

IMPACTO DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO ASISTIDO CON MICROONDAS SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y LAS FRACCIONES PROTEICAS DE LA HARINA DE TEF



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

CURSO 2020/2021

Autora: María Mate Correa

Tutor: Francisco Javier Arias Vallejo

Cotutora: Felicidad Ronda Balbás

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. JUSTIFICACIÓN	4
1.2. OBJETIVOS.....	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	5
2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS	5
2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	5
2.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	5
2.2.3. TRATAMIENTO MICROONDAS	6
2.2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES.....	7
2.2.5. DESENGRASADO.....	9
2.2.6. FRACCIONAMIENTO PROTEICO	9
2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA	10
2.2.8. ELECTROFORESIS DE GEL	11
2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1. PROPIEDADES FUNCIONALES.....	13
3.1.1. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DEL AGUA (WHC)	14
3.1.2. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA Y ACEITE (WAC Y OAC).....	14
3.1.3. ÍNDICE DE ABSORCIÓN EN AGUA (WAI)	15
3.1.4. ÍNDICE DE SOLUBILIDAD DE AGUA (WSI).....	15
3.1.5. PODER DE HINCHAMIENTO (SP)	16
3.1.6. ACTIVIDAD EMULSIONANTE Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN.....	16
3.1.7. ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD ESPUMANTE (FC/FS).....	17
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES	19
3.2.1. ALBÚMINAS.....	19
3.2.2. GLOBULINAS.....	19
3.2.3. PROLAMINAS.....	19
3.2.4. GLUTELINAS.....	20
3.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE HARINA DE TEF MEDIANTE SDS-PAGE	21
4. CONCLUSIONES	25

5. AGRADECIMIENTOS	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	27
7. ANEXOS	31
7.1. ANEXO I (Equipos y material fungible).....	31
7.1.1. EQUIPOS UTILIZADOS Y DISPONIBLES EN LOS LABORATORIOS:.....	31
7.1.2. EQUIPO UTILIZADO DEL LABORATORIO DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE LA UVA EN PALENCIA:	32
7.1.3 EQUIPO UTILIZADO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA (FACULTAD DE CIENCIAS), VALLADOLID:	32
7.1.4. MATERIAL FUNGIBLE.....	32
7.2. ANEXO II (Reactivos)	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso y preparación de la muestra.....	6
Figura 2. Electroforesis de gel al 12% en condiciones reductoras, extracto albúminas normalizado a 60 µg de albúmina/pocillo	21
Figura 3. Electroforesis de gel al 12% en condiciones reductoras, extracto globulinas normalizado a 60 µg globulinas/pocillo	22
Figura 4. Electroforesis de gel al 15% en condiciones reductoras, extracto prolaminas normalizado a 60 µg de prolamina/pocillo	23
Figura 5. Electroforesis de gel al 15% en condiciones reductoras, extracto glutelinas normalizado a 60 µg glutelinas/pocillo	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de patrón, solución extractante y cantidad de patrón empleada	10
Tabla 2. Compuestos y cantidades empleadas para la curva patrón de cada fracción	11
Tabla 3. Composición de los geles concentrador y separador para un gel de electroforesis al 12% y al 15%	11
Tabla 4. Composición PLBx5	12
Tabla 5. Propiedades funcionales de la harina de tef blanco, nativa y tratadas con microondas durante 1, 2 y 6 min.	13
Tabla 6. Resultados de la determinación de la concentración proteica (mg de proteína/g materia seca)	19

ABREVIATURAS EMPLEADAS

BEDCA: Base de Datos Española de Composición de Alimentos

MW: Tratamiento microondas

PA/PP: poliamida y polipropileno

WHC: Water Holding Capacity

WAC: Water Absorbtion Capacity

OAC: Oil Absorbtion Capacity

WAI: Water Absorbtion Index

WSI: Water Solubility Index

SP: Swelling Power

EA: Emulsifying Activity

ES: Emulsion Stability

FC: Foaming Capacity

FS: Foaming Stability

DTT: 1,4 – dithiothreitol

ANOVA: Análisis de varianza

BSA: albúmina de suero bovina

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

PLB: Protein loading buffer

PSA: Persulfato amónico

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

2-ME: 2-Mercaptoetanol

MK: marker

Agua MQ: Agua desionizada ultrapura

RESUMEN

En la actualidad, muchos de los productos sin gluten disponibles en el mercado son de baja calidad y con deficiencias organolépticas, además de presentar un alto precio. Por ello, las industrias están investigando qué tratamientos pueden mejorar la calidad de estos productos, como, por ejemplo, el tratamiento con microondas sobre la harina de distintos cereales. El presente trabajo se ha centrado en estudiar el impacto que tiene el tiempo de tratamiento con microondas sobre las fracciones proteicas y las propiedades funcionales de la harina del cereal tef, explorando el efecto de tratamientos cortos/suaves y de tratamientos más intensos.

Se realizaron tratamientos con microondas sobre la harina de tef con una humedad adaptada al 20%. Los tiempos de tratamiento fueron 1, 2 y 6 min. Para evaluar la efectividad del tratamiento se realizaron pruebas funcionales de la harina nativa y las sometidas a tratamiento. Con ello, se comprobó que los tratamientos largos afectan significativamente a esta harina.

Para establecer el impacto de la intensidad del tratamiento sobre las diferentes fracciones proteicas de la harina de tef se realizó un fraccionamiento proteico de las harinas tratadas y nativa, previamente desengrasadas, para obtener extractos de cada fracción: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. En estos extractos se determinó la concentración de cada fracción proteica mediante el método Bradford y se obtuvo el patrón de bandas mediante SDS-PAGE. En la cuantificación de proteínas se observó que no había diferencias significativas entre la harina nativa y la tratada durante 1 min; en cambio, sí que había diferencias con las otras dos harinas tratadas de forma más prolongada, viéndose más afectada la de mayor duración de tratamiento. En el SDS-PAGE se observó una reducción del patrón de bandas de albúminas y globulinas de harina tratada durante 6 min; en cambio, en el patrón de las prolaminas y las glutelinas de la misma harina no se observaron diferencias entre bandas.

Palabras clave: productos sin gluten, harina de tef, tratamiento microondas, propiedades funcionales, fraccionamiento proteico y SDS-PAGE.

ABSTRACT

Nowadays, many of the gluten-free products available on the market are of low quality and organoleptic deficiencies, as well as being expensive. Thus, industries are investigating which treatments can improve the quality of these products, such as, for instance, microwave treatment of flour from different cereals. The current paper has focused on the impact of microwave treatment time on the protein fractions and functional properties of teff flour, exploring the effect of short/gentle treatments and more intense ones.

Microwave treatments were carried out on teff flour with a moisture content of 20%. Treatment times were 1, 2 and 6 min. To evaluate the effectiveness of the treatment, functional tests were carried out on native and treated flour. As a result, it was found that long treatments significantly affect this flour.

