

Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

CURSO 2018/2019

TRABAJO DE FIN DE GRADO:

“Caracterización proteica de harinas sin gluten de tef y arroz nativas y modificadas por tratamiento microondas y de ultrasonidos”

Autora: Emma Cantero Bahillo

Tutor: Dr. Francisco Javier Arias Vallejo

Tutor externo: Dra. Felicidad Ronda Balbás

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN	7
a) Tef:.....	8
b) Arroz:.....	9
Tratamiento microondas y de ultrasonidos:	10
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. MATERIAL DE LABORATORIO	11
4.1.1. Harinas:.....	11
4.1.2 Equipos y material fungible (ANEXO I)	12
4.1.3 Reactivos (ANEXO II)	12
4.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	12
a) Humidificación de harinas.....	12
b) Tratamiento microondas	13
c) Tratamiento ultrasonidos	13
d) Tratamiento con urea.....	14
e) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	14
f) Colorimetría	15
g) Fraccionamiento proteico.....	15
h) Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	17
i) Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	17
j) Análisis estadístico	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Humedad de las harinas tratadas con microondas	19
5.2. Puesta a punto para el análisis proteico mediante SDS-PAGE.....	19
5.3. Análisis del contenido proteico de los extractos crudos de harinas de tef y arroz mediante SDS-PAGE	20
5.3.1. Análisis de las muestras tratadas con microondas.....	20
5.3.2. Análisis de las muestras tratadas con ultrasonidos.....	23
5.4. Color de las harinas nativas y tratadas con microondas y ultrasonidos.....	24

5.5. Análisis del fraccionamiento proteico mediante SDS-PAGE de la harina de tef blanco con y sin tratamiento microondas.....	26
5.6. Análisis de todas las harinas y fracciones proteicas mediante FTIR	28
5.7. Análisis de las harinas nativas y tratadas con microondas mediante DSC	32
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36
8. ANEXOS	40
ANEXO I (Equipos y material fungible).....	40
ANEXO II (Reactivos).....	42
ANEXO III (Figuras FTIR).....	43
ANEXO IV (Figuras DSC).....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de las muestras de harina.	12
Tabla 2. Composición de los geles separador y concentrador para un gel de electroforesis al 12%.....	14
Tabla 3. Composición PLB x5.....	15
Tabla 4. Humedad de las harinas tratadas con microondas.	19
Tabla 5. Valores de la colorimetría de la harina nativa, con tratamiento microondas y de ultrasonidos.	25
Tabla 6. Entalpía y temperatura de pico de procesos endotérmicos evaluados mediante DSC en las harinas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801) nativas y tratadas con microondas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diagrama del fraccionamiento proteico de la harina de tef blanco nativa y tratada con microondas.	18
Fig. 2. Comparación de la composición proteica de TB, TM y A801 con diferentes tiempos de extracción mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras.	20
Fig. 3. Análisis de TB, TM y A801 con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras.	21
Fig. 4. Análisis de TB, TM y A801 con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras.	21
Fig. 5. Análisis de las muestras MW+ tratadas con urea mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras.	22
Fig. 6. Análisis de las muestras MW+ tratadas con urea mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras.	22
Fig. 7. Análisis de TB y AEES con y sin US mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras.	24
Fig. 8. Análisis de TB y AEES con y sin US mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras.	24
Fig. 9. Análisis del fraccionamiento proteico del tef blanco con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras.	26
Fig. 10. Análisis del fraccionamiento proteico del tef blanco con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras.	26
Fig. 11. Análisis de los espectros FTIR de las harinas nativas de arroz A801, arroz AEES, tef blanco y tef marrón.	29
Fig. 12. Análisis de los espectros FTIR de la harina de tef blanco nativa y tratada con microondas y ultrasonidos.	30
Fig. 13. Análisis de los espectros FTIR de BSA y la fracción de albúmina de la harina de tef nativa y tratada con microondas.	31
Fig. 14. Picos 1 y 2 de la harina de tef blanco nativa y pico 1 de la tratada con microondas (MW) obtenidos en el análisis mediante DSC.	33
Fig. 15. Pico 3 obtenido en el análisis mediante DSC de las harinas nativas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801).	34
Fig. 16. Segundo barrido de DSC en las harinas nativas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801).	34

ABREVIATURAS EMPLEADAS

TG2: Transglutaminasa tisular

TB: Harina de tef blanco

TM: Harina de tef marrón

A801: Harina de arroz variedad A801

AEES: Harina de arroz variedad AEES

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

PSA: Persulfato amónico

TEMED: N,N,N',N' – tetrametilenodiamina

2-ME: 2-mercaptoetanol

PLB: Protein loading buffer

MQ: Agua ultrapura

MW: Tratamiento microondas

US: Tratamiento ultrasonidos

Al: Albúminas

Gb: Globulinas

Pl: Prolaminas

Gt: Glutelinas

DTT: 1,4 – dithiothreitol

ANOVA: Análisis de varianza

RESUMEN

La industria alimentaria se está esforzando en conseguir alimentos sin gluten con buenas características nutritivas y organolépticas. Para conseguirlo, las harinas de cereales sin gluten o pseudocereales de alto valor nutricional son sometidas a diferentes tratamientos físicos entre los que se encuentran el tratamiento microondas y de ultrasonidos. La bibliografía actual se basa en las modificaciones que dichos tratamientos producen en el almidón, sin centrarse en el efecto proteico. Por consiguiente, este trabajo se ha centrado en el efecto que dichos tratamientos físicos producen en las proteínas de las harinas de cereales sin gluten de tef y arroz.

El análisis mediante SDS-PAGE no mostró diferencias entre las harinas nativas y las tratadas con ultrasonidos, pero sí entre las harinas nativas y las tratadas con microondas, sobre todo en el caso del tef donde desaparecieron gran cantidad de bandas proteicas. Con la idea de optimizar la extracción de proteínas de las harinas tratadas con microondas, éstas fueron tratadas con urea, sin obtener mejores resultados. El análisis estadístico de los datos obtenidos en la colorimetría indicó un oscurecimiento significativo en las harinas tratadas con microondas, posiblemente debido a la reacción de Maillard. Se realizó el fraccionamiento proteico de la harina de tef nativa y tratada con microondas para adquirir las cuatro fracciones proteicas descritas por Osborne (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas), sin obtenerse la fracción de prolaminas de la harina tratada con microondas. Todas las fracciones proteicas se analizaron mediante SDS-PAGE. Los espectros obtenidos mediante el análisis de FTIR de las fracciones proteicas indicaron que las muestras obtenidas no estaban compuestas únicamente por proteína, y que su contenido disminuía en el caso de las fracciones de la harina tratada con microondas. Sin embargo, no se pudieron afirmar diferencias significativas entre los espectros de las harinas nativas y las tratadas con microondas y ultrasonidos. El análisis mediante DSC de las harinas nativas y tratadas con microondas mostró dos picos en torno a 55 y 80°C indicando posibles desnaturalizaciones proteicas.

Palabras clave: Harina sin gluten, tef, arroz, SDS-PAGE, tratamiento microondas, tratamiento ultrasonidos, fraccionamiento proteico, colorimetría, DSC, FTIR.

ABSTRACT

The food industry is striving to get gluten-free food with good nutritional and organoleptic characteristics. To achieve this, gluten-free cereal flours or pseudocereals of high nutritional value are subjected to different physical treatments including microwave and ultrasound treatment. The current bibliography is based on the changes that these treatments produce in the starch, without focusing on the protein effect. Therefore, this work has focused on the effect that these physical treatments produce on the proteins of the gluten-free cereals of tef and rice.

The analysis by SDS-PAGE showed no difference between the native flours and the treated with ultrasound, but between the native flours and the microwave treated, especially in the case of tef where many protein bands disappeared. With the idea of optimizing the extraction of proteins from the flours treated with microwaves, these were treated with urea, without obtaining better results. The statistical analysis of the data obtained in colorimetry indicated a significant darkening in the flours treated with microwaves, possibly due to the Maillard reaction. The protein fractionation of the native tef flour and microwave-treated flour was made to acquire the four protein fractions described by Osborne (albumins, globulins, prolamins and glutelins), without obtaining the fraction of prolamines of the flour treated with microwaves. All protein fractions were analyzed using SDS-PAGE. The spectra obtained by the FTIR analysis of the protein fractions indicated that the samples obtained were not composed only by protein, and that their content decreased in the case of fractions of the flour treated with microwaves. However, significant differences between the spectra of the native flour and those treated with microwaves and ultrasounds could not be affirmed. DSC analysis of native flour and microwave-treated flour showed two peaks around 55 and 80°C indicating possible protein denatures.

Key words: gluten-free flour, tef, rice, SDS-PAGE, microwave treatment, ultrasonic treatment, protein fractionation, colorimetry, DSC, FTIR.

1. INTRODUCCIÓN

El gluten se define como una fracción proteica insoluble en agua y en 0,5M NaCl, comprendida por gliadinas y gluteninas (1:1). Es una proteína de almacenamiento en muchos cereales, tales como el trigo, la cebada, el centeno, la espelta, el kamut, el triticale y algunas variedades de avena, así como en sus variedades híbridas y derivados de los mismos. (Molina-Rosell, 2013; Shumoy, Pattyn, & Raes, 2018)

La enfermedad celiaca es un trastorno inflamatorio del intestino delgado que padecen algunos individuos genéticamente susceptibles al ingerir gluten de trigo y otras prolaminas. Los péptidos del gluten modificados por la transglutaminasa tisular (TG2) van a estimular a los linfocitos T CD4⁺ con restricción de moléculas HLA-DQ2/DQ8, los cuales van a producir citocinas proinflamatorias (Arranz & Garrote, 2010). Sin embargo, para el desarrollo de la enfermedad deben involucrarse otros factores, puesto que el 30% de la población general expresa HLA-DQ2 y, evidentemente, solo una minoría de éstos es susceptible de desarrollarla. Tiene una prevalencia cercana al 1% de la población general, la cual tiende a ser mayor en países europeos, y es 2 a 3 veces más común en mujeres que en hombres, relación que decrece después de los 65 años. Se estima que hay un número importante de pacientes asintomáticos no diagnosticados (J. & P., 2015). El tratamiento fundamental es una dieta libre de gluten de por vida, por lo que las personas celiacas no pueden consumir los cereales mencionados anteriormente.

Según el Reglamento (CE) nº41/2009 de la Comisión, de 20 de enero de 2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (European Commission, 2009), los términos «contenido muy reducido de gluten» o «exento de gluten» en el etiquetado se utilizan para indicar un contenido de gluten que no excede de 100 mg/kg y de 20 mg/kg respectivamente. Considerándose por la AECOSAN alimentos apropiados de consumo ordinario aquellos que aseguren un contenido en gluten inferior a 20 mg/kg.

Los cereales son la base de la alimentación para la mayoría de la población mundial y se encuentran en la base de la pirámide nutricional recomendada por las distintas guías nutricionales. Por ello, las personas con enfermedad celiaca pueden llevar una alimentación adecuada incluyendo cereales sin gluten y pseudocereales entre los que se encuentran el arroz, el maíz, el trigo sarraceno, el tef, el sorgo, el mijo, la quinoa y el amaranto, así como tubérculos y legumbres, cuyas harinas se perciben como ingredientes potenciales en el desarrollo de numerosos productos a nivel mundial (Molina-Rosell, 2013).

En este trabajo se analizan harinas sin gluten procedentes de tef y arroz, las cuales se están empleando cada vez más en la formulación de alimentos sin gluten.

a) Tef:

El tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) es un cereal tropical de descendencia africana, originario de Etiopía y Sudán. Pertenece a la familia de las Poaceae, subfamilia Eragrostoidae, tribu Eragrosteae y género Eragrostis. Se conocen cerca de 350 especies dentro del género Eragrostis, de la cual el tef es la única especie cultivada. Puede prosperar en condiciones climáticas desfavorables y durante el almacenamiento es menos susceptible que otros cereales a ataques de gorgojos y otras plagas comunes. (Tatham *et al.*, 1996; Gebremariam *et al.*, 2014; Zhu, 2018)

Su grano de pequeño tamaño (0.61-1.17 mm) tiene una gama de colores que oscila de blanco lechoso a marrón oscuro, siendo los más comunes el blanco, blanco-cremoso, marrón claro y marrón oscuro. La harina siembre va a ser de grano entero (germen y salvado incluido), lo que deriva en un alto contenido en fibra y nutrientes en general (Gebremariam *et al.*, 2014).

Como bien indican muchos autores (Gebremariam *et al.*, 2014; Hager, Wolter, Jacob, Zannini, & Arendt, 2012; Abebe, Collar, & Ronda, 2015; Adebowale, Emmambux, Beukes, & Taylor, 2011; Zhu, 2018) el tef tiene una buena composición nutricional. Está constituido principalmente por almidón, al igual que otros cereales, siendo su cantidad superior incluso a la del trigo. Los niveles de proteína oscilan entre el 9-13% dependiendo de la variedad, siendo esta proporción superior a la de otros cereales. Contiene los 8 aminoácidos esenciales y las prolaminas constituyen la fracción proteica mayoritaria. Posee un buen perfil lipídico, rico en ácidos grasos insaturados. También es rico en calcio, hierro, magnesio, fósforo, sodio, zinc, vitaminas C, A, K y vitaminas del grupo B.

Presenta ciertos beneficios para la salud, entre los que destacan su capacidad para mejorar los niveles de hemoglobina y ayudar a prevenir la incidencia de anemia y diabetes. Además, su alta concentración en calcio hace que sea un excelente cereal para prevenir problemas de salud asociados a un bajo consumo de éste, como la osteoporosis y el debilitamiento del esqueleto y los dientes (Gebremariam *et al.*, 2014; Zhu, 2018).

Este cereal se suele consumir como injera (pan plano fermentado), kitta (pan sin levadura), tella (cerveza opaca), gachas de bebidas locales y sopa. Recientemente está

captando la atención de la industria alimentaria al ser un grano libre de gluten que engloba ventajas nutricionales muy apreciadas (Abebe & Ronda, 2015; Zhu, 2018).

b) Arroz:

El arroz (*Oryza sativa L.*) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Poaceae. Constituye la base de la alimentación para alrededor de 3,5 mil millones de personas en todo el mundo, y hoy en día se cultiva en más de 100 países, representando China y la India más del 50% de la producción global. (Amagliani *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018)

La composición nutricional varía considerablemente dependiendo de los factores genéticos, las influencias ambientales, el tratamiento con fertilizantes, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento. En general, está compuesto mayoritariamente por almidón (en torno al 80%), siendo la proteína el segundo componente más abundante, aunque su contenido es relativamente pequeño (7-9%), inferior en comparación con otros cereales. Una característica particular es que las prolaminas, que suelen representar la principal proteína de almacenamiento en los cereales, es superada por las glutelinas, proteína principal del arroz (Hager *et al.*, 2012; Amagliani *et al.*, 2017).

