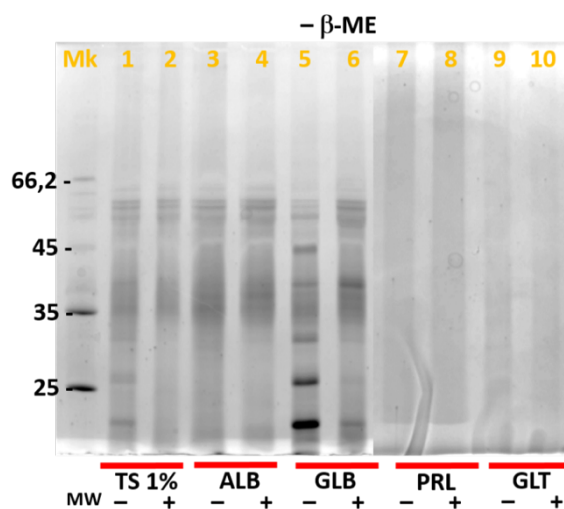


Fig. 13. Fraccionamiento proteico del trigo sarraceno con y sin MW, en condiciones no reductoras. TS- (1), TS+ (2), ALB- (3), ALB+ (4), GLB- (5), GLB+ (6), PRL- (7), PRL+ (8), GLT- (9), GLT+ (10)

5.6. Análisis estadístico de los resultados de aminoácidos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución:

Las muestras de harinas con y sin tratamiento microondas se hidrolizaron en medio ácido para extraer los aminoácidos y mediante HPLC se pudo cuantificar la cantidad de aminoácidos extraídos. Los valores de los aminoácidos de las harinas de arroz, quinoa, tef y trigo sarraceno con y sin tratamiento microondas se obtuvieron por duplicado. Con esto se han calculado los aminoácidos libres y los aminoácidos totales por muestra, es decir, los aminoácidos no peptídicos y los aminoácidos que conforman las proteínas junto a los libres, respectivamente. Los Aa proteicos se hidrolizan previamente en medio ácido para romper los enlaces peptídicos de las proteínas y posteriormente se derivatizaron para evaluar sus concentraciones.

El total de los Aa totales de estas harinas tiene relación con el contenido proteico estudiado en ellas. Además del estudio de la composición aminoacídica, mediante análisis estadístico analizamos la influencia del tratamiento microondas y la interacción entre el tipo de harinas.

Como los valores de estos aminoácidos obtenidos por el LTI, estaban expresados en mg de Aa/g de muestra, estos datos se han normalizado respecto a la humedad de cada muestra expresando los valores como mg de Aa/g de base seca. En el *anexo II*, se muestran los valores por duplicado en mg/g muestra de los aminoácidos.

Los datos que se aportan a continuación, han sido calculados estadísticamente expresados como mg/g base seca y se corresponden con los valores medios obtenidos de las muestras duplicadas con o sin tratamiento. Estos valores medios van acompañados de unas letras que son los grupos homogéneos obtenidos tras el ANOVA, es decir, indican si estas medias son significativamente diferentes entre sí.

Tabla 3. Composición de aminoácidos libres (mg/ g base seca) en las harinas de arroz, quinoa, tef y trigo sarraceno, con y sin tratamiento microondas (+/-).