To establish the impact of treatment intensity on the different protein fractions of teff flour, protein fractionation of the treated and native flours, previously defatted, was carried out to obtain extracts of each fraction: albumins, globulins, prolamins and glutelins. In these extracts, the concentration of each protein fraction was determined by the Bradford method and the banding pattern was obtained by SDS-PAGE. In the protein quantification, it was observed that there were no significant differences between the native flour and the flour treated for 1 min. On the other hand, there were indeed differences with the other two flours treated for longer periods, with the flour treated for longer periods being more affected. SDS-PAGE showed a reduction in the banding pattern of albumins and globulins of flour treated for 6 min. By contrast, in the pattern of prolamins and glutelins of the same flour showed no differences between bands.

Keywords: gluten-free products, teff flour, microwave treatment, functional properties, protein fractionation and SDS-PAGE.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca es un trastorno inflamatorio de origen autoinmune que afecta a la mucosa del intestino delgado en pacientes susceptibles genéticamente, inducido por la ingesta de gluten. Esta patología tiene una fuerte asociación con los genes *HLA* (locus CELIAC1, cromosoma 6p21), de los cuales, la mayor parte de enfermos celiacos presenta una variante de la molécula HLA-DQ2/DQ8. Estas moléculas, junto con los péptidos del gluten, son presentadas por las células dendríticas a los linfocitos T CD4+, que inducen una respuesta proinflamatoria dominada por la producción de IFN- γ (Arranz y Garrote, 2010).

La inflamación originada da lugar a una pérdida de las microvellosidades intestinales y degeneración del epitelio, que pueden dar lugar a distintas manifestaciones clínicas, como el síndrome de malabsorción con esteatorrea, desnutrición calórico-proteica o edema; además de todas las patologías autoinmunes asociadas, como la diabetes mellitus tipo 1 o anomalías neurológicas como el Síndrome de Down (Moscoso y Quera, 2015).

Por este motivo, los pacientes celiacos deben evitar el consumo de gluten en su dieta, siendo este el único tratamiento eficaz existente en la actualidad. Este compuesto es una mezcla compleja de gran variedad de proteínas, destacando entre ellas la gliadina y la glutenina, denominadas comúnmente prolaminas. Se nombran distintamente según el cereal que tratemos, como la secalina en el centeno, la hordeína en la cebada y la avenina en la avena, pero se las denomina colectivamente “gluten” (Biesiekierski, 2017). Esto implica, que, a pesar de que el contenido de estas proteínas varíe de unos cereales a otros, los celiacos deben evitar todo aquel que las contenga, es decir, seguir una dieta que excluya el trigo, cebada, centeno y avena; empleando otros cereales libres de estas proteínas desencadenantes de la respuesta patológica, como es el caso del arroz, el maíz y el tef.

Muchos de los productos sin gluten disponibles en el mercado son de baja calidad y con deficiencias organolépticas, ya que esta proteína es la encargada de formar la estructura en los productos de panificación. Además, cuentan con una vida útil corta y un precio elevado. Es por ello, que crear productos libres de gluten con buenas características organolépticas y precios asequibles suponga un reto para la industria en la actualidad.

Los cereales constituyen un pilar fundamental en la alimentación de muchas poblaciones en todo el mundo, siendo la principal fuente de carbohidratos y encontrándose en la base de la pirámide alimentaria recomendada por los expertos. Los enfermos celiacos no tratados presentan frecuentemente déficit de bastantes micronutrientes: hierro (32%), ácido fólico (35-49%), zinc (20-31%), vitamina B12 (10,5%), etc. Por ello, es vital llevar una correcta alimentación, variada, completa, equilibrada y libre en gluten (Moscoso y Quera, 2015).

TEF

El Tef (*Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter) es un cereal tropical básico en Etiopía, siendo el cultivo más importante en términos de área de cultivo y valor de producción. Pertenece a la familia de las *Poaceae*, subfamilia Eragrostoidae, tribu Eragrosteae y género Eragrostis. Es la única especie cultivada de las 350 especies del género Eragrostis que se conocen.

Su nombre se puede escribir con dos 'f', como se puede encontrar en gran parte de la bibliografía de Internet; o bien, solamente con una 'f', como lo denomina el Instituto Etíope de Investigación Agrícola, en Adís Abeba (Etiopía), donde, como se ha dicho, el tef es un cereal de gran valor. Para el presente trabajo se ha escogido la palabra tef con una 'f'.

Es clasificado según el color para fines comerciales, de forma que se encuentran tres tipos según el color de la semilla: *netch* (blanco), *qey* (rojo/marrón) y *sergegna* (mixto). Su grano no tiene cáscara, y presenta un color desde el blanco lechoso hasta el marrón oscuro. Tiene forma ovalada con un tamaño de 0,9 a 1,7 mm de longitud y 0,7 a 1 mm de diámetro. Debido a su tamaño, la harina de tef es de grano entero, por lo tanto, es rica en fibra al contener los componentes del salvado (López y González, 2018). Entre otros efectos, se ha visto que el tef tiene actividad antioxidante, mejorando el nivel de hemoglobina y ayudando a prevenir la malaria y la incidencia de anemia y diabetes (Gebremariam, *et al.*, 2014). También es fuente de compuestos bioactivos como los polifenoles (Shumoy y Raes, 2016).

El tef, al igual que otros cereales, está compuesto principalmente por almidón (73%), teniendo un contenido superior incluso al del trigo o el maíz. Esto lo convierte en un cereal sin gluten potencial para reemplazar a otros cereales en sus aplicaciones como fuente de energía alimentaria. Otra de sus ventajas es su valor proteico, ya que contiene entre 8 -11% de proteína (Gebremariam, *et al.*, 2014).

Hoy en día, es un alimento que está cobrando vital importancia en la industria alimentaria debido a que su valor nutritivo es similar al de otros cereales, teniendo como característica fundamental, la ausencia de gluten. Además, es una fuente rica en proteínas y otros nutrientes, teniendo un contenido en hierro (17-80 mg de hierro/100 g de tef) muy superior al del trigo (3,3 mg de hierro/100 g de trigo) (Ronda, *et al.*, 2015; BEDCA, 2021). Aporta gran multitud de micronutrientes, como el calcio, magnesio, fósforo, sodio, vitaminas C, A, K y vitaminas del grupo B. La demanda de alimentos libres de gluten se ve aumentada a medida que más personas son diagnosticadas con celiaquía.

Este cereal es molido para convertirlo en harina que después se cuece y se come como *injera*, que es un tipo de hojuela horneada con sabor ácido (Latham, 2002). Otros usos del tef incluyen bebidas alcohólicas denominadas tela y katikala, y gachas. Fuera de Etiopía también emplea para la elaboración de pan, gachas, muffin, galletas, pasteles...etc. (Ekeru, *et al.*, 2021).

Actualmente, la harina de teff se emplea en la elaboración de productos sin gluten, como pan, masa madre, galletas, pasta y otros productos, con el objetivo de mejorar su calidad nutricional manteniendo un índice glucémico bajo. En algunos países como Australia, Sudáfrica y Estados Unidos se utiliza como cultivo forrajero para la alimentación animal, empleándose como pienso de caballos y bueyes (Ramos-Flores, 2020). Su paja se puede utilizar para la producción de biometano y como absorbente de cromo en aguas residuales contaminadas (McCown, *et al.*, 2012; Chakraborty, *et al.*, 2019).