El arroz integral es comúnmente procesado dando lugar al arroz blanco o refinado, el cual tiene una mayor aceptación comercial. Sin embargo, el arroz integral contiene mayor cantidad de proteínas y grasas, además de ser rico en fibra, vitaminas (B₃ y B₆) y minerales (hierro, zinc y manganeso) (Valero *et al.*, 2018; Molina *et al.*, 2019). Según el libro de Valero *et al.*, 2018, publicado por la Fundación Española de Nutrición (FEN), en el refinamiento y pulido del arroz se puede llegar a perder hasta el 50% de minerales y el 85% de vitaminas del grupo B.

A pesar de su bajo contenido proteico, la harina de arroz es una de las más utilizadas en la industria alimentaria debido a que sus proteínas se consideran hipoalergénicas y por estar exenta de gluten. Gracias a los tratamientos alcalinos, enzimáticos y físicos se pueden extraer las proteínas de la harina o del salvado de arroz para emplearlas como ingredientes de valor añadido en productos nutricionales, incluyendo suplementos de nutrición deportiva como alternativa a las proteínas de soja y leche (más comúnmente utilizadas), y en fórmulas infantiles (Amagliani *et al.*, 2017). Además, el almidón de arroz se utiliza como aditivo en diversos alimentos, tales como productos de panadería, helados, yogures y aderezos para ensaladas (Zavareze, Storck, de Castro, Schirmer, & Dias, 2010).

Tratamiento microondas y de ultrasonidos:

La industria alimentaria emplea cada vez más el tratamiento hidrotérmico con microondas y el tratamiento con ultrasonidos con la finalidad de tratar harinas sin gluten y obtener productos con mejores características organolépticas.

El tratamiento con microondas consiste en ondas electromagnéticas, entre 1 y 300 GHz, que las moléculas polares e ionizables son capaces de absorber de forma muy eficiente. La energía se absorbe a nivel molecular, lo que provoca un rápido aumento de la temperatura en todo el volumen de la muestra que dependerá de la humedad de la harina (Villanueva, Harasym, Muñoz, & Ronda, 2018). Según la intensidad del tratamiento algunas enzimas pueden inactivarse e incluso las proteínas pueden perder funcionalidad.

El tratamiento con ultrasonidos consiste en la aplicación de ondas mecánicas, entre 15 y 20 kHz o más, que van a provocar la despolimerización del almidón. El efecto de dicho tratamiento sobre la muestra va a depender de la frecuencia, la temperatura y la duración del tratamiento, entre otros factores. Además, su uso está aumentando al considerarse un proceso respetuoso con el medio ambiente, pues se reduce el empleo de productos químicos, el consumo de energía y la producción de desechos (Sujka, 2017; Zuo *et al.*, 2009).

La finalidad de este estudio se basa en determinar el efecto que dichos tratamientos físicos tienen sobre las proteínas de las harinas de cereales sin gluten, ya que prácticamente todos los estudios se centran en el efecto positivo que muestran ambos sobre el almidón, pero no proporcionan información sobre su efecto proteico.

2. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es la continuación al realizado por Manso, 2018, que, a su vez, pertenece a un estudio mucho más amplio realizado por el grupo de investigación PROCEREALtech en el Edificio LUCIA de la Universidad de Valladolid. Este grupo de investigación ha estado empleando el tratamiento hidrotérmico con microondas para producir cambios en el almidón de harinas de diferentes granos sin gluten (cereales y pseudocereales) que permitan mejorar las características físicas y organolépticas de los panes fabricados con dichas harinas. Entre sus publicaciones se encuentran: Pérez-Quirce, Ronda, Melendre, Lazaridou, & Biliaderis, 2016; Pérez-Quirce, Ronda, Lazaridou, & Biliaderis, 2017; Villanueva *et al.*, 2018; Villanueva, Harasym, Muñoz, & Ronda, 2019.

Actualmente, también se está estudiando el tratamiento de las harinas con ultrasonidos. Este procedimiento induce cambios en los gránulos de almidón pudiendo modificar las propiedades fisicoquímicas, ayudando a obtener productos con mejores características organolépticas.

En la literatura hay muchos estudios sobre lo que ocurre con el almidón de las harinas tratadas por dichos procesos físicos, pero no existen prácticamente estudios previos sobre lo que ocurre con las proteínas. Por ello, se ha creído conveniente estudiar en mayor profundidad qué ocurre con las proteínas de las harinas sin gluten que han sufrido un tratamiento hidrotérmico con microondas o un tratamiento con ultrasonidos.

3. OBJETIVOS

Como objetivo principal del estudio se contempla determinar el efecto de los tratamientos con microondas y ultrasonidos sobre las proteínas de las harinas de tef y arroz.

Objetivos secundarios:

- Puesta a punto de los procedimientos empleados en la caracterización proteica
- Análisis y estudio del efecto del tratamiento microondas sobre la composición de las harinas
- Análisis y estudio del efecto del tratamiento con ultrasonidos sobre la composición de las harinas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL DE LABORATORIO

4.1.1. Harinas:

- Harina de tef blanco (TEB438): variedad DZ-CV-438, suministrada por el Centro Debre Zeit del Instituto Etíope de Investigación Agraria.
- Harina de tef marrón (TEB442): variedad DZ-CV-442, suministrada por el Centro Debre Zeit del Instituto Etíope de Investigación Agraria.
- Harina de arroz (A801): Suministrada por Emilio Esteban S.A. (Valladolid). Lote: 19010801.
- Harina de arroz (AEES): Suministrada por Emilio Esteban S.A. (Valladolid).

La composición proximal de las harinas se recoge en la tabla 1.

Tabla 1. Composición proximal de las muestras de harina. Los valores de proteína, grasa y ceniza fueron determinados por el laboratorio Agrolab Ibérica S.L.U. en Burgos, y la humedad se determinó en el laboratorio (AACC Method 44-15A)

Harinas				
Composición proximal	Tef blanco	Tef marrón	Arroz (A801)	Arroz (AEES)
Humedad (%)	11.61	10.68	13.33	12.34
Proteína (%)	8.93	8.92	7.60	n.d
Grasa (%)	2.53	3.12	2.06	n.d
Cenizas (%)	2.05	2.29	0.34	n.d

n.d: no determinado

4.1.2 Equipos y material fungible (ANEXO I)

4.1.3 Reactivos (ANEXO II)

4.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS

a) Humidificación de harinas

Para conocer la humedad inicial de cada harina, se pesaron 2 g de cada una por duplicado en unas cápsulas de metal atemperadas previamente en un desecador, las cuales se introdujeron durante 1h en una estufa a 130°C. Después, se dejaron atemperar en el desecador durante 45 min y se pesaron de nuevo para calcular la humedad. Para ello, se empleó la siguiente ecuación:

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

Una vez conocida la humedad inicial, se calculó la cantidad de agua que hay que añadir para conseguir un 30% de humedad en cada harina. Dicha cantidad de agua se pulverizó sobre la harina en una mezcladora.

La harina humedecida se guardó en botes de polietileno cerrados que se conservaron en refrigeración a 3°C durante 24h para equilibrar la humedad. Pasado ese tiempo, se volvió a calcular la humedad para cerciorar que se había conseguido la buscada.

Una vez asegurada dicha humedad, se prepararon muestras de 100 g en bolsas de polipropileno y poliamida, las cuales se congelaron a -20°C hasta el momento de llevar a cabo el tratamiento hidrotérmico.

b) Tratamiento microondas

Se siguió el procedimiento descrito por Villanueva *et al.*, 2018, para tratar las muestras de harinas humedecidas al 30%.

Para ello, se necesitaron 100 g de muestra que se introdujeron en un recipiente cilíndrico de polietileno cerrado con una película de plástico a la que se le hicieron unos pequeños agujeros, el cual fue sometido a un giro continuo dentro de un microondas a una velocidad de 60-70 rpm, gracias a un motor externo, para que la radiación electromagnética se distribuyera de forma homogénea. Dicho microondas estaba modificado y presentaba una potencia máxima de 900W (modelo R342INV, Sharp). La duración del tratamiento fue de 24 min, de los cuales, en cada minuto, 20 s estuvo funcionando y 40 s parado para recuperar el vapor de agua. La harina sufrió un tratamiento hidrotérmico total de 8 min a máxima potencia (900W), alcanzando la muestra una temperatura de 150°C aproximadamente.

Una vez realizado el tratamiento, la harina se molió dos veces consecutivas en un molino eléctrico para que quedase fina y homogénea.

c) Tratamiento ultrasonidos

Al tratarse de ondas mecánicas que viajan a través de un medio, las muestras de harina deben encontrarse en disolución para que el impacto de las ondas sea uniforme y no superficial. Por lo tanto, se prepararon las muestras a una concentración de un 10% aproximadamente (22-23 g de harina en 220-230 g de agua).

Las muestras se trataron durante 60 min a 24 kHz y a una temperatura de 20±3°C (para mantener la temperatura se empleó un baño térmico). De los 60 min que dura el tratamiento, de cada minuto, 48 s estuvo encendido y 12 s apagado, por lo que las muestras sufrieron un tratamiento de 48 min en total. Una vez tratadas, se congelaron y liofilizaron. El producto resultante se disgregó manualmente y se hizo pasar íntegramente por un tamiz de 250 micras para obtener una muestra fina y homogénea. La humedad de las muestras osciló entre un 3-7% aproximadamente.

El equipo empleado fue un modelo Hielscher UP400St con una sonda de titanio S24d22D (22 mm de diámetro) cuya amplitud máxima es de 24 kHz, en el cual podemos elegir la amplitud o la potencia y, según la que elijamos, la otra se ajusta automáticamente. De este modo, se eligió la máxima amplitud y la potencia se fue estabilizando de forma automática.

d) Tratamiento con urea

El tratamiento con urea se empleó en las muestras tratadas con microondas a fin de mejorar la extracción proteica. Para ello, se partió de 120 mg de arroz y de 160 mg de cada variedad de tef, y se mezclaron con 4 mL de urea 8M (obteniendo así unas muestras al 3% y 4%, respectivamente). Las muestras se sometieron a agitación continua en vaivén durante 24h a 4°C y, después, se dializaron contra 250 mL de agua destilada durante 24h, sin cambio de agua, para obtener una concentración de urea 0.5M.

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

Para el análisis proteico se aplicó la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAGE) con detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), siguiendo el método Laemmli (1970). El gel de electroforesis que se empleó estaba compuesto por un gel concentrador (*stacking gel*) al 4% (w/v) que sirve para concentrar la muestra, y un gel separador (*resolving gel*) al 12% (w/v) en el que se produce la separación proteica según el peso molecular gracias al paso de una corriente eléctrica. La composición del gel concentrador y del separador se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de los geles separador y concentrador para un gel de electroforesis al 12%.

Para un gel	Gel separador al 12%	Gel concentrador al 4%
MQ	3,25 mL	1,585 mL
Tris 1,5M pH 8,8	1,88 mL	-
Tris 0,5M pH 6,8	-	0,625 mL
Acrilamida	2,25 mL	250 µL
SDS 10%	75 µL	18,75 µL
PSA 10%	50 µL	18,75 µL
TEMED	10 µL	2,35 µL
Volumen total	10,52 mL	2,50 mL

Para extraer las proteínas de las muestras se empleó el *protein loading buffer* o tampón de carga x1 (PLB x1) (dilución 5 veces del PLB x5), o directamente el PLB x5, en condiciones reductoras o no reductoras. La composición de este último se encuentra indicada en la tabla 3.

Tabla 3. Composición PLB x5.

Componente	Cantidad usada	Concentración final
Tris 1M pH 6,5	1,56 mL	312,5 mM
SDS	0,5 g	10%
Glicerol	5,5 mL	50%
2-ME*	1,25 mL	25%
Azul de bromofenol 2%	16 µL	0,00625%

*Le proporciona al tampón la capacidad reductora. El tampón en condiciones no reductoras no lo contiene y se emplea agua destilada o MQ en su lugar.

Para conocer los pesos moleculares de las proteínas se utilizó de referencia un *marker* o estándar de pesos moleculares proteicos (Thermo Scientific protein biology), cuyas bandas corresponden a: β-galactosidasa (116kDa), albúmina de suero bovina (66.2kDa), ovoalbúmina (45kDa), lactato hidrogenasa (35kDa), REase Bsp98I (25kDa), β-lactoalbúmina (18.4kDa) y lisozima (14.4kDa).

Las electroforesis se llevaron a cabo durante 1h y 15 min aproximadamente, a una intensidad de 25 mA por gel y 300V. Una vez finalizadas, se separó el gel concentrador del gel separador y se tiñó este último con Coomassie Brilliant Blue durante unos 15-20 min y, pasado este tiempo, se destiñeron con agua caliente del grifo durante 4-5h para poder fotografiar y ver con claridad las bandas proteicas.

f) Colorimetría

Para realizar las mediciones del color de las harinas se utilizó el espectrofotómetro PCE-CSH5 (Tobarra, Albacete). Los resultados, procedentes del promedio de 5 mediciones, se obtuvieron en las coordenadas CIE L*a*b* empleando el iluminante estándar D65 y el observador estándar 10°. El matiz (h), el croma (C*) y la diferencia de color de las harinas tratadas con respecto a la nativa se calcularon empleando las siguientes ecuaciones (1), (2), (3) respectivamente.

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (1)$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

$$\text{Diferencia de color} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (3)$$

g) Fraccionamiento proteico

El modelo seguido ha sido el descrito por Adebawale *et al.*, 2011 y Taylor, Lottelore Schüssler, & van der Walt, 1984, para harinas sin desgrasar, incluyendo algunas

modificaciones. El modelo de fraccionamiento seguido por dichos autores se basa en el fraccionamiento propuesto por Osborne, 1924, el cual clasifica las proteínas en base a su solubilidad:

- **Albúminas (Ab):** solubles en agua,
- **Globulinas (Gb):** solubles en sal,
- **Prolaminas (Pl):** solubles en alcohol y,
- **Glutelinas (Gt):** solubles en ácidos o bases.

En este trabajo se realizó el fraccionamiento de la harina de tef blanco con y sin tratamiento microondas como se explica a continuación (**fig. 1**).