Aminoácidos libres (mg/g base seca)									
	ARROZ		QUINOA		TEF		TS		
MW	-	+	-	+	-	+	-	+	SE pooled
ASX	0,00 a	0,00 a	0,33 e	0,23 d	0,18 c	0,17 c	0,11 b	0,00 a	0,01
GLX	0,00 a	0,00 a	1,12 d	0,29 c	0,29 c	0,00 a	0,34 c	0,13 b	0,02
ASN	0,00 a	0,00 a	0,10 b	0,09 b	0,51 e	0,34 d	0,12 b	0,15 c	0,01
GLN	0,00 a	0,00 a	0,41 e	0,13 d	0,06 b	0,13 d	0,12 d	0,08 c	0,01
SER	0,00 a	0,00 a	0,17 cd	0,15 bc	0,13 b	0,19 d	0,00 a	0,13 b	0,01
HIS	0,00 a	0,00 a	0,32 e	0,03 ab	0,07 b	0,00 a	0,12 c	0,16 d	0,01
GLY	0,00 a	0,00 a	0,11 b	0,09 b	0,00 a	0,10 b	0,10 b	0,18 c	0,01
THR	0,00 a	0,00 a	0,10 b	0,10 b	0,00 a	0,11 b	0,00 a	0,15 c	0,004
ARG	0,03 a	0,00 a	0,97 d	0,50 c	0,34 b	0,35 b	0,41 bc	0,49 c	0,03
ALA	0,03 a	0,00 a	0,30 cd	0,28 c	0,17 b	0,35 de	0,17 b	0,38 e	0,01
TYR	0,00 a	0,00 a	0,13 c	0,13 c	0,00 a	0,00 a	0,08 b	0,12 c	0,005
CYS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VAL	0,00 a	0,00 a	0,19 d	0,15 c	0,09 b	0,18 d	0,08 b	0,19 d	0,01
MET	0,00 a	0,03 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,09 b	0,01
PHE	0,00 a	0,00 a	0,08 b	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,08 b	0,01 c	0,002
ILE	0,00 a	0,00 a	0,08 c	0,07 bc	0,00 a	0,03 ab	0,00 a	0,09 c	0,01
LEU	0,00 a	0,00 a	0,13 b	0,10 b	0,00 a	0,07 ab	0,00 a	0,11 b	0,02
LYS	0,00 a	0,07 ab	0,11 bc	0,03 ab	0,00 a	0,08 ab	0,20 cd	0,29 d	0,03
TRP	0,00 a	0,00 a	0,09 b	0,09 b	0,09 b	0,09 b	0,11 b	0,15 c	0,01
PRO	0,00 a	0,00 a	0,26 b	0,26 b	0,03 a	0,09 a	0,00 a	0,00 a	0,03
Total	0,00	0,07	5,00	2,70	1,96	2,01	1,78	3,04	

ASX: ASP (ácido aspártico) + ASN (asparagina) y GLX: GLU (ácido glutámico) + GLN (glutamina)

MW - : sin tratamiento microondas

MW +: con tratamiento microondas

SE pooled: error estándar agrupado obtenido en el ANOVA

Los valores medios representados en la misma columna acompañados con distintas letras, son diferentes significativamente entre sí ($P < 0.05$).

La cantidad media de aminoácidos libres que tiene cada harina tratada y sin tratar respecto a su composición por g de base seca se muestran en la tabla 3.

En la harina de arroz no hay aminoácidos libres, por lo que todos sus aminoácidos forman parte de las proteínas. En las harinas de quinoa y trigo sarraceno observamos diferencias significativas entre las tratadas con microondas y las no tratadas. En el caso de la quinoa, parece que el tratamiento térmico reduce a la mitad la cantidad de sus Aa libres, mientras que, en el TS, el contenido de aminoácidos aumenta respecto a la harina

no tratada. En el tef, el contenido de Aa libres en la harina con y sin microondas es muy similar.

En el caso de las harinas de tef y TS, vemos que la cantidad de ASN y GLN es superior a la cantidad de ASX y GLX respectivamente. Estos valores discordantes pueden deberse a que la concentración de cada aminoácido sea tan baja que el error se magnifica.

Tabla 4. Composición de aminoácidos totales (mg/ g base seca) en las harinas de arroz, quinoa, tef y trigo sarraceno, con y sin tratamiento microondas.