Además, como indican muchos autores, en comparación con otros cereales, tiene una buena capacidad de adaptación a distintos entornos, considerándose un cereal muy resistente a las plagas de almacenamiento y especialmente al anegamiento, lo que se conoce como inundación de un terreno. Sus semillas siguen siendo viables durante varios años siempre que se evite el

contacto directo con la luz solar y la humedad, por lo que se puede almacenar sin necesidad de protección química (Assefa, *et al.*, 2015; Zhu, 2018; Gebremariam, *et al.*, 2014).

No obstante, el tef tiene deficiencias para convertirse en un producto mundial generador de ingresos para los productores. Los principales factores limitantes del rendimiento del tef son la falta de cultivares tolerantes al acame, la sequía y las plagas. Esta planta tiene tallos altos y débiles, y a pesar de su capacidad de adaptación a distintos climas, aún no se ha conseguido cultivar tef con resistencia al acame, que consiste en la inclinación del tallo de la planta debido a la acción del viento (Assefa, *et al.*, 2015).

A pesar del interés nutricional y las peculiaridades del grano de tef, todavía es necesario seguir investigando sobre las propiedades funcionales, ya que es un cereal que tiene mucha importancia a nivel nacional, pero poca fuera de Etiopía, pudiendo sacar beneficios en la producción de alimentos sin gluten. Incluso fuentes de información sobre alimentos como la BEDCA “Base de Datos Española de Composición de Alimentos” excluye a este cereal de sus listas de contenido (Abebe, *et al.*, 2015).

TRATAMIENTOS FÍSICOS

En la actualidad, las industrias alimentarias buscan distintas alternativas para obtener productos libres de gluten con buenas características organolépticas y buena calidad. Para ello, emplean distintos tratamientos entre los que se encuentran tratamientos físicos y tratamientos químicos. Entre estos, es elegido como una mejor opción el físico, debido a que este es más respetuoso con el medioambiente que los tratamientos químicos, ya que se reduce el uso de productos químicos y la producción de desechos (Sujka, 2017). Además, los tratamientos químicos hay que especificarlos en la etiqueta del producto, lo cual va en contra de la creciente demanda de alimentos con etiqueta limpia. Un etiquetado limpio implica que en la elaboración del producto se emplee el menor número posible de aditivos, procurando que los ingredientes sean reconocidos y considerados saludables por los consumidores. Por este motivo, los tratamientos físicos son considerados el método más adecuado para el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria (Radeloff y Beck, 2016).

Uno de los tratamientos físicos investigados son los ultrasonidos, que consiste en la aplicación de ondas mecánicas entre 15 y 20 kHz o más, que provocan una modificación en el almidón dando lugar a su despolimerización. Este tratamiento se ve afectado por otros factores como la potencia y frecuencia de los ultrasonidos, la cantidad de energía aportada, la temperatura y duración del tratamiento o el tipo y la composición del almidón (Sujka, 2017).

Otro de los tratamientos físicos de interés hoy en día es el tratamiento hidrotérmico asistido con microondas (MW). La radiación de microondas consiste en ondas electromagnéticas con frecuencias entre 1 y 300 GHz que pueden absorberse eficientemente por moléculas polares, como el agua. Proporciona un calentamiento más uniforme y rápido de las muestras que los tratamientos hidrotérmicos de calentamiento que se usan habitualmente; y se ha empleado para modificar las propiedades de harinas y almidones. La energía aplicada sobre la muestra se absorbe a nivel molecular, originando un aumento rápido de temperatura en todo el volumen de la muestra dependiendo de la humedad que contenga la harina; pero según la intensidad del

tratamiento aplicado, las proteínas pueden ganar o perder la funcionalidad (Ashraf, *et al.*, 2012; Villanueva, *et al.*, 2018).

Hasta ahora se desconoce cómo afecta el tiempo de tratamiento de microondas en la estructura de las proteínas y la solubilidad de las fracciones proteicas. Tampoco se conoce si el tiempo de tratamiento microondas afecta a las propiedades funcionales de la harina de tef, dependientes de la estructura del almidón.

1.1. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se engloba en un estudio más amplio realizado por el grupo de investigación PROCEREALTech en el Edificio LUCIA de la Universidad de Valladolid, compuesto por investigadores del Área de Tecnología de los Alimentos. Sus investigaciones tienen como fin estudiar el efecto que tienen diferentes tratamientos sobre las propiedades físicas, químicas, sensoriales y nutricionales de distintos cereales para mejorar la calidad de los productos elaborados con las harinas de estos.

En muchos de sus trabajos de investigación han estudiado el efecto del tratamiento hidrotérmico con microondas sobre el almidón de harinas de distintos cereales y pseudocereales.

1.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es determinar el efecto del tiempo de tratamiento con microondas sobre las propiedades funcionales y las fracciones proteicas de harina de tef blanco con el fin de mejorar su calidad y características organolépticas.

Objetivos secundarios:

1. Análisis y estudio del efecto del tiempo de tratamiento con microondas sobre las propiedades funcionales de la harina de tef.
2. Puesta a punto de los procedimientos empleados en el fraccionamiento proteico.
3. Análisis y estudio del efecto del tratamiento con microondas sobre las composiciones de las diferentes fracciones proteicas de la harina de tef.
4. Análisis y estudio del efecto del tratamiento con microondas sobre el patrón de bandas en SDS-PAGE de las fracciones proteicas de la harina de tef.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL DE LABORATORIO

1. Harina empleada:
 - a. Harina de tef blanco: variedad DZ-CR – 438, suministrada por el Centro Debre Zeit del Instituto Etíope de Investigación Agrícola (EIAR, Adís Abeba, Etiopía). Apertura: 23/1/2018.
2. Agua MQ: Agua Milli-Q (de calidad equivalente a desionizada). Equipo: Elix Technology Inside.
3. Aceite empleado para propiedades funcionales: Aceite de maíz Koipe Assua (Deoleo, Córdoba, España).
4. Equipos y material fungible empleado (ANEXO I).
5. Reactivos (ANEXO II).

2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Se empleó el método de análisis aprobado por la AACC (AACC, Approved Methods of Analysis, 2009), para la determinación de la humedad de las muestras. Se emplearon 4 g de harina. Para ello, primero se atemperaron 2 cápsulas de acero inoxidable en un desecador, y una vez frías, se pesaron. Tras esto, se echaron 2 g de harina en cada una de las cápsulas y se introdujeron en una estufa a 130°C durante 1 hora y 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se dejaron atemperar en el desecador durante 45 min (aproximadamente), y, nuevamente se pesaron las cápsulas con las muestras. Para el calcular la humedad se realizaron los siguientes cálculos:

$$\text{MATERIA SECA (\%)} = 100 * (\text{Peso final cápsula + muestra} - \text{Peso cápsula}) / \text{Peso muestra}$$

$$\text{HUMEDAD (\%)} = 100 - \text{materia seca (\%)}$$

Se realizó este método para conocer cuál era la humedad inicial de la que partía la harina.

2.2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El tratamiento con microondas se realizó sobre harina de tef blanco con una humedad normalizada del 20%. Para conseguir esta humedad, se realizó un proceso de humidificación de la harina, ya que esta partía de una humedad inicial entorno al 12%. Una vez que la harina estaba humedecida, se dejó reposar en refrigeración durante 24 horas para que la humedad se repartiera de forma uniforme por toda la harina. Después, se comprobó que su humedad estuviera en 20±0.4% (según el método del apartado 2.2.1.), y tras confirmarlo, se dividió la harina en bolsas de PA/PP (53 g de harina/bolsa), las cuales se congelaron a -40°C hasta su tratamiento por microondas.