Extracción de albúminas: se partió de 5 g de harina de cada muestra. Se añadieron 25 mL de agua destilada, se agitó bien para obtener una mezcla homogénea y se sometió a agitación continua en vaivén durante 1h a 4°C, repitiendo este período 3 veces. De cada período de extracción se obtuvo un sobrenadante por centrifugación a 12000 g durante 35 min a 4°C. Los 3 sobrenadantes se juntaron y se dializaron contra 25 L de agua destilada a 4°C durante 72h, con 3 cambios de agua. El extracto dializado se congeló a -20°C y se liofilizó para obtener las albúminas.

Extracción de globulinas: se partió del pellet obtenido tras la extracción de las albúminas. Se añadieron 25 mL de NaCl 1.25M (1:5 w/v) (PanReac), se agitó bien para obtener una mezcla homogénea y se sometió a agitación continua en vaivén a 4°C por 3 períodos, los dos primeros durante toda la noche y el tercero durante 1h. De cada período de extracción se obtuvo un sobrenadante por centrifugación a 12000 g durante 35 min a 4°C. Los 3 sobrenadantes se juntaron y se dializaron contra 25 L de agua destilada a 4°C durante 48h, con 3 cambios de agua. El extracto dializado se congeló a -20°C y se liofilizó para obtener las globulinas. El último pellet obtenido se lavó con 25 mL de agua destilada, se agitó bien para obtener una mezcla homogénea, se sometió a agitación en vaivén durante 1h a 4°C y, por último, se centrifugó a 10000 g durante 20 min, desechando el sobrenadante obtenido para eliminar las sales.

Extracción de prolaminas: se partió del pellet libre de sales obtenido tras la extracción de las globulinas. Se añadieron 25 mL de tercbutanol al 60% (v/v) (Sigma) a temperatura ambiente, se agitó bien para obtener una mezcla homogénea y se sometió a agitación continua en vaivén a 4°C por 3 períodos de extracción, los dos primeros durante 1h y el tercero durante toda la noche. Los 3 sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 12000 g durante 35 min a 4°C se juntaron y se dializaron durante 48h contra 25 L de

agua destilada a 4°C, con 2 cambios de agua. El extracto dializado se congeló a -20°C y se liofilizó para obtener las prolaminas.

Extracción de glutelinas: se partió del pellet obtenido tras la extracción de las prolaminas. Se resuspendió en 100 mL de agua destilada con 2.8 mL de α -amilasa (Termamyl 2X, Novozymes) y se dejó incubando toda la noche a 35°C. Después, se comprobó con Lugol que estuviera libre de almidón y se centrifugó a 12000 g durante 35 min a 4°C, desechando el sobrenadante obtenido. Al pellet resultante se le añadieron 100 mL de agua destilada y se volvió a centrifugar desechando el sobrenadante, repitiendo este proceso de lavado 2 veces más. El sedimento obtenido se congeló a -20°C y se liofilizó para obtener las glutelinas.

h) Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros se registraron en un rango de barrido de 600-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} para 64 exploraciones, empleando un espectrofotómetro Tensor 27 FTIR (Bruker) acoplado a un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). Las muestras se colocaron sobre la superficie de diamante del ATR y se sometieron a presión constante. Los datos obtenidos se analizaron con el software OPUS (versión 6.5), normalizando todos los espectros.

i) Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se empleó el calorímetro diferencial de barrido DSC3 STARe System (Mettler Toledo), previamente calibrado con un estándar de indio y zinc. El método consistió en un calentamiento de 0 a 200°C a una velocidad de 5°C/min, empleando nitrógeno como flujo controlado (50 mL/min). Las muestras se prepararon en cápsulas de aluminio de 40 μL , pesando entre 10 y 15 mg sin añadir agua para evitar la gelatinización del almidón y que este proceso enmascarara la desnaturalización de las proteínas. La temperatura de desnaturalización (°C) y la entalpía del proceso endotérmico (J/g) se calcularon mediante STARe software (versión 16.10).

j) Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies Inc.) para evaluar el efecto del tratamiento microondas y de ultrasonidos sobre el color de las harinas. Los datos se analizaron empleando un análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba LSD de Fisher ($p < 0.05$) para la comparación de las medias.

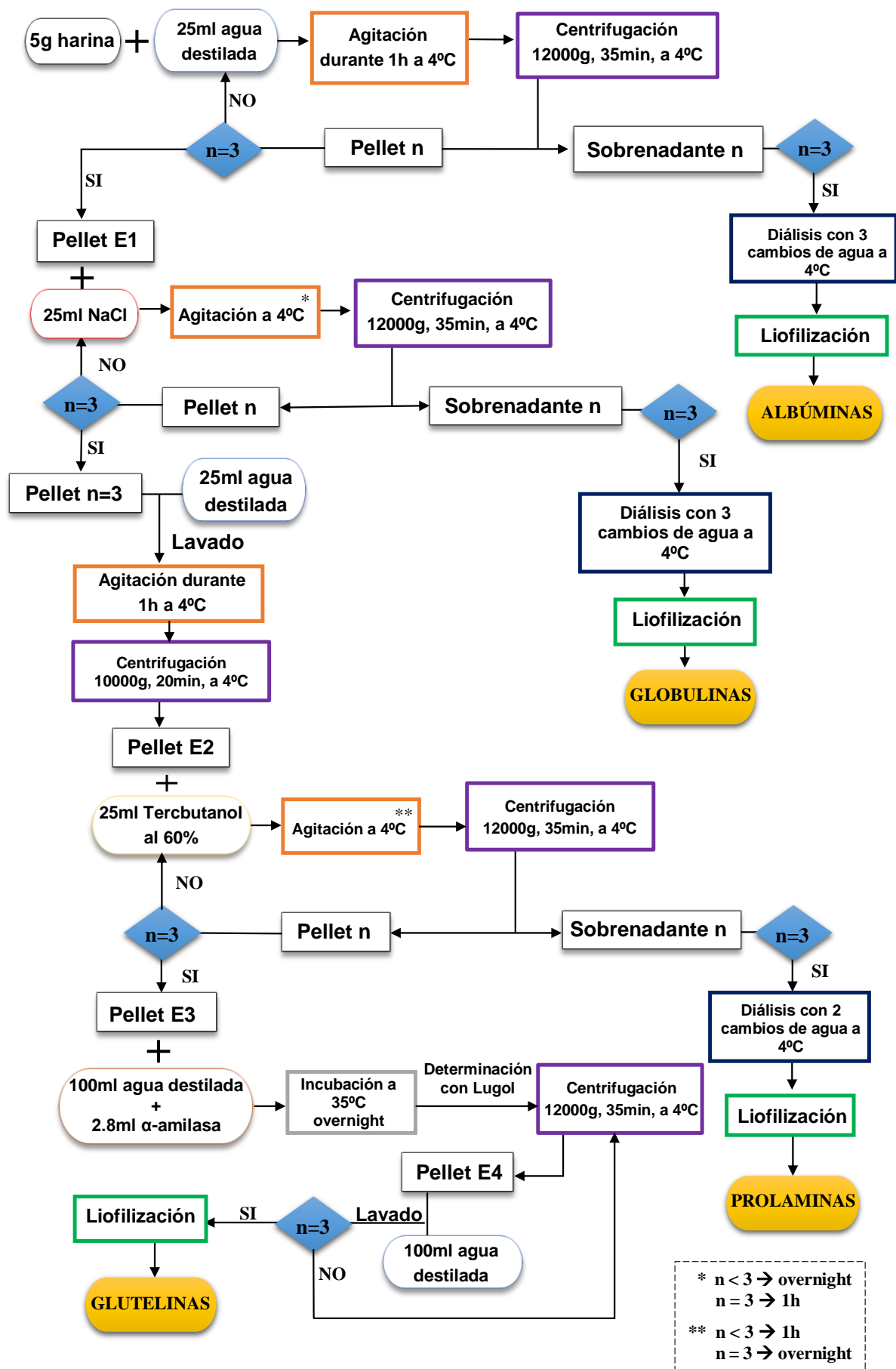


Fig. 1. Diagrama del fraccionamiento proteico de la harina de tef blanco nativa y tratada con microondas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el presente trabajo se pretende dar a conocer cómo afectan los diferentes tratamientos físicos empleados sobre las proteínas de las harinas de tef y arroz, asociadas con su valor nutricional.

Con ello, también se busca dar información válida para futuras investigaciones.

5.1. Humedad de las harinas tratadas con microondas

La humedad de las harinas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801) previo tratamiento con microondas se normalizó a un 30%. Una vez realizado el tratamiento se volvió a determinar la humedad de las harinas tratadas (**tabla 4**) como se explica en el apartado 4.2.a.

Tabla 4. Humedad de las harinas tratadas con microondas.

Harina	Tef blanco	Tef marrón	Arroz (A801)
Humedad (g/100g muestra)	9.65%	8.48%	9.99%

Como indica Villanueva *et al.*, 2018, la humedad de las muestras de harina tras el tratamiento con microondas llega a disminuir hasta valores de un 10% aproximadamente. Esto quiere decir que parte del agua de la harina se evapora debido al calor que se genera durante el tratamiento, gracias a los pequeños agujeros realizados en la película de plástico que cierra el bote de polietileno donde se trata.

5.2. Puesta a punto para el análisis proteico mediante SDS-PAGE

Partiendo del estudio realizado por Manso, 2018, para analizar las muestras se tomó de referencia las concentraciones del 4% para el tef y del 3% para el arroz, así como un tiempo de ebullición de 5 min tras el periodo de extracción, consiguiéndose de esta forma unas condiciones óptimas para realizar la electroforesis y poder visualizar las bandas proteicas.

Sin embargo, se decidió estudiar si había diferencias significativas entre diferentes periodos de extracción. Se analizaron las muestras con un tiempo de extracción de 24, 48 y 72 horas, en agitación continua en vaivén a 4°C, con posterior ebullición de 5 min y centrifugación a 20000 g durante otros 5 min. Se preparó un gel al 12% en condiciones reductoras (**fig. 2**) en el que se pincharon 15 µL de muestra en cada pocillo, lo que corresponde a 53.58 µg de proteína de tef blanco (TB), 53.52 µg de proteína de tef marrón (TM) y 34.2 µg de proteína de arroz (A801).

La figura 2 muestra que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de extracción, por lo que se empleó el de 24h para las muestras estudiadas en el presente trabajo.

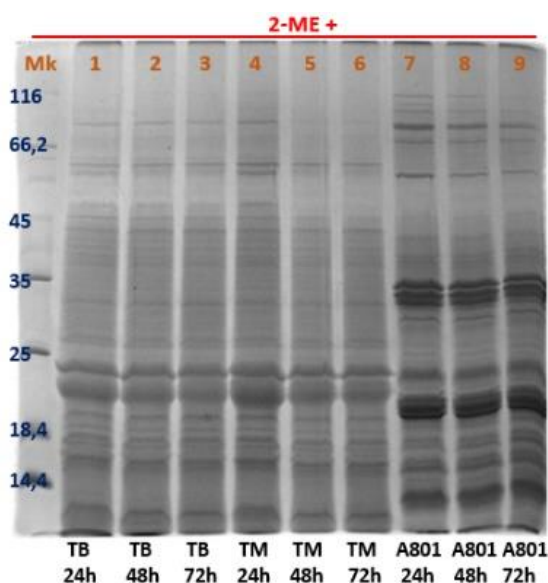


Fig. 2. Comparación de la composición proteica de TB, TM y A801 con diferentes tiempos de extracción mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. TB 24h (1), TB 48h (2), TB 72h (3), TM 24h (4), TM 48h (5), TM 72h (6), A801 24h (7), A801 48h (8), A801 72h (9).

5.3. Análisis del contenido proteico de los extractos crudos de harinas de tef y arroz mediante SDS-PAGE

Tras la puesta a punto para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, se pasó al análisis de las harinas con y sin tratamiento microondas y de ultrasonidos.

5.3.1. Análisis de las muestras tratadas con microondas

Las harinas empleadas en el tratamiento con microondas fueron las dos variedades de tef (blanco y marrón) y la variedad de arroz A801. El tratamiento se realizó según lo expuesto en el apartado 4.2.b y, después, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE. La extracción de las muestras se realizó durante 24h en agitación continua en vaivén a 4°C, con PLB x1 con o sin 2-ME, con una ebullición posterior de 5 min y una centrifugación a 20000 g durante otros 5 min. Se prepararon dos geles al 12%, uno en condiciones reductoras (**fig. 3**) y otro en no reductoras (**fig. 4**), pinchando 15 µL de muestra en cada pocillo, lo que corresponde a la misma cantidad de proteína analizada que en el apartado 5.2.

Si comparamos las harinas de las dos variedades de tef (blanco y marrón) podemos observar que no hay diferencias significativas, ya que muestran el mismo patrón proteico

tanto en condiciones reductoras como en no reductoras. Además, el tratamiento con microondas presenta el mismo efecto en ambas variedades.

Las harinas nativas de tef, en condiciones reductoras, presentan las dos bandas de mayor intensidad entre 18.4-25 kDa, concordando estos resultados con los obtenidos por Manso, 2018; y Moroni *et al.*, 2010. Shumoy *et al.*, 2018, mostró las mayores bandas entre 21-25 kDa. Sin embargo, Abebe *et al.*, 2015, obtuvo las bandas de mayor intensidad entre 45-67 kDa. En condiciones no reductoras, las bandas de mayor intensidad también se encuentran entre 18.4-25 kDa, pero no coinciden con las dos bandas observadas en condiciones reductoras. Abebe *et al.*, 2015, también vuelve a mostrar las bandas de mayor intensidad entre 45-67 kDa.

Las harinas tratadas con microondas muestran una gran disminución en el número de bandas proteicas. En condiciones reductoras desaparecen sobre todo las situadas entre 25-45 kDa, mientras que en condiciones no reductoras desaparecen prácticamente todas las bandas. Manso, 2018, mostró una reducción mucho más drástica en condiciones reductoras.