Aminoácidos totales (mg/g base seca)									
	ARROZ		QUINOA		TEF		TS		
MW	-	+	-	+	-	+	-	+	SE pooled
ASX	6,34 a	6,38 a	11,65 bc	13,09 c	6,63 a	6,52 a	11,34 b	11,44 bc	0,53
GLX	12,63 a	12,88 a	22,22 b	24,30 bc	26,87 c	27,57 c	21,17 b	21,15 b	1,08
SER	3,73 a	3,75 a	6,28 bc	7,17 c	5,28 b	5,41 b	6,13 b	6,22 bc	0,31
HIS	1,74 a	1,79 a	4,83 d	5,14 d	2,58 b	2,62 b	3,76 c	3,90 c	0,17
GLY	3,16 a	3,11 a	7,51 b	8,74 c	3,98 a	4,03 a	7,29 b	7,47 b	0,34
THR	2,09 a	2,23 a	4,47 d	4,70 d	3,79 b	3,90 bc	4,31 cd	4,40 d	0,14
ARG	5,26 a	5,32 a	12,12 b	11,97 b	4,30 a	4,28 a	11,12 b	11,32 b	0,53
ALA	4,08 a	4,03 a	5,83 bcd	6,53 cd	6,57 cd	6,81 d	5,52 b	5,68 bc	0,30
TYR	1,66 a	1,94 ab	3,36 d	3,42 d	2,86 c	2,78 c	2,10 ab	2,26 b	0,14
CYS	1,00 a	0,98 a	1,99 d	2,03 d	1,44 abc	1,38 ab	1,86 bcd	1,94 cd	0,16
VAL	2,99 a	3,26 a	4,87 d	5,08 d	4,10 b	4,23 bc	4,70 cd	4,81 d	0,18
MET	1,35 ab	1,32 a	2,15 cd	2,35 d	3,13 e	3,22 e	1,74 abc	1,85 bc	0,15
PHE	3,25 a	3,31 a	5,03 b	5,68 b	5,14 b	5,64 b	5,17 b	5,26 b	0,26
ILE	2,01 a	2,26 a	4,05 de	4,14 f	3,10 b	3,25 bc	3,60 cd	3,71 cde	0,15
LEU	5,42 a	5,39 a	8,03 bc	9,10 c	7,93 bc	8,19 bc	7,50 b	7,67 bc	0,46
LYS	3,34 a	3,64 a	9,44 c	7,44 b	4,39 a	3,11 a	8,21 bc	7,90 bc	0,54
PRO	2,85 ab	2,18 a	4,30 b	4,21 b	4,60 b	3,34 ab	3,47 ab	4,24 b	0,54
Total	62,91	63,78	118,10	125,09	96,70	96,28	108,98	111,20	

Misma descripción que en la tabla 3

En relación a los Aa totales (tabla 4), hay pocas diferencias significativas entre las harinas con y sin tratamiento.

La harina de arroz es la que menor contenido de Aa totales tiene, lo que se corresponde con su menor contenido proteico respecto a las otras harinas. Por el contrario, la quinoa es la que tiene mayor cantidad de Aa totales. Destaca sobre todo su alto contenido en: ácido glutámico y glutamina, ácido aspártico y asparagina, arginina, lisina y leucina. El tef presenta un buen balance de aminoácidos esenciales, entre los que destacan la leucina, fenilalanina y lisina, y es rico en GLX, ASX y la alanina, no esenciales. El trigo sarraceno es muy rico en aminoácidos esenciales (arginina, lisina, leucina y valina) y también en ASX. Respecto al tratamiento microondas en la harina de quinoa sí observamos diferencias significativas en la glicina, isoleucina y lisina. En el arroz, tef y TS, no se aprecia ninguna diferencia significativa entre las harinas tratadas y sin tratar en el conjunto de sus aminoácidos libres y proteicos, aunque sí había algunas diferencias entre los Aa libres.

A partir de estos resultados podemos decir que mediante la hidrólisis ácida se consigue obtener y separar todos los aminoácidos que conforman las harinas, y que el tratamiento de microondas no modifica las proteínas ni sus aminoácidos.