2.2.3. TRATAMIENTO MICROONDAS

Las muestras de harina fueron sometidas a distintos ciclos de tratamiento microondas. Para ello, se emplearon 50 g de muestra y se introdujeron en un recipiente cilíndrico hermético de teflón, para evitar que se perdiera humedad durante el tratamiento. En el interior, dicho recipiente, contenía un deflector que ayudaba a la harina a moverse durante el tratamiento.

Una vez tuvimos la muestra en el recipiente, se colocó sobre un soporte de teflón en el equipo de microondas, donde giraba gracias a un motor externo para que la radiación electromagnética se distribuyera de forma homogénea.

Se trataron las muestras en ciclos de 10 – 50; lo cual quiere decir que de los 60 segundos que tiene 1 minuto, 10 segundos se está aplicando calor a la muestra y 50 segundos no; por lo tanto, para conseguir 1 min completo de tratamiento se debían programar 6 min. Esto se realiza para que no haya un cambio tan brusco de temperatura y la subida sea de forma gradual. Se realizaron 3 tratamientos de distinta duración:

- 6 minutos, de los cuales, la harina se sometió a 1 minuto de radiación de microondas.
- 12 minutos, de los cuales, la harina sufrió un tratamiento microondas de 2 minutos.
- 36 minutos, de los cuales, la harina sufrió un tratamiento de 6 minutos.

Durante estos tratamientos la muestra alcanzó una temperatura superior a 70°C e inferior a 150°C. Después de cada tratamiento, se volvió a pesar cada bote con la muestra.

Tras el tratamiento microondas, las muestras se sometieron a un proceso de desecación en una incubadora a 35°C para disminuir la humedad de la harina de un 20% a un valor inferior al 14%. El objetivo de este secado fue la conservación de la muestra ya que, con una humedad superior, del 20%, puede producirse su deterioro debido al crecimiento microbiano, en particular, por la aparición de mohos. Para comprobar la humedad de la harina se realizó una estimación por la diferencia de peso antes y después del secado. Una vez se desecó la harina, se tamizó con un tamiz de 250 micras y aquellos aglomerados formados durante el tratamiento que no lograban pasar el tamiz, se molieron en un molino de piedra, consiguiendo un tamaño de partícula más homogéneo.

Finalmente, se determinó la humedad de las harinas tratadas según el método del apartado 2.2.1.



Figura 1. Esquema del proceso y preparación de la muestra

2.2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES

Capacidad de retención del agua (WHC)

Se realizó esta prueba para conocer la capacidad que tiene la harina de tef blanco, con y sin tratamiento microondas, para mantener/retener agua añadido sin ser sometida a una fuerza externa. Dicha prueba se realizó por triplicado para cada muestra, empleando tubos tipo Falcon con faldón de 50 mL de peso controlado (PR) a los cuales se añadieron 20 mL de agua destilada. Después, se pesaron 2 g de muestra (PM), que fueron añadidos a cada tubo evitando que la muestra quedase en las paredes. Los tubos se sometieron a un reposo de 24 horas y a una temperatura entre 16 y 18°C. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante con una pipeta pasteur. A continuación, se pesaron los tubos con el precipitado (PT), y se calculó el WHC según la siguiente ecuación:

$$WHC \text{ (g agua/g muestra)} = (PT - PR - PM) / PM$$

Para conocer el WHC expresado en materia seca (g agua/g materia seca muestra) se empleó la ecuación:

$$WHC \text{ en materia seca} = 100 * WHC / (100 - H)$$

H: Humedad de la muestra %

Capacidad de absorción de agua o aceite (WAC y OAC)

Estas pruebas tienen el fin de cuantificar la capacidad que tiene una harina de absorber agua (en el caso de WAC) o aceite (para OAC) al aplicar una fuerza externa. El procedimiento para ambas pruebas es el mismo, diferenciándose únicamente en el empleo de agua o aceite según la prueba realizada. Al igual que la anterior, se realizaron por triplicado, pero esta vez con tubos Falcon sin faldón de 50 mL (PR), a los cuales se añadió 2 g de muestra (PM). Seguidamente, se añadieron 20 mL de agua destilada o aceite (según la prueba realizada) a cada tubo y se agitaron en el vórtex durante 30 segundos, en 3 ciclos con 10 segundos de reposo entre cada ciclo. Tras ello, se sometieron a una centrifugación de 30 min a 3000 xg a 20°C. Los sobrenadantes obtenidos se desecharon, y finalmente se pesaron los tubos con la muestra para calcular el WAC y OAC:

$$WAC, OAC \text{ (g agua, aceite /g muestra)} = (PT - PR - PM) / PM$$

Para calcular WAC, OAC en materia seca:

$$WAC, OAC \text{ en materia seca} = 100 * (WAC, OAC) / (100 - H)$$

H: Humedad de la muestra en %

Índice de absorción de agua, índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento (WAI, WSI y SP)

Estas pruebas permiten conocer la capacidad de absorción de agua de la harina durante su gelatinización. Se realizaron estas pruebas para conocer la capacidad de absorber agua, la solubilidad en agua y el poder de hinchado de harina como resultado de su calentamiento hasta ebullición (y, en general, gelatinización) en exceso de agua.

Este procedimiento se realizó por triplicado con tubos Falcon con faldón de 50 mL con peso controlado (PR), a los cuales se añadieron 2 g de muestra (PM). A continuación, se añadieron 20 mL de agua destilada a cada tubo y se agitaron durante 30 segundos en un vórtex. Tras esto, se metieron en baño de agua hirviendo durante 15 min. Finalizado el tiempo, se dejaron enfriar durante 1 hora, y se centrifugaron a 3000 xg durante 10 min a 20°C. El sobrenadante obtenido se vertió sobre las cápsulas de metal pesadas previamente (PC), las cuales se introdujeron en la estufa a 110°C durante 24 horas y se pesaron con el residuo seco (PSL). Los precipitados obtenidos en la centrifugación se pesaron en sus respectivos falcon (PS). Con los datos obtenidos se calcularon el WAI, WSI y SP:

$$WAI \text{ (g gel/g harina)} = (PS - PR) / PM$$

$$WSI \text{ (g sólidos solubles/100 g de harina)} = 100 * (PSL - PC) / PM$$

$$SP \text{ (g gel/g harina insoluble)} = (PS - PR) / (PM - (PSL - PC))$$

Para calcularlo en materia seca se empleó la siguiente ecuación:

$$100 * WAI, WSI, SP / (100 - H)$$

H: humedad de las harinas en %

Actividad de emulsión y estabilidad de emulsión (EA / ES)

Esta prueba cuantifica la capacidad de formar emulsiones que tiene la harina y la estabilidad de estas. Se realizó empleando 7 g de harina, 100 mL de agua destilada y 100 mL de aceite de maíz que se mezclaron en un homogeneizador a 1000 rpm durante 1 min. Tras ello, la emulsión obtenida se repartió en 4 tubos Falcon sin faldón de 50 mL (VT= 45 ml a cada falcon), los cuales, se centrifugan a 1300 xg durante 5 minutos y se midió el volumen ocupado por la emulsión (VE_i).