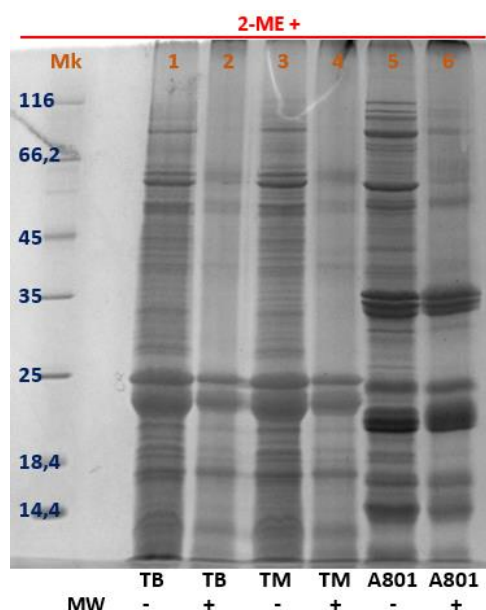


Fig. 3. Análisis de TB, TM y A801 con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. TB- 4% (1), TB+ 4% (2), TM- 4% (3), TM+ 4% (4), A801- 3% (5), A801+ 3% (6).

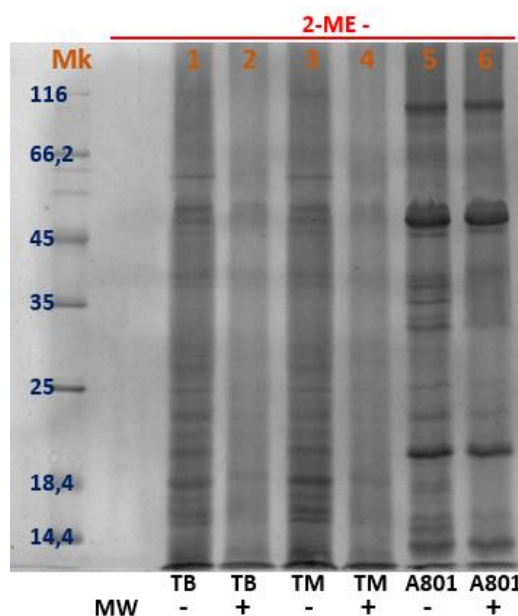


Fig. 4. Análisis de TB, TM y A801 con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras. TB- 4% (1), TB+ 4% (2), TM- 4% (3), TM+ 4% (4), A801- 3% (5), A801+ 3% (6).

En el caso de la harina de arroz (A801) nativa, en condiciones reductoras, las bandas de mayor intensidad se encuentran entre 18.4-25 kDa y 30-35 kDa, concordando con los resultados obtenidos por Manso, 2018; Alonso-Migralles & O'Mahony, 2018; Amagliani *et al.*, 2017; y Abebe *et al.*, 2015, que mostró las bandas de mayor intensidad entre 30-35 kDa. Por otra parte, en condiciones no reductoras la mayor banda se

encuentra entre 45-66.2 kDa. Alonso-Miravalles & O'Mahony, 2018, indica que la banda que aparece en condiciones no reductoras a los 50 kDa se disocia en condiciones reductoras en dos bandas, una entre 25-30 kDa y otra entre 15-20 kDa, correspondiendo con α -glutelina y con subunidades de β -glutelina respectivamente.

La harina de arroz tratada, al igual que lo reportado por Manso, 2018, muestra un ligero descenso en la cantidad de bandas con respecto a la nativa, pero no es tan drástico como en el caso del tef, por lo que dicha pérdida no puede considerarse significativa.

Con la idea de optimizar la extracción de las proteínas de las harinas tratadas con microondas, ya que la desaparición de las bandas pudo deberse a que el tampón de carga empleado no consiguió extraerlas de forma óptima, se realizó un tratamiento con urea como se explica en el apartado 4.2.d. De cada extracto dializado se tomaron 20 μ L y se juntaron con 5 μ L de PLB x5 con o sin 2-ME. La extracción de las muestras se realizó durante 24h en agitación continua en vaivén a 4°C, con posterior ebullición durante 5 min y centrifugación a 20000 g durante otros 5 min. Para realizar el análisis de las muestras mediante SDS-PAGE se prepararon dos geles al 12%, uno en condiciones reductoras (**fig. 5**) y otro en condiciones no reductoras (**fig. 6**), pinchando 20 μ L de muestra en cada pocillo, lo que corresponde, aproximadamente, a 57.15 μ g de proteína de tef blanco, 57.08 μ g de proteína de tef marrón y 36.48 μ g de proteína de arroz (A801).

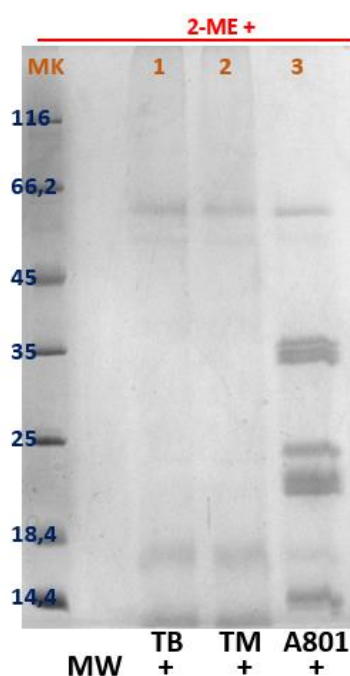


Fig. 5. Análisis de las muestras MW+ tratadas con urea mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. TB 4% (1), TM 4% (2), A801 3% (3).

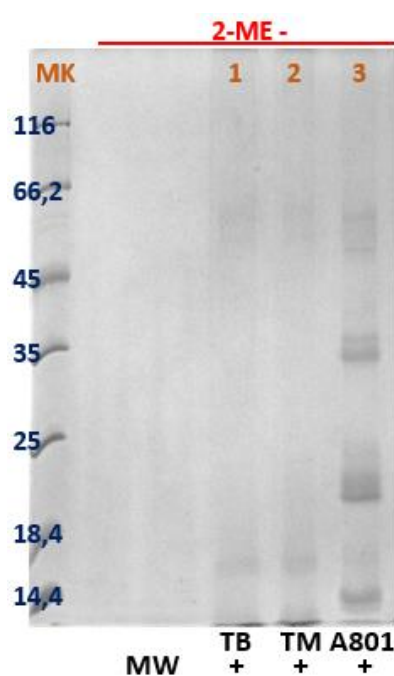


Fig. 6. Análisis de las muestras MW+ tratadas con urea mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras. TB 4% (1), TM 4% (2), A801 3% (3).

Al contrario de lo esperado, la extracción proteica fue muy baja, sobre todo en el caso de las dos variedades de tef.

Tanto en condiciones reductoras como en no reductoras, en ambas variedades de tef solo se consiguen extraer, de forma tenue, las bandas situadas en los rangos de 14.4-18.4 kDa y 45-66.2 kDa.

En el caso de la harina de arroz, se obtienen los mismos resultados en condiciones reductoras y no reductoras, observándose las principales bandas obtenidas en condiciones reductoras sin dicho tratamiento previo con urea (fig. 3. Calle 6) pero de forma mucho más tenue. Li *et al.*, 2018, para una muestra de harina de arroz nativa tratada con urea obtuvo resultados similares.

Esto quiere decir que el tratamiento con urea no es eficaz en la extracción de las proteínas de las harinas de tef y arroz tratadas con microondas. Obteniéndose, en este caso, una mejor extracción sin dicho tratamiento.

La desaparición de las bandas proteicas puede deberse a la incapacidad del tampón de carga empleado de extraer las proteínas de las harinas tratadas con microondas, aunque previamente se trate la muestra con urea. Esta pérdida proteica seguirá siendo objeto de próximas investigaciones.

5.3.2. Análisis de las muestras tratadas con ultrasonidos

Las harinas tratadas con ultrasonidos corresponden a la de tef blanco y a la variedad de arroz AEES. El tratamiento se realizó según lo expuesto en el apartado 4.2.c. Para su análisis mediante SDS-PAGE se tuvieron que normalizar las muestras, siendo la concentración de las harinas tratadas con ultrasonidos de 3.7% para el tef y de 2.68% para el arroz, ya que la humedad de las harinas después de dicho tratamiento es mucho menor en comparación con la humedad que presentan las nativas. La extracción de las muestras se llevó a cabo durante 24h en agitación continua en vaivén a 4°C, con PLB x1 con o sin 2-ME, con una ebullición posterior de 5 min y una centrifugación a 20000 g durante otros 5 min. Se prepararon dos geles al 12%, uno en condiciones reductoras (**fig. 7**) y otro en no reductoras (**fig. 8**), pinchando 15 µL de muestra en cada pocillo, lo que corresponde a 53.58 µg de proteína de tef blanco, sin saber con exactitud la cantidad de proteína de arroz AEES analizada al no conocer su composición proximal, considerando una cantidad parecida a la del arroz A801 (34.2 µg) analizado anteriormente.

Como se puede observar en las figuras 7 y 8, no hay diferencias significativas en las bandas proteicas de las harinas nativas y las tratadas mediante ultrasonidos, tanto en condiciones reductoras como en no reductoras. O'Sullivan *et al.*, 2016, para una muestra de aislado de proteína de arroz tratado con ultrasonidos tampoco obtuvo diferencias con respecto a la muestra sin tratar. Sin embargo, sabemos que este tratamiento produce cambios en el almidón, pudiendo afectar a las propiedades físico-químicas.

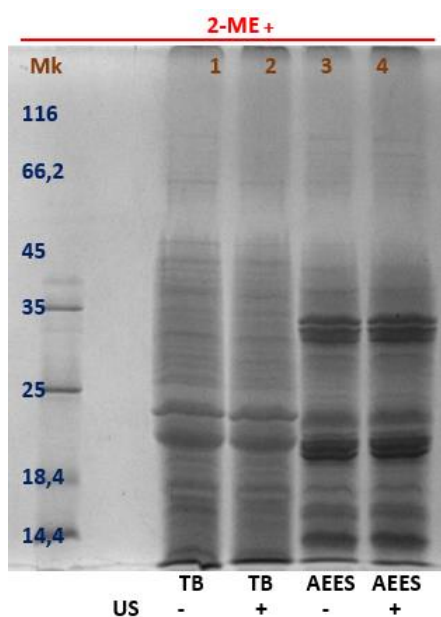


Fig. 7. Análisis de TB y AEES con y sin US mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. TB US- 4% (1), TB US+ 3.7% (2), AEES US- 3% (3), AAES US+ 2.68% (4).

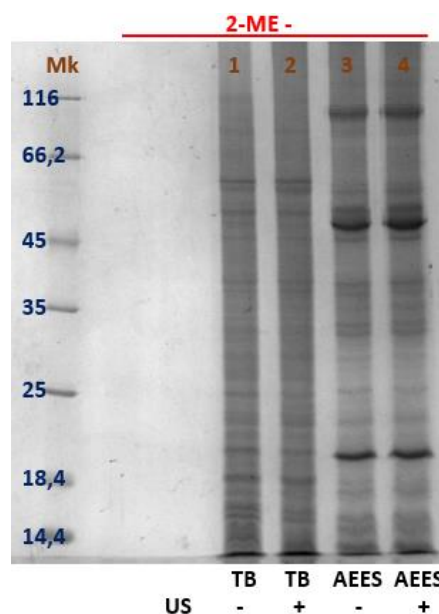


Fig. 8. Análisis de TB y AEES con y sin US mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras. TB US- 4% (1), TB US+ 3.7% (2), AEES US- 3% (3), AAES US+ 2.68% (4).

Actualmente hay varios estudios sobre lo que ocurre en el almidón del arroz al ser tratado con ultrasonidos (Zuo *et al.*, 2009; Setyawati *et al.*, 2016; Sujka, 2017), pero no se han encontrado referencias sobre dicho tratamiento en el tef, ni estudios centrados en lo que ocurre con las proteínas de las harinas tratadas. Según Setyawati *et al.*, 2016, ciertos componentes de la harina de arroz disminuyeron durante el tratamiento, entre los que se encontraba la proteína. Esta reducción proteica pudo deberse a una mayor temperatura de tratamiento (70 °C) y posiblemente al empleo de NaOH.

5.4. Color de las harinas nativas y tratadas con microondas y ultrasonidos

El análisis del color, descrito en el apartado 4.2.f, se realizó sobre las harinas nativas y las tratadas mediante microondas y ultrasonidos.

Según los datos recogidos en la tabla 5, las harinas tratadas con microondas presentaron una L* inferior a las nativas, lo que indica un oscurecimiento. Este oscurecimiento que puede atribuirse a la generación de melanoidinas producidas por la reacción de Maillard fue más acusado en el tef que en el arroz, coincidiendo con el mayor contenido proteico de estas harinas. En general, las harinas tratadas adquirieron un color más vivo y rojizo, indicado por un aumento de C* y una disminución de h, que siempre fluctuó en el intervalo entre 0 y 90. Sólo el tef marrón mostró un ligero, aunque significativo, aumento del tono como consecuencia del tratamiento microondas, lo que indica una tonalidad ligeramente más amarillenta que la harina nativa.

Tabla 5. Valores de la colorimetría de la harina nativa, con tratamiento microondas y de ultrasonidos.

Harina	tratamiento	L*	a*	b*	h	C*	Diferencia de color
TB	Nativa	72.69 d	4.64 d	13.44 g	70.97 d	14.22 f	-
	MW	62.83 c	8.33 e	20.19 i	67.58 c	21.84 i	12.5
	US	75.96 e	2.32 c	9.72 d	76.56 e	9.99 d	5.5
TM	Nativa	55.08 b	8.61 f	13.18 f	56.86 a	15.74 g	-
	MW	46.53 a	11.19 g	17.56 h	57.50 b	20.82 h	9.9
A801	Nativa	84.42 g	0.92 b	5.69 b	80.79 g	5.77 b	-
	MW	81.81 f	2.37 c	10.45 e	77.24 f	10.72 e	5.6
AEES	Nativa	84.79 g	0.98 b	5.92 c	80.64 g	6.0 c	-
	US	86.22 h	-0.02 a	3.66 a	90.33 h	3.66 a	2.9
SE		0.22	0.038	0.07	0.13	0.077	-

Los valores con una letra en común en la misma columna no muestran diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$).

SE: error estándar agrupado obtenido en el ANOVA.

Al contrario de lo que ocurrió con las harinas tratadas con microondas, las tratadas mediante ultrasonidos mostraron un ligero, aunque significativo, aumento de L*, adquiriendo un color más claro con respecto a la harina nativa. Sin embargo, la diferencia de color fue muy pequeña, 6 y 3 para las muestras de tef blanco y arroz respectivamente, por lo que dicho cambio es prácticamente imperceptible. La saturación disminuyó en las muestras tratadas mediante ultrasonidos, lo que demuestra que las harinas tratadas tuvieron un color menos vivo que las nativas.

Las harinas nativas de ambas muestras de arroz apenas mostraron diferencias significativas.