Sabiendo esto, podemos deducir que el análisis proteico de la harina de tef mediante la técnica de SDS-PAGE, no ha sido efectiva. Puede ser que el SDS no haya conseguido solubilizar bien la muestra y por eso no aparecen las bandas proteicas, ya que como vemos en la tabla 4 la cantidad de Aa totales no desaparece con el microondas y los valores son muy similares a la harina sin tratar.

En la tabla 5 se expresan los p-valores ($P < 0.05$) que indican la relación que hay entre el tipo de harina y el tratamiento microondas, y si esta interacción afecta a la composición de aminoácidos totales y libres.

En los aminoácidos totales observamos que solo el tipo de harina influye en su composición. El tratamiento microondas no afecta a ninguno de los aminoácidos, y tampoco la interacción harina-microondas.

Por el contrario, en los aminoácidos libres, el tipo de harina, el tratamiento microondas y la interacción entre ambos factores sí influye sobre la composición. Solo en algunos aminoácidos (Leu, Lys, Trp y Pro), el microondas y la interacción no tienen ninguna significación estadística.

Tabla 5. Determinación de interacción entre los efectos principales (harina y MW) mediante P-valor en la composición de aminoácidos.

ANÁLISIS ANOVA MULTIFACTORIAL (p-valor)						
Aminoácidos totales				Aminoácidos libres		
AA	A (harina)	B (+MW)	AB (interacción)	A (harina)	B (+MW)	AB (interacción)
ASX	0	n.s	n.s	0	0.0002	0.0025
GLX	0	n.s	n.s	0	0	0
ASN	-	-	-	0	0.0012	0
GLN	-	-	-	0	0	0
SER	0.0001	n.s	n.s	0	0	0
HIS	0	n.s	n.s	0	0	0
GLY	0	n.s	n.s	0	0.0001	0.0002
THR	0	n.s	n.s	0	0	0
ARG	0	n.s	n.s	0	0.004	0.0003
ALA	0.0001	n.s	n.s	0	0.0001	0.0001
TYR	0	n.s	n.s	0	0.0369	0.0118
CYS	0.0006	n.s	n.s	-	-	-
VAL	0	n.s	n.s	0	0	0
MET	0	n.s	n.s	0.0078	0.0038	0.0078
PHE	0.0001	n.s	n.s	0	n.s	0
ILE	0	n.s	n.s	0.0011	0.0085	0.0077
LEU	0.0006	n.s	n.s	0.0085	n.s	n.s
LYS	0	n.s	n.s	0.0004	n.s	n.s
TRP	-	-	-	0	n.s	n.s
PRO	n.s	n.s	n.s	0.0001	n.s	n.s

n.s: no significativo ($P > 0.05$)

- : no determinados

Valores medios significativos estadísticamente ($P < 0.05$)

6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia del tratamiento microondas sobre la composición proteica de diferentes harinas sin gluten, y por ello se concluye lo siguiente:

- La normalización de las harinas al 30% y su posterior tratamiento microondas durante 8 min, reduce la humedad de las harinas tratadas en torno al 10%. Este valor se acerca a la humedad inicial de la muestra nativa.
- Las mejores condiciones para realizar un análisis proteico mediante el procedimiento de SDS-PAGE son: un PLB con una alta concentración en SDS, Tris-HCl y 2-ME; un período de extracción de la muestra con el PLB de 24h y un tiempo de ebullición de 5 min previo a la centrifugación.
- Las condiciones de extracción de las harinas de alpiste, quinoa y arroz deben optimizarse mejor en futuros estudios proteicos de estas harinas.
- La desaparición de las bandas proteicas en las electroforesis del tef al 4% con tratamiento microondas, puede deberse a la mala solubilización de la muestra con SDS, que no consigue extraer todas sus proteínas. En el caso del TS al 1%, hay pocas diferencias entre la harina con y sin tratamiento microondas en la electroforesis.
- Pese a la modificación del fraccionamiento proteico empleado para extraer las diferentes fracciones proteicas de las harinas de tef y TS, éste no ha sido el método ni los disolventes más efectivos para extraerlas.
- Aunque las prolaminas son la fracción más representativa de la harina de tef, no se observan bandas proteicas que se correspondan con esta fracción mediante el análisis con SDS-PAGE. Esto puede deberse al método de extracción de la fracción de las prolaminas y a la poca capacidad de solubilización del SDS usado.
- En el análisis proteico del trigo sarraceno, sí se observa que la fracción proteica más representativa se corresponde con las globulinas solubles en sal, seguido de las albúminas.
- El análisis de los aminoácidos mediante HPLC, muestra que no hay diferencias significativas entre las harinas con y sin tratamiento respecto a la cantidad de Aa totales de las harinas. Por el contrario, se observan diferencias significativas en la concentración de Aa libres entre el tipo de harina y la influencia del tratamiento microondas en ellas.
- Tras los resultados obtenidos, se requieren más estudios futuros que analicen la influencia del efecto del microondas sobre las proteínas de las harinas sin gluten.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., Patterson, C. A., & Gray, D. (2010). Fractionation of hairless canary seed (*Phalaris canariensis*) into starch, protein, and oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 7046–7050. <https://doi.org/10.1021/jf100736m>
- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., Shea Miller, S., Patterson, C. A., & Gray, D. (2011). Microstructure and nutrient composition of hairless canary seed and its potential as a blending flour for food use. *Food Chemistry*, 125(2), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.021>
- Abebe, W., Collar, C., & Ronda, F. (2015). Impact of variety type and particle size distribution on starch enzymatic hydrolysis and functional properties of tef flours. *Carbohydrate Polymers*, 115, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.080>
- Adebowale, A. R. A., Emmambux, M. N., Beukes, M., & Taylor, J. R. N. (2011). Fractionation and characterization of teff proteins. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.08.002>
- Arranz, E., & Garrote, J. A. (2010). Inmunología de la enfermedad celíaca. *Gastroenterología y Hepatología*, 33(9), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.11.003>
- Boye, J. I., Achouri, A., Raymond, N., Cleroux, C., Weber, D., Koerner, T. B., ... Patterson, C. A. (2013). Analysis of glabrous canary seeds by ELISA, mass spectrometry, and western blotting for the absence of cross-reactivity with major plant food allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(25), 6102–6112. <https://doi.org/10.1021/jf305500t>
- Choi, S. M., & Ma, C. Y. (2005). Conformational study of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8046–8053. <https://doi.org/10.1021/jf051040v>
- Choi, S. M., & Ma, C. Y. (2006). Extraction, purification and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Research International*, 39(9), 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.06.004>
- Comisi, L. A., & Europeas, D. E. L. A. S. C. (2009). 21.1.2009, 20–22.
- Gianfrani, C., Mamone, G., la Gatta, B., Camarca, A., Di Stasio, L., Maurano, F., ... Di