Después, los tubos fueron calentados en un baño a 80°C durante 30 min, y una vez se enfriaron, se centrifugaron en las mismas condiciones. Finalmente, se anotó la emulsión obtenida (VE₈₀) y se calculó EA y ES empleando estas fórmulas:

$$EA \text{ (\%)} = 100 * (VE_i / VT)$$

$$ES \text{ (\%)} = 100 * (VE_{80} / VT)$$

Capacidad de espumación y estabilidad de la espuma (FC / FS)

Con esta prueba se mide la capacidad que tiene una muestra de harina para formar espuma y la estabilidad de la espuma formada. Se realizó por duplicado, empleando 2 g de muestra, los cuales, se añadieron a una probeta con 40 mL de agua destilada. A continuación, se cubrió la probeta con varias capas de Parafilm, y se agitó fuertemente de forma manual durante 5 min a un ritmo constante. Pasado este tiempo se midió el volumen total (VF₀) y el volumen de la espuma (VE₀). Tras ello, se dejó 1 hora de reposo y se volvió a anotar el volumen que ocupa la espuma (VE₆₀) y el volumen total (VF₆₀). Finalmente, se calculó FC y FS con estas fórmulas:

$$FC \text{ (mL)} = VE_0$$

$$FS \text{ (\%)} = (VE_{60} / VE_0) * 100$$

2.2.5. DESENGRASADO

Con la harina obtenida del tratamiento por microondas se realizó un desengrasado de cada tipo de muestra previo al fraccionamiento proteico, para evitar que los lípidos que contiene la harina influyeran en este procedimiento. Para ello, se prepararon 4 tubos Falcon sin faldón para cada tipo de muestra, los cuales se pesaron y echaron 2,5 g de muestra en cada uno, haciendo un total de 10 g de cada tipo de muestra (nativa y tratamiento microondas de 1, 2 y 6 min).

En una campana extractora, se echaron 20 mL de hexano a cada Falcon y se agitaron en un vórtex hasta que se mezcló el contenido, unos 30 segundos aproximadamente. Tras ello, se colocaron los tubos en un agitador orbital durante 17 horas a 270 rpm y a una temperatura de 30°C. Cuando había transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 20°C y 1500 xg. Después, el hexano fue retirado con una pipeta pasteur procurando que no se levantara la muestra.

Se realizó un lavado con hexano igual a lo descrito excepto en la duración del tiempo de agitado en el orbital, que pasó a ser de 4 horas. Para eliminar completamente el hexano, se dejaron destapados los tubos en la campana extractora durante una noche, ya que se trata de un compuesto volátil. Finalmente, se determinó la cantidad de muestra desengrasada obtenida por cada 10 g de la muestra original.

2.2.6. FRACCIONAMIENTO PROTEICO

Se realizó el fraccionamiento proteico de las muestras de harina de tef blanco nativa y con tratamiento microondas, siguiendo el modelo propuesto por Osborne (1924), en el que clasifica las proteínas en función de su solubilidad:

1. **Albúminas (Ab):** solubles en agua.
2. **Globulinas (Gb):** solubles en sal.
3. **Prolaminas (Pl):** solubles en alcohol.
4. **Glutelinas (Gt):** solubles en ácidos o bases.

En el caso de las albúminas se empleó como solución de extracción agua MQ; para las globulinas, un tampón TRIS, compuesto por Tris Base 50mM (pH 7-8), KCl 50mM y EDTA 5mM; para las prolaminas, una disolución de propanol en agua al 50% (v/v); y para la extracción de las glutelinas se empleó una disolución compuesta por propanol 50% (v/v) y DTT 1% (w/v).

Como se ha comentado anteriormente, para evitar posibles alteraciones debido a la presencia de lípidos, las muestras fueron previamente desengrasadas.

La extracción de proteínas se realiza de forma secuencial, de forma que todos los extractos provengan de la misma muestra, comenzando por las albúminas.

Se partió de 50 mg de harina nativa o tratada con microondas, ya desengrasadas, a los cuales se añadió 1,5 mL de solución de extracción (según la proteína que se tratase). Una vez añadida la solución, se agitó cada tubo en un vórtex para asegurar que toda la muestra estuviera en contacto con dicha solución. Después, las muestras se sometieron a una agitación orbital continua de 270 rpm durante 20 horas a una temperatura de 20°C. Transcurrido este tiempo, se

centrifugaron las muestras a 15.000 xg durante 5 min a una temperatura de 20°C. El sobrenadante obtenido es el extracto de la proteína analizada. Los sobrenadantes se retiraron con una pipeta y se juntaron en un mismo eppendorf.

Los precipitados obtenidos se sometieron a 3 lavados con 1 mL de solución extractante, agitando en vórtex y centrifugando en las mismas condiciones empleadas para la obtención del extracto, es decir, se repitió el proceso excluyendo la agitación en el orbital. Los sobrenadantes obtenidos se desecharon.

Las glutelinas, que son las últimas proteínas en extraer, se realizan de forma distinta. En este caso, se centrifugan durante 10 min a 15.000 xg a 20°C y no se realiza ningún lavado.

Los extractos obtenidos se congelaron a -80°C hasta el momento de usarlos en la electroforesis de gel o cuantificación de Bradford. Una vez se han obtenido las proteínas de interés, los precipitados se desechan.

2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La determinación de la concentración de las fracciones proteicas se realizó siguiendo el método Bradford, el cual, es un proceso basado en la unión de la proteína analizada a un colorante, en este caso, el azul brillante de Coomassie G-250. Es un método de espectroscopía en el que esta unión produce un cambio en la absorbancia máxima del colorante, cuyo rango es de 465 a 595 nm, incrementándose la absorbancia a 595 nm que es la longitud de onda empleada (Bradford, 1976).

Este método se aplicó a las fracciones proteicas de las harinas nativas y tratadas con microondas que fueron desengrasadas previamente. El reactivo de Bradford se preparó a partir de azul brillante de Coomassie 0,01% (w/v), etanol 4,7% (v/v), ácido ortofosfórico 8,5% (v/v). Entre determinaciones, el reactivo de Bradford se mantuvo a temperatura ambiente sin exposición a la luz.

Se realizó una curva de calibrado mediante la medida de soluciones patrón, indicadas en la Tabla 1. Para la medida de los patrones se emplearon los componentes indicados en la tabla 2. Dicha curva tiene como eje de ordenadas la diferencia entre la absorbancia medida con los patrones y el blanco; y como eje de abscisas, la concentración en mg/mL.

Tabla 1. Tipo de patrón, solución extractante y cantidad de patrón empleada

FRACCIÓN PROTEICA	PATRÓN	SOLUCIÓN EXTRACTANTE	CONCENTRACIÓN PATRÓN MADRE
Albúminas	BSA	Agua	0,6 mg/mL
Globulinas	BSA	TRIS HCl	0,4 mg/mL
Prolaminas	Gliadina	Propanol 50%	1 mg/mL
Glutelinas	Gliadina	Propanol 50% + DTT 1%	1 mg/mL

Tabla 2. Compuestos y cantidades empleadas para la curva patrón de cada fracción

COMPUESTOS	TUBOS					
	1	2	3	4	5	6
Bradford	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL	3 mL
Solución ext.	0 µL	20 µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL
Patrón	100 µL	80 µL	60 µL	40 µL	20 µL	0 µL

En el caso de la medida de las muestras se tomaron 50 ó 100 µL en función de la concentración de proteína en el extracto, al objeto de que su absorbancia quedase comprendida en los valores obtenidos para los patrones en la curva de calibrado. Esta mezcla fue agitada y reservada durante un periodo de incubación de 5 min, tras los cuales, fue medida en el espectrofotómetro a 595 nm.