5.5. Análisis del fraccionamiento proteico mediante SDS-PAGE de la harina de tef blanco con y sin tratamiento microondas

Se realizó el fraccionamiento según lo expuesto en el apartado 4.2.g y, después, se analizaron las diferentes fracciones proteicas liofilizadas mediante SDS-PAGE.

Para asegurar que se analizaba cantidad suficiente de proteína, se pesaron 8 mg de albúmina, 8 mg de globulina, 4 mg de prolamina y 4 mg de glutelina del fraccionamiento de la harina nativa, y 16 mg de albúmina, 12 mg de globulina y 12 mg de glutelina del fraccionamiento de la harina tratada con microondas. Se disolvió cada una en 200 μL de PLB x1 sin 2-ME para obtener unas soluciones concentradas de 40, 20, 80 y 60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. De cada solución concentrada se tomaron 40 μL y se añadió 120 μL de PLB x1 con o sin 2-ME, conforme el gel de electroforesis fuera en condiciones reductoras o no reductoras. De esta forma se obtuvieron diluciones de 10, 5, 20 y 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivamente. La extracción de las muestras fue de 24h en agitación continua en vaivén a 4°C, con posterior ebullición durante 5 min y centrifugación a 20000 g durante otros 5 min. Se prepararon dos geles al 12%, uno en condiciones reductoras (**fig. 9**) y otro en no reductoras (**fig. 10**), cargando 10 μL de muestra en cada pocillo, lo que corresponde a 100, 50, 200 y 150 μg de proteína respectivamente.

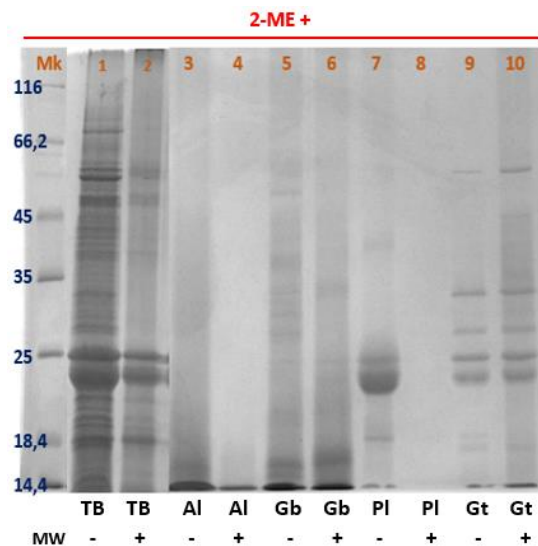


Fig. 9. Análisis del fraccionamiento proteico del tef blanco con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. TB- 4% (1), TB+ 4% (2), Al- (3), Al+ (4), Gb- (5), Gb+ (6), Pl- (7), Pl+ (8), Gt- (9), Gt+ (10).

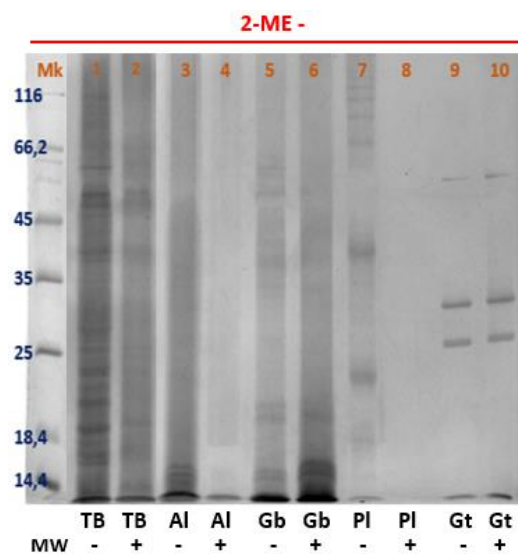


Fig. 10. Análisis del fraccionamiento proteico del tef blanco con y sin MW mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras. TB- 4% (1), TB+ 4% (2), Al- (3), Al+ (4), Gb- (5), Gb+ (6), Pl- (7), Pl+ (8), Gt- (9), Gt+ (10).

Con respecto a las fracciones proteicas del tef nativo, en condiciones reductoras se puede observar que las prolaminas son la fracción que presenta las bandas de mayor

intensidad, situadas entre 18.4-25 kDa, mientras que en condiciones no reductoras presenta varias bandas de gran peso molecular, situadas por encima de 66.2 kDa. Para Adebowale *et al.*, 2011, las prolaminas representaron la fracción mayoritaria (40%), y obtuvo unos resultados similares, con las principales bandas a los 20.3 y 22.8 kDa en condiciones reductoras; Shumoy *et al.*, 2018, presentó bandas entre 16.4-46.3 kDa, destacando la correspondiente a 21 kDa, pero para este autor las prolaminas no representaron la fracción mayoritaria (2-2.5%), sino que fueron las globulinas (9.6-13%). Las globulinas presentan bandas entre 14.4-66.2 kDa, concordando con los resultados de Shumoy *et al.*, 2018. En condiciones reductoras, las glutelinas presentan la mayoría de las bandas entre 20-35 kDa, mientras que en condiciones no reductoras desaparecen las bandas por debajo de los 25 kDa. Shumoy *et al.*, 2018, apenas obtuvo bandas en el caso de las glutelinas. Las albúminas, en este caso, representan la fracción con menor cantidad de bandas proteicas, sobre todo en condiciones reductoras donde prácticamente no hay ninguna visible. Sin embargo, Shumoy *et al.*, 2018, mostró varias bandas para las albúminas entre 14.4-97.4 kDa.

Estos resultados varían en gran medida de los obtenidos por Manso, 2018, quien apenas obtuvo bandas proteicas en las fracciones de prolaminas y glutelinas procedentes de la harina nativa, lo que pudo deberse a una diferencia en la extracción.

Por otro lado, en el fraccionamiento de la harina tratada con microondas no se observa ninguna banda en el caso de las albúminas, sin embargo, las glutelinas no se ven afectadas con respecto a la fracción nativa. En condiciones reductoras, las globulinas presentan un ligero descenso de bandas entre 25-66.2 kDa, sin observarse cambios significativos con respecto a la fracción nativa en condiciones no reductoras. No se obtuvo fracción de prolaminas, por lo que no se pudieron analizar. Este último caso es curioso y nos muestra las limitaciones del método, pues la harina de tef blanco tratada con microondas (fig. 9. Calle 2) sí muestra las dos grandes bandas situadas entre 18.4-25 kDa que corresponderían con la fracción de prolaminas, como se muestra en la figura 9 (calle 7). Sin embargo, Manso, 2018, sí consiguió obtener la fracción de prolaminas de la harina tratada, aunque la cantidad de bandas que mostró fue escasa.

El fraccionamiento proteico de las harinas siguiendo este método genera mucha controversia entre los autores. Los resultados de las distintas fracciones van a depender en gran medida de cómo se lleve a cabo la extracción y del disolvente empleado. Si comparamos los diferentes disolventes utilizados para extraer la fracción de prolaminas, el tercbutanol al 60% junto con DTT empleado por Adebowale *et al.*, 2011, ha resultado ser el más eficaz frente al etanol al 70% empleado por Shumoy *et al.*, 2018, y al tercbutanol al 60% empleado en el presente trabajo y por Manso, 2018.

5.6. Análisis de todas las harinas y fracciones proteicas mediante FTIR

Dicho análisis, cuyo procedimiento se explica en el apartado 4.2.h, se realizó sobre las muestras de todas las harinas nativas, tratadas con microondas y ultrasonidos, y sobre las fracciones proteicas de la harina de tef blanco nativa y tratada con microondas.

La mayoría de los enlaces de los hidratos de carbono van a mostrar una señal en el rango de 840-1170 cm^{-1} , debida a la tensión del enlace C-O; en el rango de 1200-1400 cm^{-1} se va a encontrar la señal de los hidroxilos (O-H) de los hidratos de carbono; las señales de tensión de los grupos amido I y II de las proteínas se encuentran entre 1600-1800 cm^{-1} ; los grupos metileno de los lípidos van a dar una señal entre 2700-3000 cm^{-1} ; y los enlaces H-N del grupo amido y los enlaces H-O presentes en lípidos y agua muestran una señal entre 3000-3700 cm^{-1} (Pretsch *et al.*, 1988). Por consiguiente, y según la bibliografía actual, la señal que aparece en el rango de 840-1170 cm^{-1} se va a considerar característica de los hidratos de carbono, la señal entre 1600-1800 cm^{-1} característica de las proteínas, y la que se encuentra entre 2700-3000 cm^{-1} característica de los lípidos. Aunque estos compuestos también van a mostrar enlaces en otras zonas del espectro. En la sección donde se encuentra la señal considerada de las proteínas, el rango de 1630-1740 cm^{-1} correspondería a la amida I, el de 1510-1630 cm^{-1} a la amida II y el de 1200-1300 cm^{-1} a la amida III, aproximadamente, estando esta última solapada con la señal de los enlaces O-H de los hidratos de carbono. Dentro de la amida I se encuentran la α -hélice (1648-1658 cm^{-1}) y la lámina- β (1620-1640 cm^{-1}) (Yu *et al.*, 2004).

Al comparar las harinas nativas con las tratadas con microondas y ultrasonidos se observó que los espectros, en general, eran prácticamente iguales o presentaban pequeñas diferencias. Estas diferencias fueron mayores en el caso de las harinas tratadas con ultrasonidos, pero no pudieron considerarse significativas.

Como se puede observar en la figura 11, los espectros de las harinas nativas del tef blanco y marrón no muestran diferencias significativas. Las harinas de las dos variedades de arroz tampoco muestran diferencias significativas entre sí, pero ambas presentan menor contenido proteico con respecto al tef, como cabía esperar, y menor contenido en lípidos, siendo la señal de los hidratos de carbono más intensa que en el caso de ambas variedades de tef. Además, las dos variedades de tef muestran una pequeña señal entre los 1700-1800 cm^{-1} que no se obtuvo en el espectro del arroz. Esta señal está representada por lípidos según Farooq & Ismail, 2012.

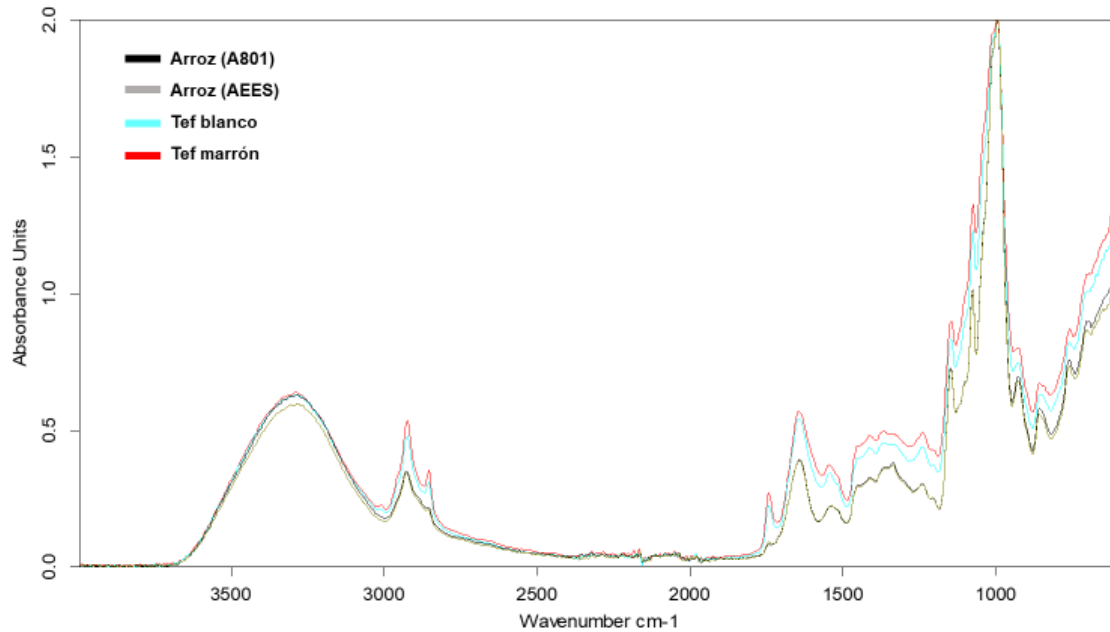


Fig. 11. Análisis de los espectros FTIR de las harinas nativas de arroz A801, arroz AEES, tef blanco y tef marrón. Negro: arroz (A801); gris: arroz (AEES); azul: tef blanco; rojo: tef marrón.

El espectro de la variedad de arroz AEES (anexo III.B) tratada con ultrasonidos mostró una pequeña bajada en la mayoría de las regiones con respecto a la harina nativa, pero no fue significativa. Sin embargo, se observó, en la harina tratada, una pequeña modificación en la zona de los hidratos de carbono donde la señal fue mayor en comparación con la nativa. Esto pudo deberse a la pérdida del orden molecular del almidón debido a la cavitación producida durante el tratamiento (Vera *et al.*, 2019) dando lugar a agregados moleculares más homogéneos.

Con respecto al tef blanco (**fig. 12**), la harina tratada con ultrasonidos presenta una población de moléculas más homogénea en la zona de los hidratos de carbono ($840-1170\text{ cm}^{-1}$), al igual que la muestra de arroz AEES, provocando una señal más aguda que la harina nativa. Sin embargo, la muestra tratada con microondas no presenta diferencias con respecto a la nativa.