- Luccia, A. (2017). Microwave-based treatments of wheat kernels do not abolish gluten epitopes implicated in celiac disease. *Food and Chemical Toxicology*, *101*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.010>
- Hager, A. S., Wolter, A., Jacob, F., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2012). Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours. *Journal of Cereal Science*, *56*(2), 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.06.005>
- Lamacchia, C., Landriscina, L., & D'Agnello, P. (2016). Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food Chemistry*, *197*, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.016>
- Li, G., & Zhu, F. (2018). Quinoa starch: Structure, properties, and applications. *Carbohydrate Polymers*, *181*(November 2017), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.067>
- Molina-Rosell, C. (2013). Alimentos sin gluten derivados de cereales. *Enfermedad Celíaca y Sensibilidad Al Gluten No Celíaca*, 447–461. <https://doi.org/10.3926/oms.27>
- Pérez-Quirce, S., Ronda, F., Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2017). Effect of Microwave Radiation Pretreatment of Rice Flour on Gluten-Free Breadmaking and Molecular Size of β -Glucans in the Fortified Breads. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(8), 1412–1421. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1910-7>
- Pérez-Quirce, S., Ronda, F., Melendre, C., Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2016). Inactivation of Endogenous Rice Flour β -Glucanase by Microwave Radiation and Impact on Physico-chemical Properties of the Treated Flour. *Food and Bioprocess Technology*, *9*(9), 1562–1573. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1741-y>
- Puncha-Arnon, S., & Uttapap, D. (2013). Rice starch vs. rice flour: Differences in their properties when modified by heat-moisture treatment. *Carbohydrate Polymers*, *91*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.006>
- Shumoy, H., Pattyn, S., & Raes, K. (2018). Tef protein: Solubility characterization, in-vitro digestibility and its suitability as a gluten free ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, *89*(November 2017), 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.053>
- Sohaimy, S. A. El, Mohamed, S. E., Shehata, M. G., Mehany, T., & Zaitoun, M. A. (2018). Compositional Analysis and Functional Characteristics of Quinoa Flour. *Annual*

Research & Review in Biology Turkey, 2238435(123), 1–11.
<https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/38435>

- Taylor, J. R. N., Lottelore Schüssler, L., & van der Walt, W. H. (1984). Fractionation of proteins from low-tannin sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(1), 149–154. <https://doi.org/10.1021/jf00121a036>
- Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Nakajoh, M., & Kato, N. (2002). Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2125–2129. <https://doi.org/10.1021/jf011248q>
- Villanueva, M., Harasym, J., Muñoz, J. M., & Ronda, F. (2018). Microwave absorption capacity of rice flour. Impact of the radiation on rice flour microstructure, thermal and viscometric properties. *Journal of Food Engineering*, 224, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.12.030>
- Zavareze, E. da R., Storck, C. R., de Castro, L. A. S., Schirmer, M. A., & Dias, A. R. G. (2010). Effect of heat-moisture treatment on rice starch of varying amylose content. *Food Chemistry*, 121(2), 358–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.036>
- Zhu, F. (2018). Chemical composition and food uses of teff (*Eragrostis tef*). *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.101>

8. ANEXOS

ANEXO I (Equipos y material fungible)

Equipos:

Estufa: Binder. Modelo FD115

Balanza de precisión. Cobos "AX 200"

Batidora/mezcladora: Teddy Bear 5l. Varimixer

Microondas R-342: Marca Sharp (IEC 60705)

Motor externo del microondas: Worx WX128.3

Centrífuga:

Sorvall ST 16R. ThermoFisher Scientific

Sorvall Legend XTR. ThermoFisher Scientific

MiniSpin para eppendorf

Legend Micro 21R. ThermoFisher Scientific.

Equipo HPLC: Agilent Technologies 1200 Serie con columna e inyector termostatado.

Evaporador de nitrógeno: Reacti-Therm I.

TS-18822. Thermo Scientific

Microondas hidrólisis: Microwave Solvent Extraction

Labstation. Ethos Sel.

Agitador balancín: Heidolph

Hervidor: MR Hei-Tec. Heidolph

Máquina de electroforesis: vertical electroforesis system. Hoefer miniVE

Frigorífico y congelador:

Vortex: Heidolph

Liofilizador:

Equipo de agua Elix: MilliPore.

Material fungible:

Guantes de nitrilo

Botes de polietileno para microondas

Tubos eppendorf 1.5ml para centrifugación

Espátulas metálicas

Cápsulas de metal

Mortero de cristal

Gradillas para tubos

Falcon con faldón 50 ml (tapón azul)

Falcon 50ml, tapón morado para centrifugar

Tubos centrífuga 15ml. Fisher Scientific

Pipeta automática: Labnet autoclavable.