2.2.8. ELECTROFORESIS DE GEL

Se realizó una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAGE) con el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), siguiendo el método Laemmli (1970), por el cual las proteínas se separan en función de su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico en condiciones desnaturalizantes. El gel empleado estaba compuesto por un gel concentrador (stacking gel) al 4% (w/v), y un gel separador (resolving gel) al 12% (w/v). Como su nombre indica, estos geles sirven para concentrar la muestra y para la separación proteica. La composición de los geles se encuentra en la Tabla 3.

Para la preparación de las muestras, se calcularon los µL necesarios para emplear 60 µg de muestra a partir de su concentración en mg/mL, obtenida en la espectrofotometría a partir de los extractos de cada fracción. Las muestras tomadas se sometieron a una speed-back (centrifugación al vacío) durante 2 horas para que se concentrasen y se eliminase la solución extractante.

Tabla 3. Composición de los geles concentrador y separador para un gel de electroforesis al 12% y al 15%

PARA UN GEL	RESOLVING GEL 12%	RESOLVING GEL 15%	STACKING GEL 4%
MQ	3,25 mL	2,69 mL	1,585 mL
Tris 1,5M pH 8,8	1,88 mL	1,88 mL	-
Tris 0,5M pH 6,8	-	-	0,625 mL
Acrilamida	2,25 mL	2,81 mL	250 µL
SDS 10%	75 µL	75 µL	18,75 µL
PSA 10%	37,5 µL	37,5 µL	18,75 µL
TEMED	3,75 µL	3,75 µL	2,35 µL
VOLUMEN TOTAL	7,5 mL	7,5 mL	2,5 mL

Se utilizó el *protein loading buffer* o tampón de carga x1 (PLB x1) (dilución 5 veces del PLB x5), en condiciones reductoras, es decir, en presencia de 2 mercaptoetanol, que rompe los puentes disulfuro proteicos. Se utilizaron 200 µL del PLB x5 y 800 µL de agua MQ para la elaboración del PLB x1, empleado para las electroforesis de gel realizadas.

A cada muestra se añadió 25 µL de PLB x1, empleándose para la electroforesis de gel 20 µL del total. Las muestras se sometieron a una ebullición a 100°C durante 5 min antes de introducir las en los pocillos.

Tabla 4. Composición PLBx5

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	0,00625%

Para conocer los pesos moleculares de las proteínas se utilizó de referencia un marker o estándar de pesos moleculares proteicos para tinción con Coomassie Brilliant Blue, con bandas de pesos proteicos desde 10 kDa hasta 180 kDa.

Las electroforesis se llevaron a cabo durante 1 hora y 10 min aproximadamente, a una intensidad de 25 mA por gel y 300 V. Cuando finalizaron, se separó el stacking del resolving, se tiñó con una disolución de Coomassie Brilliant Blue, cuya composición es azul de Coomassie 0,1% (w/v), ácido acético 10% (v/v), metanol 40% (v/v) y agua MQ 50% (v/v) en un vaivén durante 10 min.

Tras, ello se destiñó con un disolvente compuesto por metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua destilada 50% (v/v), durante 1 hora y 30 min para poder fotografiar el gel y ver las bandas proteicas.

2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comprobar el efecto del tratamiento con microondas a distintos tiempos sobre la harina de tef blanco se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos de las propiedades funcionales y de las concentraciones proteicas medidas sobre la harina nativa y sobre las harinas tratadas. Para ello, se empleó el programa Statgraphics Centurion XVIII (Statpoint Technologies Inc.) 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.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto que tiene el tiempo de tratamiento con microondas sobre las propiedades funcionales y las fracciones proteicas de la harina de tef blanco. Para ello, se normalizó la humedad de la harina a un 20% y se trató con microondas durante 1, 2 y 6 min. Con las harinas tratadas y la harina nativa se tomaron dos caminos: por un lado, se midieron las propiedades funcionales de cada harina; y por otro, se desengrasaron para realizar después un fraccionamiento proteico. Finalmente, con los extractos obtenidos de cada fracción se determinó la concentración proteica y se analizó el patrón de bandas de las fracciones proteicas.

Una vez concluidos los ensayos experimentales, se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos. A continuación, se detallan y discuten los resultados obtenidos para cumplir el objetivo del trabajo.

3.1. PROPIEDADES FUNCIONALES

Se realizaron las pruebas correspondientes para analizar y estudiar el efecto que tiene el tiempo de tratamiento de microondas sobre las propiedades funcionales de la harina de tef blanco. También se realizaron dichas pruebas sobre harina de tef blanco nativa para comparar los resultados de la harina sometida a tratamiento con una sin tratar.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos del análisis de las propiedades funcionales analizadas para las muestras de tef blanco nativa y tratadas con microondas durante 1, 2 y 6 min que se encuentran recogidos en la Tabla 5. Seguidamente, se discutirán los resultados obtenidos para cada propiedad.

Tabla 5. Propiedades funcionales de la harina de tef blanco, nativa y tratadas con microondas durante 1, 2 y 6 min.

HARINA	WHC	WAC	OAC	WAI	WSI	SP	EA	ES	FC	FS
NATIVO	2,03 ^a	0,93 ^a	0,89 ^a	6,38 ^a	6,38 ^a	6,76 ^a	50,40 ^d	11,4 ^b	3,98 ^b	80,51 ^c
MW 1	2,22 ^b	0,95 ^a	1,16 ^b	6,61 ^a	6,28 ^a	7,01 ^a	43,09 ^b	12,8 ^b	7,71 ^d	62,93 ^b
MW 2	2,24 ^b	1,01 ^b	1,23 ^b	6,62 ^a	6,27 ^a	7,01 ^a	49,23 ^c	17,2 ^c	5,54 ^c	88,65 ^c
MW 6	2,19 ^b	1,16 ^c	1,18 ^b	7,62 ^b	6,99 ^b	8,13 ^b	5,42 ^a	7,2 ^a	2,19 ^a	0,00 ^a
ERROR EST.	0,04	0,01	0,05	0,11	0,07	0,11	0,25	0,4	0,28	2,00

Los valores con letra diferente indican diferencias significativas (p -valor $<0,05$) para la variable estudiada en cada tipo de harina. Los datos mostrados son las medias obtenidas a partir del triplicado realizado para cada muestra. En la primera columna se identifica la muestra analizada (nativa y tratada con microondas (MW) durante 1,2 y 6 min) y en las siguientes, la propiedad funcional evaluada. WHC: capacidad de retención de agua (g H₂O/g muestra); WAC: capacidad de absorción de agua (g/g); OAC: capacidad de absorción de aceite (g/g); WAI: índice de absorción de agua (g/g); WSI: índice de solubilidad en agua (g/100g); SP: poder de hinchamiento (g/g); EA: actividad emulsionante (%); ES: estabilidad de emulsión (%); FC: actividad espumante (mL); FS: estabilidad de espuma (%). ERROR EST: Error estándar agrupado obtenido en el ANOVA.