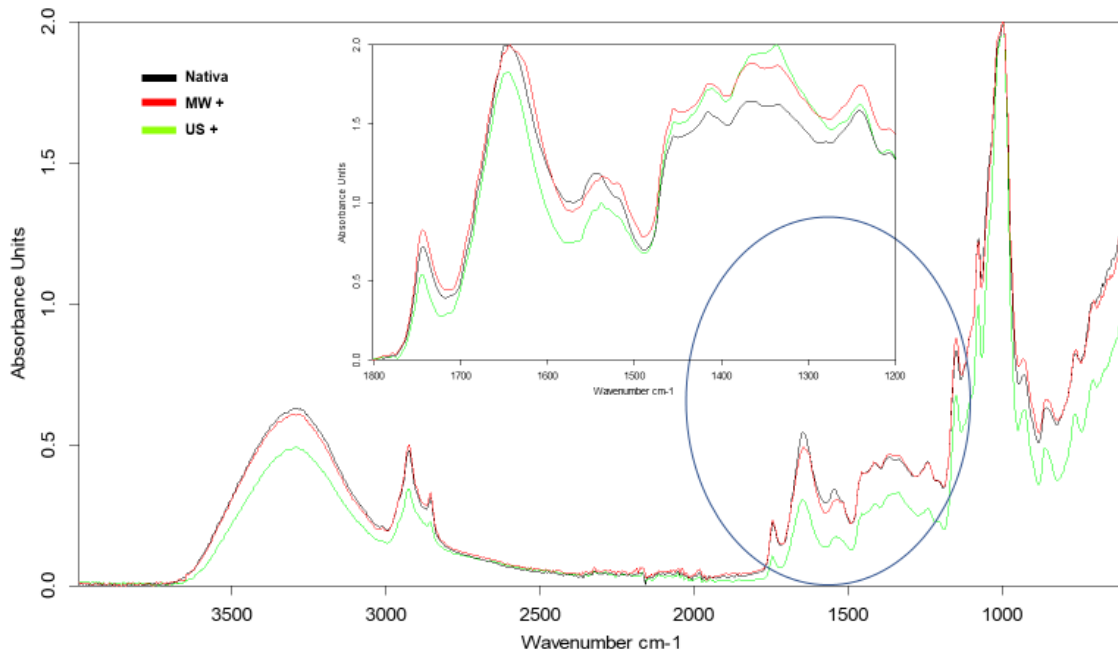


Fig. 12. Análisis de los espectros FTIR de la harina de tef blanco nativa y tratada con microondas y ultrasonidos. Negro: harina de tef blanco nativa; rojo: harina de tef blanco tratada con microondas (MW +); verde: harina de tef blanco tratada con ultrasonidos (US+).

Los espectros de las muestras de arroz A801 (anexo III.A) y de tef marrón (anexo III.C) nativas y tratadas con microondas no presentaron diferencias significativas.

Sería conveniente, en futuras investigaciones, realizar más análisis de FTIR de estas harinas con diferentes tiempos o condiciones de tratamiento para observar la evolución de los espectros.

Con respecto a las fracciones proteicas de la harina de tef blanco nativa y tratada con microondas, sí se observaron ciertas diferencias entre las procedentes de la harina nativa y las de la tratada con microondas. En el caso de las albúminas (**fig. 13**), se tomó de referencia una muestra pura de albúmina sérica bovina (BSA) y se comprobó que dicha fracción, tanto de la harina nativa como de la tratada con microondas, no contenía únicamente albúmina, sino que estaba contaminada, ya que presentaba una gran señal en el rango donde se ubican la mayoría de los enlaces de los hidratos de carbono, así como a más de 1700 cm^{-1} que correspondería a la presencia de lípidos, los cuales no se observan en el espectro de BSA. También se observan señales más grandes en el rango donde se encuentran la mayoría de los enlaces de los lípidos ($2700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$).

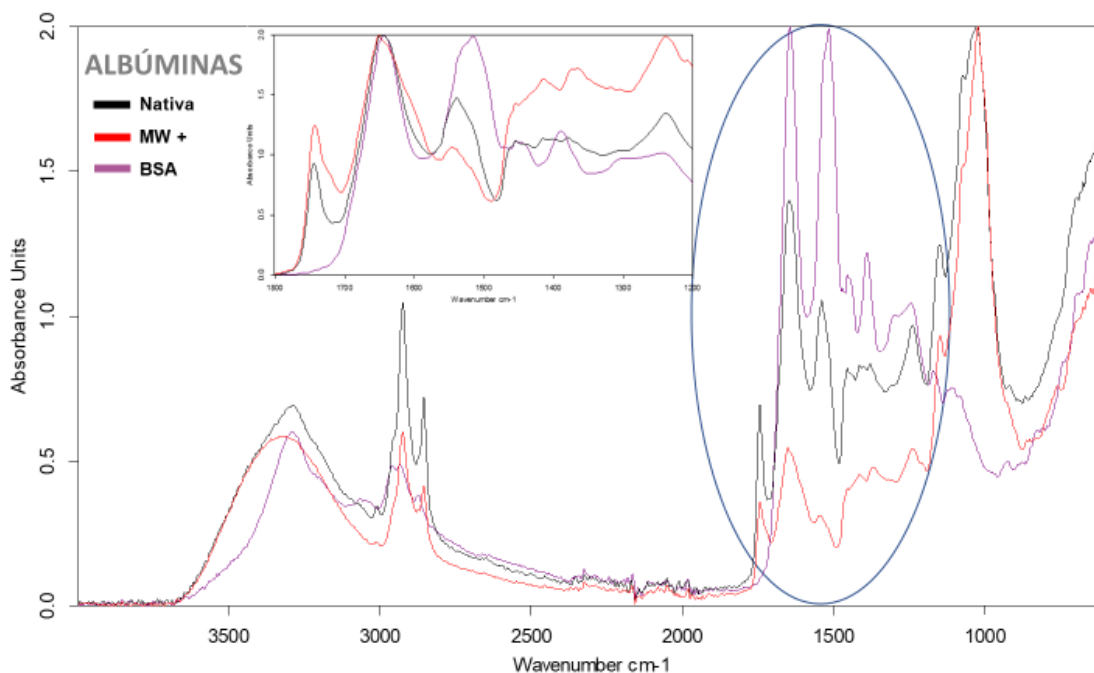


Fig. 13. Análisis de los espectros FTIR de BSA y la fracción de albúmina de la harina de tef nativa y tratada con microondas. Negro: fracción de albúmina de la harina de tef nativa; rojo: fracción de albúmina de la harina de tef tratada con microondas (MW+); morado: BSA.

El alcohol empleado como disolvente en la obtención de las prolaminas también debió extraer los lípidos que contenía la harina, la cual no estaba desgrasada, ya que en el espectro de esta fracción proteica (anexo III.E) se observó una gran señal en el rango de aparición de los enlaces de los lípidos.

Los espectros de las globulinas (anexo III.D) y glutelinas (anexo III.F) de la harina tratada con microondas indicaron una menor cantidad proteica con respecto a dichas fracciones de la harina nativa, sobre todo en el caso de las globulinas. Además, la fracción de glutelinas, tanto de la harina tratada como de la nativa, ha sido la que mayor señal ha mostrado en el rango de los hidratos de carbono. Como la prueba del almidón realizada antes de obtener esta fracción fue negativa, los hidratos de carbono presentes serán glúcidos procedentes de su hidrólisis, los cuales no se consiguieron eliminar durante el lavado.

Por lo tanto, las muestras que se obtienen en el fraccionamiento proteico no están compuestas únicamente por proteína, sino que están contaminadas con lípidos e hidratos de carbono, y, además, su contenido proteico es bajo, sobre todo en las pertenecientes a la harina tratada con microondas.

5.7. Análisis de las harinas nativas y tratadas con microondas mediante DSC

Las harinas nativas y tratadas con microondas de ambas variedades de tef y del arroz A801 se analizaron mediante DSC, como se describe en el apartado 4.2.i, para observar posibles desnaturalizaciones proteicas. Las fracciones proteicas de la harina nativa y tratada con microondas de tef blanco no se analizaron mediante esta técnica al observarse por medio del análisis de FTIR que estaban contaminadas.

Tabla 6. Entalpía y temperatura de pico de procesos endotérmicos evaluados mediante DSC en las harinas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801) nativas y tratadas con microondas.

Muestra	Humedad %	PICO 1 ($\approx 55^{\circ}\text{C}$)		PICO 2 ($\approx 80^{\circ}\text{C}$)		PICO 3 ($\approx 160^{\circ}\text{C}$)	
		ΔH (J/g db)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g db)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g db)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)
Tef blanco							
Nativa	11.61	0.67	52.2	0.09	81.52	245.70	163.5
MW	9.65	1.46	57.19	-	-	198.96	163.56
Tef marrón							
Nativa	10.68	0.93	62.91	0.06	84.24	221.87	158.32
MW	8.48	2.00	59.65	0.01	80.73	179.64	169.01
Arroz (A801)							
Nativa	13.33	0.67	48.98	0.04	72.81	240.68	162.79
MW	9.99	1.11	58.73	0.01	77.23	177.70	162.13

db: base seca

T_p : temperatura de pico.

Como se muestra en la tabla 6, se observaron tres picos a diferentes temperaturas. El primer pico que se obtuvo a una temperatura de 55°C , aproximadamente, indica una posible desnaturalización proteica. En este caso, la entalpía de desnaturalización fue superior en todas las harinas tratadas con microondas, es decir, se necesitó una mayor cantidad de energía para conseguir su desnaturalización. Este aumento de la entalpía pudo producirse por una reorganización de las proteínas o por la adquisición de una estructura proteica más resistente, pudiendo derivarse de una desnaturalización reversible tras el tratamiento con microondas.

El segundo pico es el más pequeño de los tres y también muestra una posible desnaturalización proteica a unos 80°C. Se observó en todas las harinas nativas y tratadas, exceptuando la de tef blanco tratada con microondas en la que desaparece (**fig. 14**). La entalpía de desnaturalización fue mayor en las harinas nativas, indicando una mayor susceptibilidad de estas posibles proteínas a ser desnaturalizadas tras el tratamiento microondas.

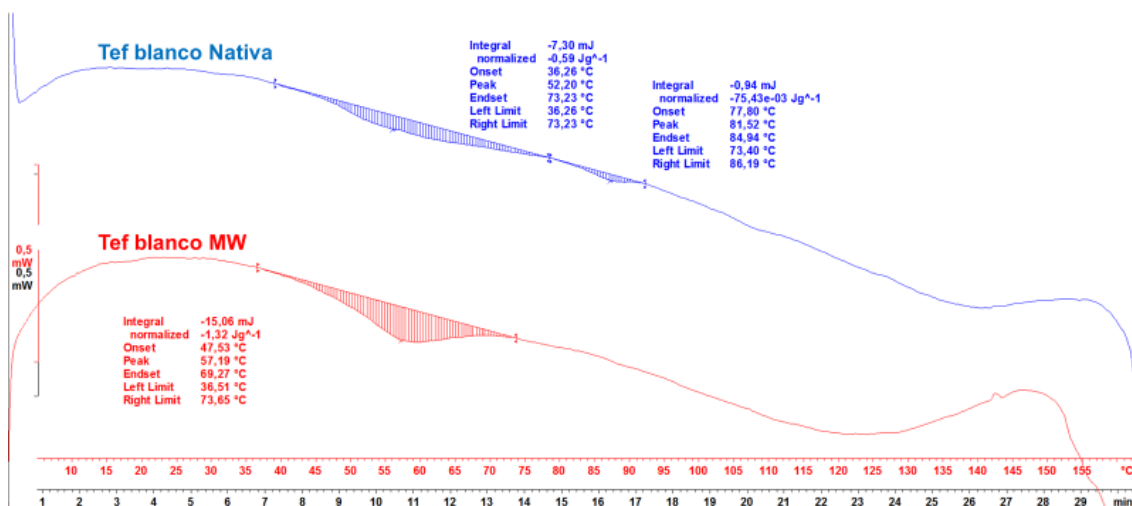


Fig. 14. Picos 1 y 2 de la harina de tef blanco nativa y pico 1 de la tratada con microondas (MW) obtenidos en el análisis mediante DSC. Azul: harina de tef blanco nativa; rojo: harina de tef blanco con tratamiento microondas.

La reversibilidad de las desnaturalizaciones también se ha observado en el caso de proteínas aisladas. Así pues, Michnik, 2003, estudió mediante DSC la reversibilidad de la desnaturalización de la albúmina sérica bovina, la cual disminuía conforme aumentaba la temperatura a la que había sido sometida la muestra.

El tercer pico (**fig. 15**) puede deberse a la fusión de la amilopectina (Maache-Rezzoug *et al.*, 2008; Biliaderis, 2009). La temperatura a la que se observa (160°C aproximadamente) es superior a la que se alcanza en el microondas, por lo que este proceso no va a suceder durante dicho tratamiento.

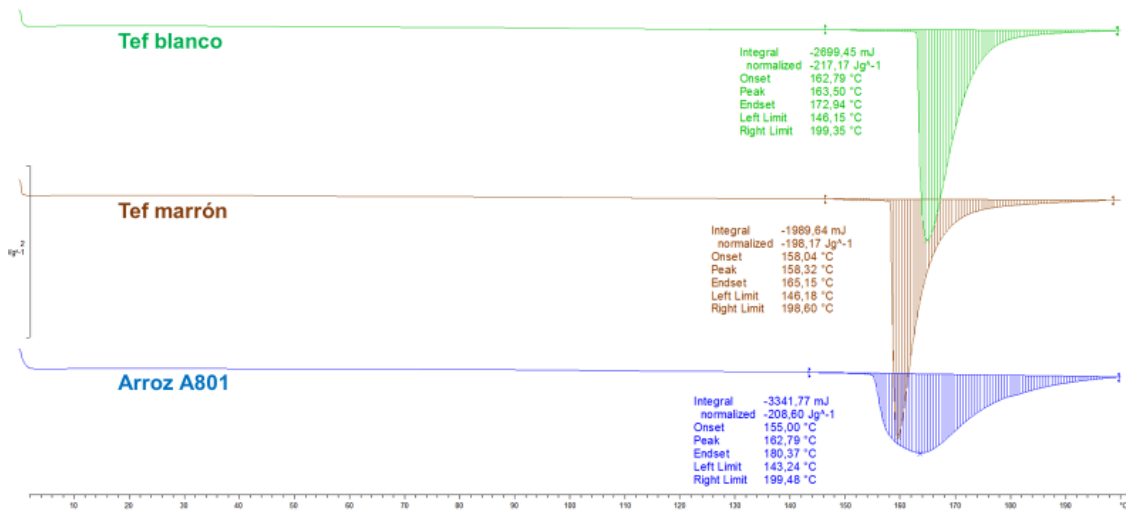


Fig. 15. Pico 3 obtenido en el análisis mediante DSC de las harinas nativas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801). Verde: harina nativa de tef blanco; marrón: harina nativa de tef marrón; azul: harina nativa de arroz (A801).

Se realizó un segundo barrido al cabo de una semana para comprobar si las desnaturalizaciones que se habían producido eran reversibles, pero no se obtuvo ningún pico en ninguna de las muestras (**fig. 16**). Esto nos indica que las condiciones a las que se sometieron las muestras a 200°C durante dicho análisis provoca su irreversibilidad.