100:1000 μ l, 20:200 μ l

Puntas pipetas: D10, D200, D1000 Diamond, Gilson.

Tripas para diálisis: 12-14000 Daltons.

Medicell membranes Ltd

Cristales electroforesis: 10x10cm. Hoefer.

Vasos de precipitados de vidrio

Bolsas polipropileno y poliamida: Cyrovac

ANEXO II (Contenido de Aa totales y libres expresados en mg/g muestra)

Aminoácidos totales (mg/g muestra)								
Muestras duplicadas	ARROZ NATIVO		ARROZ MW		QUINOA NATIVA		QUINOA MW	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ASX	5,75	5,34	6,51	5,02	11,43	9,61	11,53	12,48
GLX	11,41	10,69	13,08	10,20	21,73	18,41	21,20	23,37
SER	3,34	3,19	3,82	2,96	6,22	5,13	6,28	6,88
HIS	1,59	1,46	1,87	1,37	4,52	4,20	4,51	4,91
GLY	2,84	2,69	3,13	2,49	7,45	6,12	7,67	8,36
THR	1,87	1,78	2,15	1,88	4,15	3,92	4,06	4,56
ARG	4,78	4,42	5,48	4,13	11,78	10,11	10,39	11,56
ALA	3,71	3,43	4,08	3,20	5,74	4,80	5,72	6,26
TYR	1,51	1,40	2,02	1,48	3,13	2,94	3,08	3,19
CYS	0,94	0,81	0,98	0,80	1,93	1,66	1,75	1,98
VAL	2,71	2,53	3,17	2,72	4,51	4,28	4,42	4,89
MET	1,21	1,16	1,32	1,07	2,17	1,72	1,91	2,41
PHE	2,96	2,73	3,41	2,58	4,90	4,19	4,95	5,47
ILE	1,83	1,69	2,17	1,92	3,61	3,70	3,58	4,02
LEU	4,93	4,56	5,67	4,08	7,87	6,64	7,95	8,75
LYS	3,17	2,68	3,37	3,21	9,80	7,26	6,82	6,83
PRO	2,59	2,40	2,95	0,99	4,08	3,68	3,90	3,83

Aminoácidos totales (mg/g muestra)								
Muestras duplicadas	TEF NATIVO		TEF MW		TS NATIVO		TS MW	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ASX	5,88	6,07	6,20	5,96	10,45	9,60	10,37	10,52
GLX	23,86	24,58	26,59	24,82	19,47	17,98	19,21	19,41
SER	4,67	4,85	5,17	4,92	5,60	5,24	5,61	5,74
HIS	2,34	2,31	2,57	2,31	3,50	3,15	3,60	3,53
GLY	3,51	3,66	3,84	3,68	6,73	6,16	6,86	6,78
THR	3,35	3,48	3,73	3,54	3,95	3,68	3,98	4,05
ARG	3,87	3,89	4,25	3,74	10,31	9,36	10,20	10,47
ALA	5,83	6,02	6,58	6,12	5,05	4,71	5,16	5,21
TYR	2,54	2,61	2,70	2,48	1,97	1,74	1,97	2,16
CYS	1,26	1,33	1,36	1,22	1,97	1,32	1,76	1,78
VAL	3,70	3,69	4,14	3,74	4,35	3,96	4,44	4,35
MET	2,68	2,97	3,03	2,98	1,59	1,48	1,66	1,71

PHE	4,61	4,65	5,47	5,04	4,75	4,40	4,86	4,74
ILE	2,81	2,78	3,20	2,87	3,36	3,00	3,49	3,28
LEU	7,09	7,20	7,98	7,30	6,90	6,37	7,01	6,99
LYS	3,97	3,95	3,05	2,75	7,68	6,84	7,20	7,22
PRO	4,28	4,02	2,26	3,97	3,33	2,81	3,48	4,27