3.1.1. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DEL AGUA (WHC)

Con esta prueba se analiza la capacidad de retención de agua que tiene la muestra nativa y las tratadas con microondas, la cual, está relacionada con la fracción proteica de la harina, y depende de la interacción proteína-agua, de tal forma que, a mayor número de estos enlaces, mayor será la capacidad de retención. (Traynham, *et al.*, 2007).

En los resultados obtenidos se pueden encontrar diferencias significativas entre la harina nativa y las tratadas con microondas. Como puede verse en la Tabla 5, las harinas tratadas tienen una capacidad de retención de agua mayor que la harina nativa, la cual parte de 2,03 g de agua retenida/g de muestra y alcanza hasta 2,24 g de agua retenida/g de muestra. Se observa un aumento del WHC como consecuencia del tratamiento, ya que hay diferencias significativas entre la harina nativa y las tratadas con microondas, aunque no se observaron diferencias significativas en función del tiempo de tratamiento. Por lo tanto, el tratamiento con microondas sobre la harina de tef blanco aumenta la capacidad de retención de agua que tiene la harina.

Teniendo en cuenta que los carbohidratos son más afines al agua que las proteínas, y que este cereal está compuesto en un 80% por hidratos de carbono (López y González, 2018), es probable que en la capacidad de retención de agua influyan estos componentes también a parte de las proteínas. En el presente trabajo no se ha estudiado el efecto que tiene el tratamiento con microondas realizado sobre los carbohidratos, por lo que sería interesante estudiarlo en investigaciones futuras para comprobar si realmente influyen en esta propiedad funcional.

3.1.2. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA Y ACEITE (WAC Y OAC)

Estas propiedades hacen referencia a la capacidad que tiene la harina de unirse con el agua (en el caso de la WAC) y con el aceite (en la OAC).

En ambas pruebas se han observado diferencias significativas entre las harinas. En el caso de la WAC, se observa un aumento progresivo de la capacidad de absorción de agua a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con microondas, partiendo de 0,930 g de agua absorbida /g de muestra en el caso de la harina nativa, y alcanzando 1,167 g de agua absorbida /g de muestra en el caso de la muestra tratada con microondas durante 6 min. No existen diferencias significativas entre la harina nativa y la tratada durante 1 min; en cambio, sí que se observan diferencias con la harina tratada con microondas durante 2 min y la tratada durante 6 min. Estos resultados confirman que, los tratamientos con microondas durante 2 y 6 min aumentan la capacidad de absorción de agua de la harina de tef blanco.

Esta capacidad se relaciona con la elaboración de fórmulas alimenticias como productos infantiles, mezclas en polvo y aderezos. También, en la preparación de embutidos como salchichas o en la elaboración de natillas y otras masas (Chaparro, *et al.*, 2011). Por lo tanto, sería interesante estudiar el uso de harina de tef blanco tratada con microondas durante 2 y 6 en dichas elaboraciones, ya que permitiría adicionar más agua.

En la OAC la diferencia significativa se encuentra entre el valor obtenido de la harina nativa y el de las harinas tratadas, de forma que la que tiene menor capacidad de absorción de aceite es la harina nativa con 0,898 g de aceite absorbido/g de muestra, y la que mayor, la harina tratada

con microondas durante 2 min con 1,237 g de aceite absorbido/g muestra. Al igual que en el WHC, hay que tener en cuenta que no se observaron diferencias significativas en función del tiempo de tratamiento. Por lo tanto, según lo obtenido en el análisis estadístico, el tratamiento con microondas mejora la capacidad de absorción de aceite.

Esta capacidad de las harinas es importante desde el punto organoléptico, ya que mejora la sensación en boca, manteniendo la textura suave del producto, y conserva el sabor. Además, aumenta la vida útil en productos de panadería (Kaur, *et al.*, 2005; Chaparro, *et al.*, 2011).

3.1.3. ÍNDICE DE ABSORCIÓN EN AGUA (WAI)

El índice de absorción de agua (WAI) indica el volumen que ocupa la harina después de gelatinizarse en exceso de agua. También, da una idea de la integridad del almidón en dispersiones acuosas, es decir, de la capacidad que tiene la región amorfa del almidón (compuesta principalmente por amilosa) de hincharse al absorber agua (Kaur, *et al.*, 2005).

Los valores obtenidos muestran diferencias significativas entre la harina tratada con microondas durante 6 min y el resto de harinas, siendo esta la que alcanzó un mayor valor, con 7,62 g de gel/g de harina. No se encontraron diferencias significativas entre la harina nativa (6,38 g gel/g harina), la tratada con microondas 1 min (6,62 g gel/g harina) y la tratada con microondas 2 min (6,61 g gel/g harina).

Esto implica que, en tratamientos con microondas largos (6 min), aumenta el índice de absorción de agua, lo cual puede deberse a que este tratamiento haga que las cadenas de proteínas se desplieguen, dando lugar a un aumento de puntos de unión con las moléculas de agua. Además, hay que tener en cuenta que el tratamiento puede estar aumentando el contenido de almidón dañado, el cual tiene una capacidad de absorción mayor, aumentando así el resultado del WAI (Feillet, 2000).

Aunque un alto contenido de almidón dañado se vea como un aspecto positivo para la retención de agua, es un parámetro que se debe controlar, ya que un exceso de este puede provocar una masa pegajosa y una corteza muy tostada en productos de horneado. Por lo tanto, el contenido de almidón dañado debe ser controlado en investigaciones futuras para optimizar la retención de agua sin disminuir la calidad del pan (Riad M., 2021).

3.1.4. ÍNDICE DE SOLUBILIDAD DE AGUA (WSI)

El índice de solubilidad de agua refleja la degradación del almidón, ya que determina la cantidad de polisacáridos liberados del gránulo de almidón en condiciones de exceso de agua (Yousf, *et al.*, 2017).

Se encontraron diferencias significativas entre la harina tratada con microondas durante 6 min y el resto de harinas tratadas y nativa, siendo esta la que obtuvo un resultado mayor, con 6,99 g sólidos solubles/100 g harina. La harina nativa y las tratadas durante 1 y 2 min no reflejaron diferencias significativas, alcanzando valores entre 6,27 y 6,38 g sólidos solubles/100 g de harina.

Al igual que el WAI, este parámetro aumenta cuando la harina es tratada con microondas durante 6 min.

3.1.5. PODER DE HINCHAMIENTO (SP)

Esta prueba funcional representa el grado de interacción entre las cadenas de almidón, concretamente entre las regiones cristalina y amorfa de este.

En la Tabla 5 se pueden observar los resultados obtenidos en dicha prueba, y nuevamente siguen la tendencia de las dos anteriores, existiendo diferencias significativas entre la harina tratada con microondas durante 6 min, que alcanza el mayor valor (8,13 g gel/g harina insoluble), y el resto de harinas, cuyos valores oscilan entre 6,76 y 7,01 g gel/g harina insoluble, entre las cuales, no existen diferencias significativas.