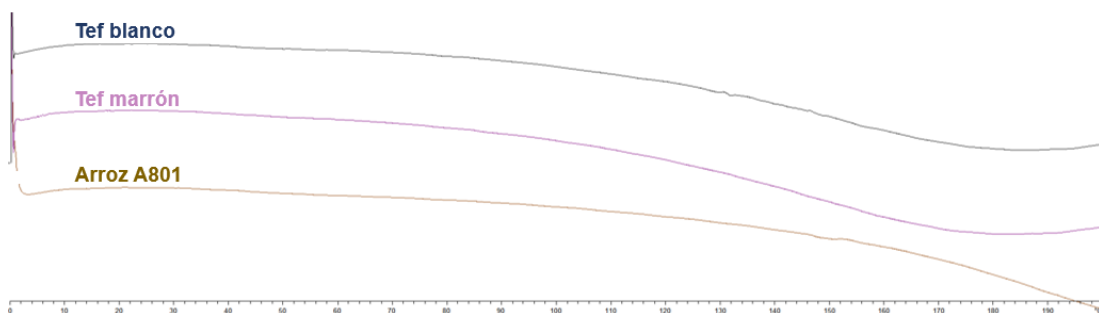


Fig. 16. Segundo barrido de DSC en las harinas nativas de tef blanco, tef marrón y arroz (A801). Azul: harina nativa de tef blanco; morado: harina nativa de tef marrón; marrón: harina nativa de arroz (A801).

Aunque se observan cambios, los resultados obtenidos no son muy concluyentes, siendo necesario un estudio en mayor profundidad.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado el efecto que ejerce el tratamiento microondas y de ultrasonidos sobre las proteínas de las harinas sin gluten de tef y arroz, obteniendo las siguientes conclusiones:

- La humedad normalizada a un 30% de las harinas pasa a ser de un 10% tras el tratamiento microondas durante 8 min, valor cercano a la humedad inicial de las harinas nativas.
- No hay diferencias significativas entre los tiempos de extracción proteica de 24, 48 y 72 horas mediante el tampón de carga empleado (PLB x1).
- El análisis mediante SDS-PAGE muestra que el tratamiento microondas ocasiona una disminución proteica, siendo ésta muy acusada en el caso del tef.
- El tratamiento con urea no optimiza la extracción proteica de las harinas tratadas con microondas. Puede que el uso de urea como componente del tampón de carga consiga mejorar la extracción proteica de dichas harinas.
- El tratamiento con ultrasonidos en las condiciones empleadas ha resultado ser una técnica menos agresiva que el tratamiento con microondas, pues no parece afectar al contenido proteico de las harinas.
- El análisis de color muestra que las harinas tratadas con microondas se oscurecen, debido posiblemente a la reacción de Maillard.
- El método de fraccionamiento proteico utilizado para la extracción de las fracciones proteicas del tef no ha sido el más eficaz, como tampoco lo han sido los disolventes empleados. Ejemplo de ello ha sido la ausencia de la fracción de prolaminas en el caso de la harina tratada con microondas.
- El análisis mediante FTIR nos vuelve a mostrar que el método de fraccionamiento proteico empleado debe optimizarse, ya que las muestras obtenidas no se corresponden con proteína pura, sino que también contienen lípidos e hidratos de carbono. Así mismo, no se puede afirmar que la disminución proteica que presentan las fracciones de la harina tratada con microondas sea debida a dicho tratamiento, ya que puede deberse a la ineficacia del método de fraccionamiento.
- No se puede afirmar que los picos observados aproximadamente a 55 y 80°C en el análisis mediante DSC pertenezcan a desnaturalizaciones proteicas.
- Son necesarios más estudios que se centren en el efecto proteico de estos tratamientos físicos, sobre todo para averiguar qué ocurre con las proteínas de las harinas tratadas con microondas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 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>
- Abebe, W., & Ronda, F. (2015). Flowability, moisture sorption and thermal properties of tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] grain flours. *Journal of Cereal Science*, 63, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.02.003>
- 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>
- Aecosan - Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (n.d.). Retrieved May 25, 2019, from http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/celiacos.htm
- Alonso-Miravalles, L., & O'Mahony, J. (2018). Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein-Rich Ingredients. *Foods*, 7(5), 73. <https://doi.org/10.3390/foods7050073>
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., & O'Mahony, J. A. (2017). Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.026>
- 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>
- Biliaderis, C. G. (2009). Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. In *Starch* (pp. 293–372). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00008-2>
- European Commission. (2009). Commission Regulation 41/2009/EC of the European Parliament and of the Council of 20 January 2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten. *Official Journal of the European Union (OJEU)*, 16, 3–5.
- Farooq, Z., & Ismail, A. A. (2012). QA / QC of flours using the Agilent Cary 630 ATR-FTIR analyzer Application note. *Food Testing and Agriculture. Agilent Technologies*.

- Gebremariam, M. M., Zarnkow, M., & Becker, T. (2014). Teff (*Eragrostis tef*) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(11), 2881–2895. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0745-5>
- 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>
- J., F. M., & P., R. Q. (2015). Enfermedad Celiaca: Revisión. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *26*(5), 613–627. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.09.007>
- Li, Z., Wang, L., Chen, Z., Yu, Q., & Feng, W. (2018). Impact of binding interaction characteristics on physicochemical, structural, and rheological properties of waxy rice flour. *Food Chemistry*, *266*(May), 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.010>
- Maache-Rezzoug, Z., Zarguili, I., Loisel, C., Queveau, D., & Buléon, A. (2008). Structural modifications and thermal transitions of standard maize starch after DIC hydrothermal treatment. *Carbohydrate Polymers*, *74*(4), 802–812. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.047>
- Manso Refoyo, S. (2018). *Modificación de harinas sin gluten de alto valor nutricional por tratamiento microondas. Efecto sobre las fracciones proteicas*. Retrieved from <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/31276>
- Michnik, A. (2003). Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *71*(2), 509–519. <https://doi.org/10.1023/A:1022851809481>
- 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>
- Molina, L., Lapis, J. R., Sreenivasulu, N., & Cuevas, R. P. O. (2019). Determination of Macronutrient and Micronutrient Content in Rice Grains Using Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). In *Rice Grain Quality* (Vol. 1892, pp. 253–264). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8914-0>
- Moroni, A. V., Iametti, S., Bonomi, F., Arendt, E. K., & Dal Bello, F. (2010). Solubility of proteins from non-gluten cereals: A comparative study on combinations of

- solubilising agents. *Food Chemistry*, 121(4), 1225–1230.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.009>
- O'Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 53, 141–154.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.009>
- 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>
- Pretsch, E., Clerc. T., Seibl. J., & Simon. W. (1988). *Tablas para la educilación estructuralde compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Madrid: Alhambra.
- Setyawati, Y. D., Ahsan, S. F., Ong, L. K., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2016). Production of glutinous rice flour from broken rice via ultrasonic assisted extraction of amylose. *Food Chemistry*, 203, 158–164.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.068>
- 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(October 2017), 697–703.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.053>
- Sujka, M. (2017). Ultrasonic modification of starch – Impact on granules porosity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 424–429.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.001>
- Tatham, A. S., Fido, R. J., Moore, C. M., Kasarda, D. D., Kuzmicky, D. D., Keen, J. N., & Shewry, P. R. (1996). Characterisation of the Major Prolamins of Tef (*Eragrostis tef*) and Finger Millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Cereal Science*, 24(1), 65–71.
<https://doi.org/10.1006/JCRS.1996.0038>

- 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>
- Valero, T., Rodríguez, P., Ruiz, E., Ávila, J. M., & Valera, G. (2018). Cereales y derivados. In *La alimentación española. Características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta* (pp. 47–48). Retrieved from <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/arroz.pdf>
- Vera, A., Valenzuela, M. A., Yazdani-Pedram, M., Tapia, C., & Abugoch, L. (2019). Conformational and physicochemical properties of quinoa proteins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51(August 2018), 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.026>
- 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>
- Villanueva, M., Harasym, J., Muñoz, J. M., & Ronda, F. (2019). Rice flour physically modified by microwave radiation improves viscoelastic behavior of doughs and its bread-making performance. *Food Hydrocolloids*, 90(December 2018), 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.048>
- Yu, P., McKinnon, J. J., Christensen, C. R., & Christensen, D. A. (2004). Using synchrotron-based FTIR microspectroscopy to reveal chemical features of feather protein secondary structure: Comparison with other feed protein sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7353–7361. <https://doi.org/10.1021/jf0490955>
- 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*, 239, 402–415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.101>
- Zuo, J. Y., Knoerzer, K., Mawson, R., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2009). The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(4), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.01.002>

8. ANEXOS

ANEXO I (Equipos y material fungible)

Equipos utilizados y disponibles en los laboratorios de Procerealtech y Bioforge:

Estufa: Binder GmbH	Agitadores:
Balanzas:	Polymax1040. Heidolph
COBOS AX-200 precision	Stuart orbital shaker SSL1
Sartorius Entris3231-1S	Liofilizador: Virtis
Mettler Toledo XPE205 Deltarange	Hervidor: Thermo Fisher Scientific
COBOS CB Complet	Máquina electroforesis: Vertical electrophoresis system. Hoefer miniVE
Placa agitadora: MR Hei-Mix L. Heidolph	Electrophoresis Power Supply-EPS 301
Desecador	Proformador gel: Multiple Gel Caster. Amersham Biosciences
Microondas: R-342. Sharp.	Equipo de agua Elix: MilliPore
Motor externo microondas: Worx D-LITE	Frigorífico y congelador
Vortex: REAXtop. Heidolph	Baños maría:
Mezcladora: Teddy Bear 5l. Varimixer	LAUDA ecoline start edition 019. Fisher Scientific.
Molino eléctrico: Fidibus Medium	Julabo ED (v.2)
Centrífugas:	Incubadora: ICP 260 memmert
MiniSpin eppendorf	Tamiz: CISA
Sorvall ST16R Centrifuge. Thermo Scientific	Equipo ultrasonidos: Hielscher UP400St
Sorvall Legend XTR. ThermoFisher Scientific	Calorímetro diferencial de barrido: DSC STARe System. Mettler Toledo.
Cámara fotográfica de geles: Kodak Gel Logic 100 Imaging System	Espectrofotómetro: Tensor 24 FTIR. Bruker.

Material fungible:

Guantes de nitrilo

Guantes de tela

Botes de polietileno

Bolsas de polipropileno y poliamida: Cyrovac

Cápsulas de metal

Espátulas metálicas

Gradillas para tubos

Tubos eppendorf 1.5 mL para centrifugación

Falcon con faldón 50 mL (tapón azul)

Falcon para centrifugar sin faldón (tapón morado)

Botes centrifugar grandes

Pipeta automática: Labnet autoclavable. 100:1000 μL , 20:200 μL , 2:10 μL .

Puntas pipetas: D10, D200, D1000 Diamond, Gilson

Botes de orina

Tijeras

Vasos de precipitados de vidrio

Cristales electroforesis: 10x10. Hoefer.

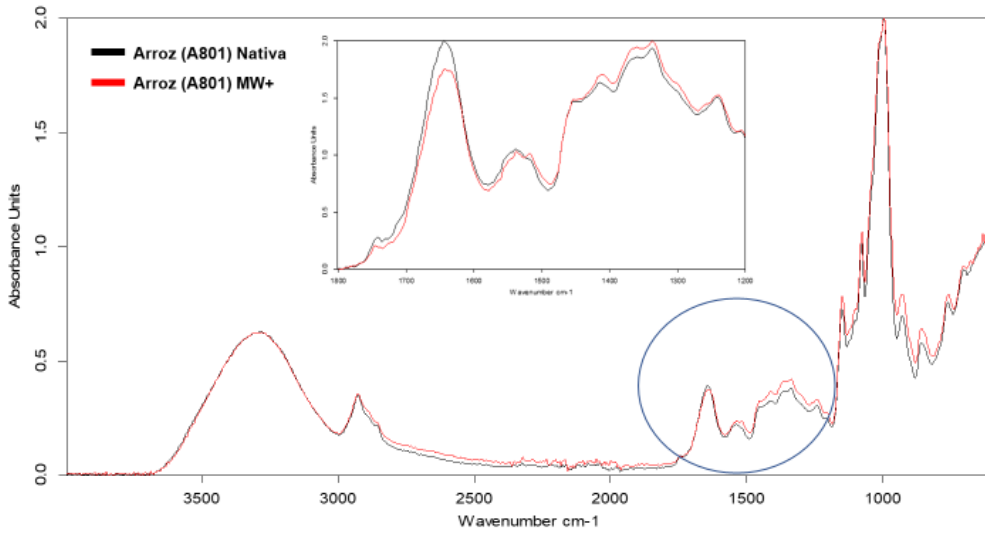
Tripas para diálisis: 12-14000 Daltons. Medicell membranes Ltd

ANEXO II (Reactivos)

Reactivo	Nombre completo	Suministrador	Lote/ referencia	Pureza
Tercbutanol	Tert-Butyl alcohol 2-Methylpropan-2-ol	Fisher Scientific	1780447	-
NaCl	Sodium Chloride for analysis	PanReact AppliChem	000880433	99,5%
Ácido acético	Acetic acid glacial	Fisher Chemical	1870260	99%
Metanol	Methanol	Fisher Chemical	1871743	99,8 %
Urea	Urea Colorless-to-white crystals	Fisher Scientific	L-15731	99%
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamide	Thermo Scientific	TI2591665	-
SDS	SDS micropellets	Fisher Scientific	44299-53539	99%
Acrilamida	Acryl/Bis™ 37.5:1 (30:0.8) 40% (w/v) solution Ultra Pure	Iberlab	2I97C391	38,96%
PSA	Ammonium peroxidisulfate, molecular biology grade	Sharlau Chemie. SA.	-	98%
Tris	Tris Hydrochloride	Apollo Scientific limited	-	-
Glicerol	Glycerol For Molecular Biology	Fisher BioReagents	13751	99.5%
2-ME	2-Mercaptoethanol	Acros organics	A0377355	99%
Bromofenol	Bromophenol Blue	Fisher Chemical	1364332	-