Aminoácidos libres (mg/g muestra)

Muestras duplicadas	ARROZ NATIVO		ARROZ MW		QUINOA NATIVA		QUINOA MW	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ASP	<LD	<LD	<LD	<LD	0,28	0,31	0,21	0,22
GLU	<LD	<LD	<LD	<LD	0,96	1,06	0,26	0,28
ASN	<LD	<LD	<LD	<LD	0,09	0,09	0,08	0,08
GLN	<LD	<LD	<LD	<LD	0,36	0,38	0,12	0,12
SER	<LD	<LD	<LD	<LD	0,15	0,15	0,13	0,14
HIS	<LD	<LD	<LD	<LD	0,28	0,29	<LD	0,06
GLY	<LD	<LD	<LD	<LD	0,10	0,10	0,09	0,08
THR	<LD	<LD	<LD	<LD	0,09	0,09	0,09	0,09
ARG	0,06	<LD	<LD	<LD	0,86	0,90	0,44	0,48
ALA	0,06	<LD	<LD	<LD	0,27	0,28	0,25	0,27
TYR	<LD	<LD	<LD	<LD	0,12	0,12	0,11	0,13
CYS	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
VAL	<LD	<LD	<LD	<LD	0,17	0,17	0,14	0,14
MET	<LD	<LD	0,06	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
PHE	<LD	<LD	<LD	<LD	0,07	0,07	<LD	<LD
ILE	<LD	<LD	<LD	<LD	0,07	0,07	0,06	0,06
LEU	<LD	<LD	<LD	<LD	0,12	0,12	0,09	0,10
LYS	<LD	<LD	0,07	0,06	0,09	0,11	<LD	0,06
TRP	<LD	<LD	<LD	<LD	0,09	0,08	0,07	0,09
PRO	<LD	<LD	<LD	<LD	0,23	0,24	0,24	0,23

<LD: < 0.05 (límite de detección)

Aminoácidos libres (mg/g muestra)								
Muestras duplicadas	TEF NATIVO		TEF MW		TS NATIVO		TS MW	
	1	2	1	2	1	2	1	2
ASP	0,16	0,16	0,14	0,17	0,12	0,08	<LD	<LD
GLU	0,27	0,26	<LD	<LD	0,34	0,27	0,12	0,11
ASN	0,46	0,46	0,3	0,34	0,12	0,09	0,15	0,13
GLN	0,05	0,05	0,11	0,13	0,11	0,10	0,07	0,07
SER	0,12	0,12	0,16	0,19	<LD	<LD	0,13	0,11
HIS	0,06	0,06	<LD	<LD	0,11	0,1	0,15	0,14
GLY	<LD	<LD	0,08	0,11	0,10	0,08	0,17	0,15
THR	<LD	<LD	0,09	0,11	<LD	<LD	0,14	0,13
ARG	0,31	0,31	0,29	0,37	0,44	0,29	0,45	0,44
ALA	0,15	0,15	0,31	0,35	0,16	0,14	0,35	0,34
TYR	<LD	<LD	<LD	<LD	0,08	0,06	0,11	0,11
CYS	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
VAL	0,08	0,08	0,16	0,18	0,09	0,06	0,18	0,17
MET	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,09	0,08
PHE	<LD	<LD	<LD	<LD	0,07	0,08	0,13	0,14
ILE	<LD	<LD	<LD	0,06	<LD	<LD	0,09	0,08
LEU	<LD	<LD	<LD	0,13	<LD	<LD	0,11	0,10
LYS	<LD	<LD	<LD	0,15	0,19	0,17	0,27	0,26
TRP	0,08	0,08	0,07	0,09	0,12	0,08	0,15	0,13
PRO	<LD	0,06	<LD	0,16	<LD	<LD	<LD	<LD

<LD: < 0.05 (límite de detección)