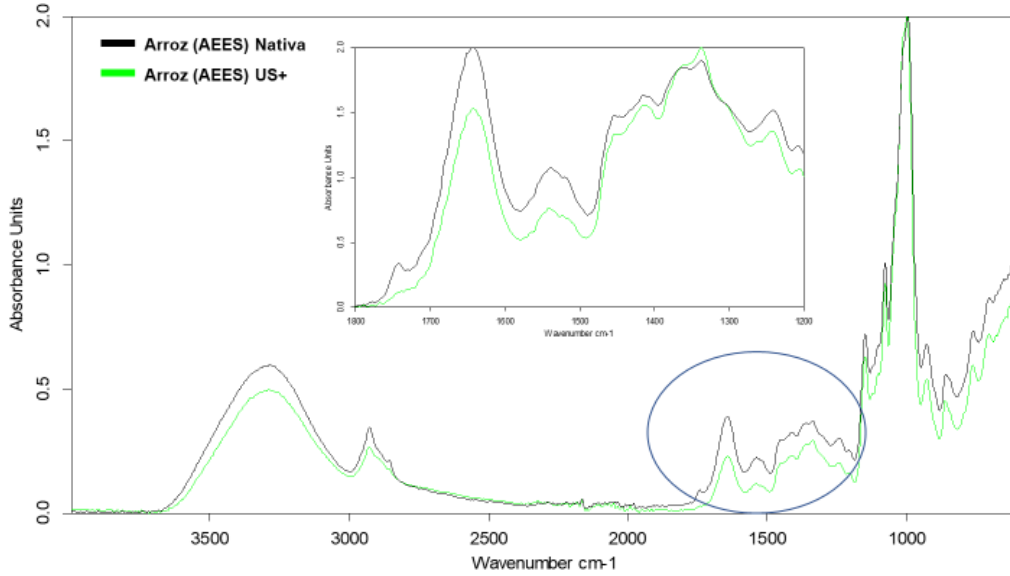
ANEXO III (Figuras FTIR)

A)



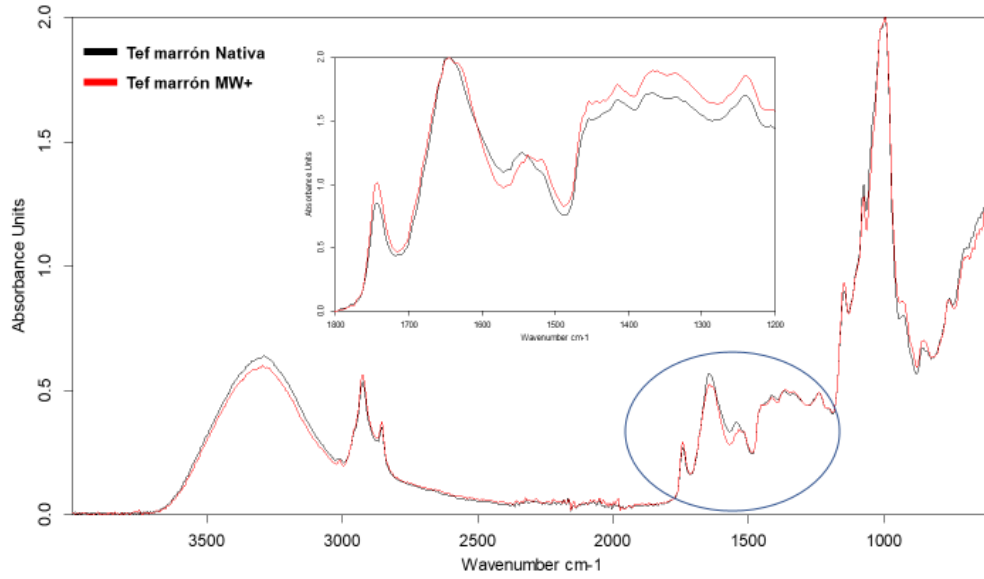
Análisis de los espectros FTIR de la harina de arroz (A801) nativa y tratada con microondas (MW+). Negro: harina de arroz (A801) nativa; rojo: harina de arroz (A801) tratada con microondas.

B)



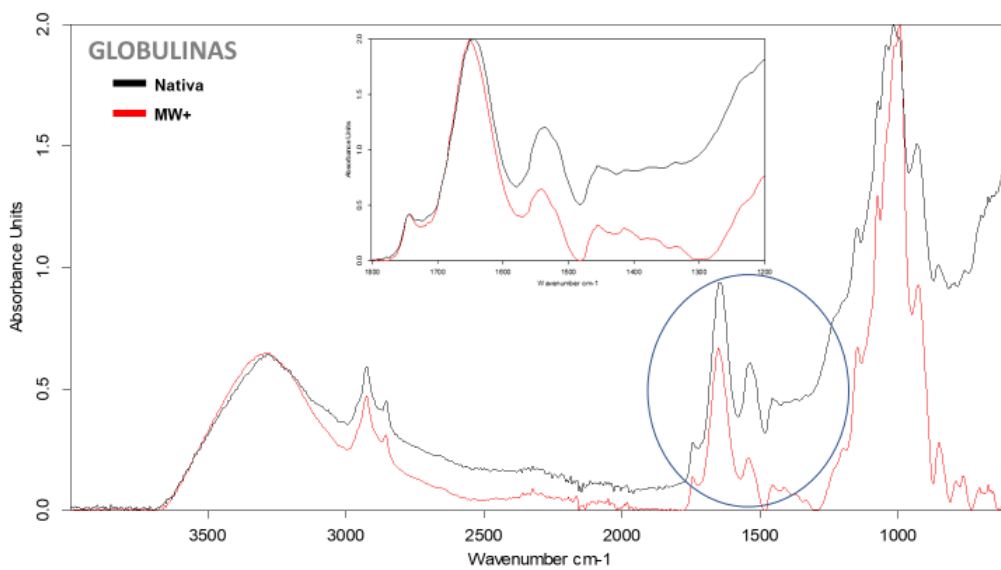
Análisis de los espectros FTIR de la harina de arroz (AEES) nativa y tratada con ultrasonidos (US+). Negro: harina de arroz (AEES) nativa; verde: harina de arroz (AEES) tratada con ultrasonidos.

C)



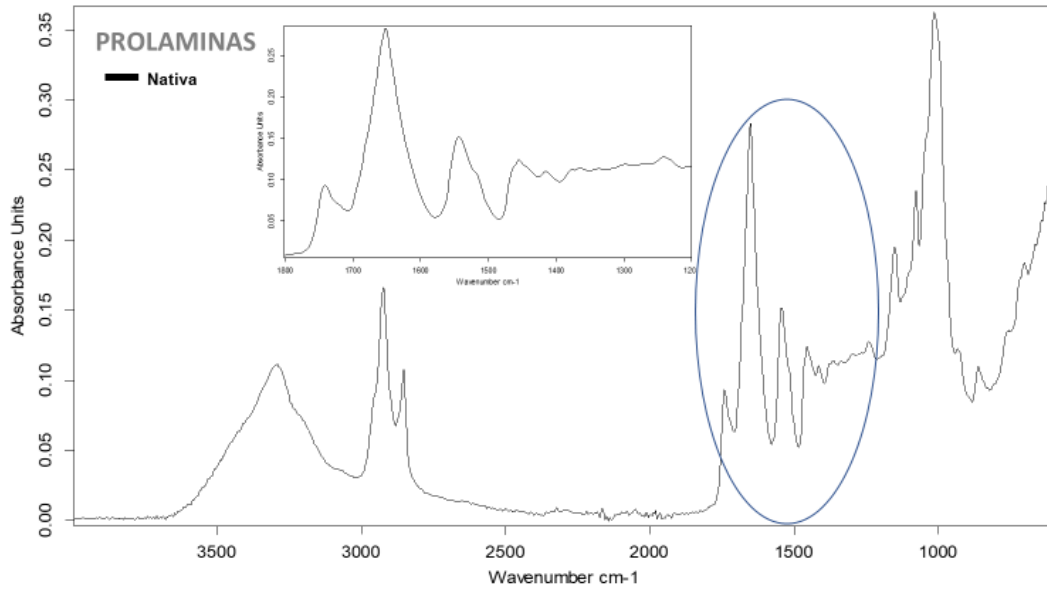
Análisis de los espectros FTIR de la harina tef marrón nativa y tratada con microondas (MW+). Negro: harina de tef marrón nativa; rojo: harina de tef marrón tratada con microondas

D)



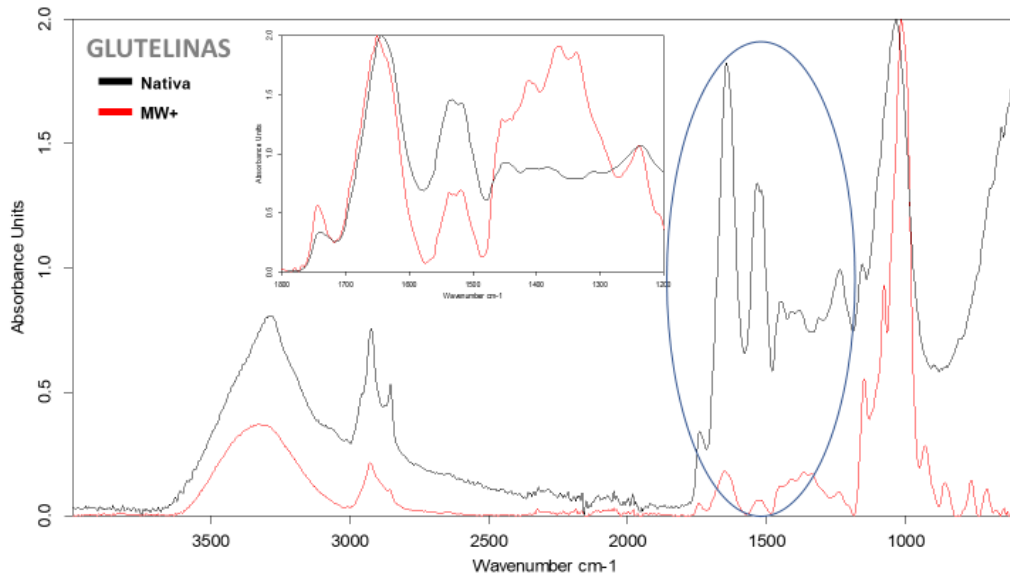
Análisis de los espectros FTIR de la fracción de globulinas de la harina de tef nativa y tratada con microondas (MW+). Negro: fracción de globulinas de la harina de tef nativa; rojo: fracción de globulinas de la harina de tef tratada con microondas.

E)



Análisis del espectro FTIR de la fracción de prolaminas de la harina de tef nativa. Negro: fracción de prolaminas de la harina de tef nativa.

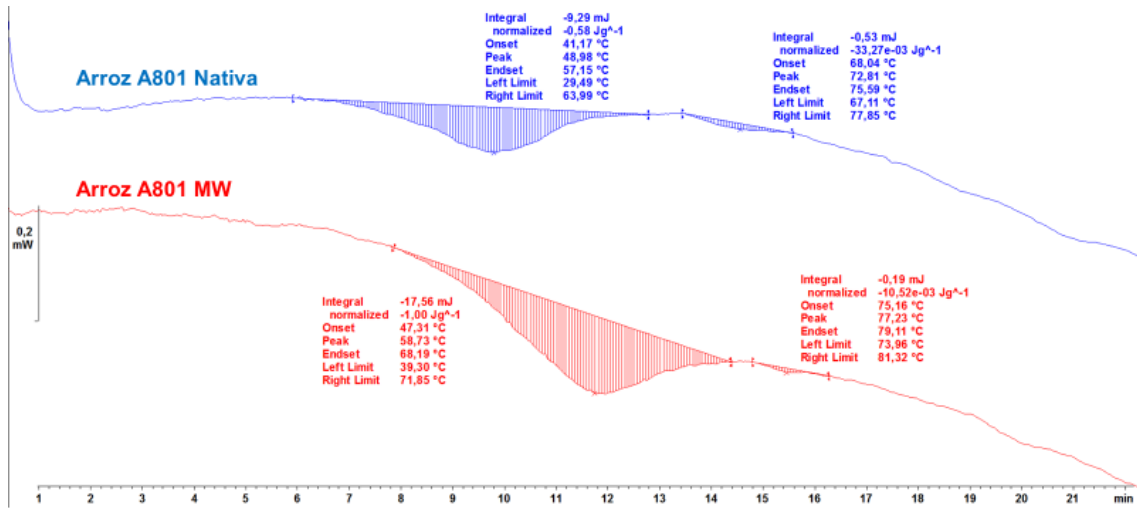
F)



Análisis de los espectros FTIR de la fracción de glutelinas de la harina de tef nativa y tratada con microondas (MW+). Negro: fracción de glutelinas de la harina de tef nativa; rojo: fracción de glutelinas de la harina de tef tratada con microondas.

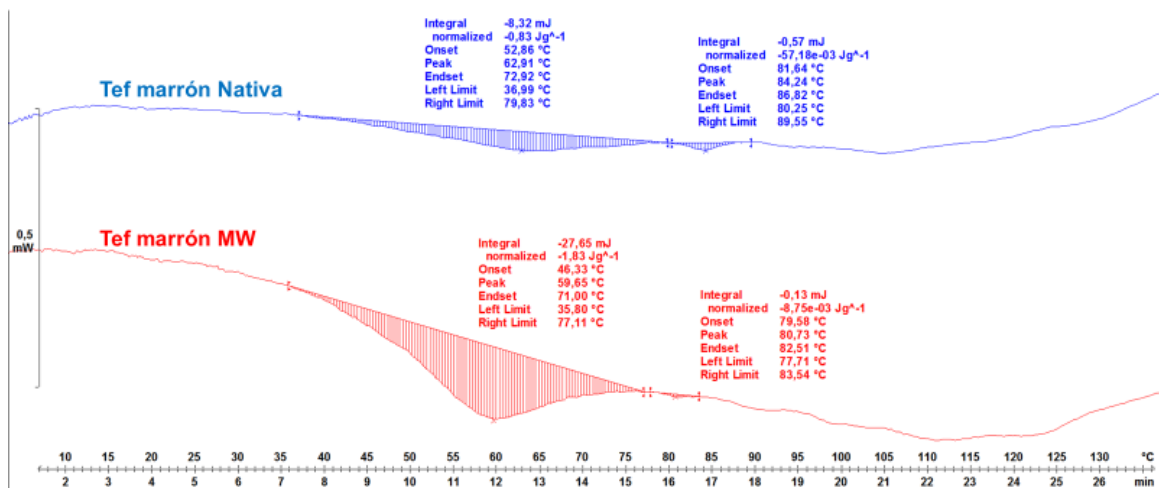
ANEXO IV (Figuras DSC)

A)



Picos 1 y 2 obtenidos en el análisis mediante DSC de la harina de arroz A801 nativa y tratada con microondas (MW). Azul: harina de arroz (A801) nativa; rojo: harina de arroz (A801) con tratamiento microondas.

B)



Picos 1 y 2 obtenidos en el análisis mediante DSC de la harina de tef marrón nativa y tratada con microondas (MW). Azul: harina de tef marrón nativa; rojo: harina de tef marrón con tratamiento microondas.