Al igual que en el WAI y el WSI, se observa como los tratamientos con microondas largos, es decir, de 6 min de duración, aumentan los parámetros analizados, mientras que los tratamientos cortos, de 1 y 2 min, apenas alteraron estas propiedades.

Esto se puede deber a que a temperaturas entorno a los 60-70°C los granos de almidón comienzan a hincharse, empezando un proceso de gelatinización. Esto se debe a la ruptura de los puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas amorfas, que permiten una absorción irreversible y progresiva del agua (Hernández-Medina, 2008). La harina tratada durante 6 min con microondas es la que se somete a un tiempo mayor de tratamiento hidrotérmico, por lo que se producirá la ruptura de más puentes de hidrógeno intermoleculares de las zonas amorfas, dando lugar a una mayor absorción de agua.

3.1.6. ACTIVIDAD EMULSIONANTE Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN (EA/ES)

La composición total de proteínas de una harina, así como otros componentes, como por ejemplo los carbohidratos, pueden influir en la propiedad emulsionante de la harina (Kaur, y Singh, 2005). La capacidad de la harina para formar emulsiones se vio afectada con el tratamiento con microondas, mostrando diferencias significativas entre todas las muestras de harina. Entre los valores obtenidos, destaca el de la harina tratada con microondas durante 6 min, ya que la capacidad de formar emulsiones es muy baja (5,42%) en comparación con el resto de harinas. La harina nativa es la que refleja una mayor capacidad (50,40%), seguida de la tratada con microondas durante 2 min (49,23%) y la tratada durante 1 min (43,09%).

Esta diferencia tan significativa de la harina tratada con microondas durante 6 min respecto al resto de harinas se puede deber a que en tratamientos con microondas largos existe una mayor probabilidad de que las proteínas sean desnaturalizadas, disminuyendo la capacidad de estabilizar las interfaces agua/aceite.

Las emulsiones están presentes en varios campos de la industria, como la alimentación, la cosmética, la farmacia, la industria de pinturas...etc. En alimentación podemos ver emulsiones en productos como la mayonesa, nata o cremas. Por ello, es interesante estudiar esta propiedad,

para evaluar si los tratamientos realizados mejoran la capacidad de formar emulsiones que tiene la harina, la cual puede ser empleada para la elaboración de otros productos (Muñoz, *et al.*, 2007). En este caso, se ha visto que las harinas que tienen mayor capacidad de formar emulsiones son la nativa y la tratada con microondas durante 1 min, por lo tanto, a menor tratamiento, mayor actividad emulsionante.

Para comprobar la estabilidad de dichas emulsiones se han tenido en cuenta los valores obtenidos en la EA, observándose que, a pesar de que la harina tratada durante 6 min es la que tiene menor actividad emulsionante (5,42%), presenta la emulsión más estable (7,23%). Por el contrario, la harina nativa y las tratadas durante 1 y 2 min presentan una estabilidad de emulsión reducida, viéndose muy afectada por el calentamiento al que se ha sometido. No se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos de la harina nativa (11,45%) y la tratada durante 1 min (12,88%); en cambio, sí que hay diferencias significativas con la harina tratada durante 2 min (17,26%).

La estabilidad de una emulsión es importante desde el punto de vista de la vida útil de un producto, ya que, si para la elaboración de un producto se emplea un componente cuya estabilidad de emulsión es baja (como en este caso la harina tratada durante 1 y 2 min o la harina nativa), es más fácil que la emulsión pueda romperse, poniendo fin a la vida útil del producto.

Habría que realizar más investigaciones respecto a la estabilidad de las emulsiones de la harina de tef blanco tratada con microondas para comprobar qué harina presenta buena actividad emulsionante y buena estabilidad de las emulsiones formadas, ya que si presenta buena actividad emulsionante pero mala estabilidad, no sería de interés como se ha dicho, siendo este el caso de las harinas analizadas.

3.1.7. ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD ESPUMANTE (FC/FS)

Esta prueba mide la capacidad que muestra una harina para formar espuma y la estabilidad de dicha espuma, y depende de la película interfacial formada por las proteínas que es capaz de mantener las burbujas de aire en suspensión y retrasar el tiempo de coalescencia (Du, *et al.*, 2014). Está relacionada con la textura blanda de los alimentos (Ashraf, 2012).

A partir de los resultados recogidos en la Tabla 5, podemos observar diferencias significativas entre los 4 tipos de harinas. La harina tratada con microondas durante 1 min presentó el valor más alto de esta propiedad funcional, con un 7,71 mL, seguida de la tratada durante 2 min con un valor de 5,54 mL, y la nativa con un 3,98 mL. La tratada con microondas durante 6 min es la que tiene menor capacidad de formar espumas, con un 2,19 mL.

La actividad espumante es una propiedad de interés en la industria ya que, en la actualidad, muchos productos se elaboran mediante espumas, aportándoles distintas texturas y un impacto sensorial atractivo. Estas son empleadas en productos como helados, merengues, pasteles, malvaviscos, mousses...etc. (Valdivia, 2014). Por ello, es interesante estudiar esta propiedad. En este caso, según los resultados obtenidos, se ha visto que la harina tratada con microondas durante 6 min tiene una baja actividad espumante, siendo de mayor interés el resto de harinas,

especialmente la tratada durante 1 min, ya que presenta una capacidad de formar espumas significativamente mayor que la nativa.

En el caso de la FS, se mostraron diferencias significativas entre algunos tipos de harina. Destaca el valor obtenido de la harina tratada durante 6 min, ya que la estabilidad de la espuma formada fue nula. La espuma con mayor estabilidad fue la de la harina tratada durante 2 min, con un 88,65%, seguida de la de la harina nativa (80,51%) y la harina tratada durante 1 min (62,93%). No se mostraron diferencias significativas entre la harina nativa y la tratada con microondas durante 2 min.

Al igual que en las emulsiones, la estabilidad de las espumas tiene un papel importante en la industria alimentaria, ya que, al elaborar un producto con objetivo de formar una textura aireada, será de interés mantener esa textura. Por lo tanto, relacionándolo con las muestras analizadas, la harina de menor interés sería la tratada durante 6 min, debido a que la actividad espumante y la estabilidad de su espuma fue nula.

Realizando un análisis global de los resultados obtenidos en las pruebas de las propiedades funcionales de la harina nativa y las tratadas con microondas durante 1, 2 y 6 min, se puede confirmar que el tratamiento con microondas largo sí ocasiona un efecto significativo en la harina de tef blanco, siendo en la mayoría de las pruebas un efecto negativo ya que disminuye la capacidad de la harina para retener agua, absorber agua y aceite, y formar emulsiones y espumas. Como se ha dicho, conviene realizar investigaciones futuras sobre el contenido de almidón dañado en la harina tratada 6 min, ya que, aunque el índice de absorción de agua, de solubilidad en agua y el poder de hinchamiento se vean aumentados al someterla a este tratamiento, los productos elaborados con esta harina pueden ser de baja calidad si el contenido de almidón dañado es alto.

También se encuentran efectos significativos en la harina tratada durante 2 min, viéndose en la mayoría de las propiedades funcionales (WHC, WAC, OAC, EA, ES, FC, FS) un aumento de las capacidades estudiadas, salvo en el WAI, WSI y SP, donde no se encuentran diferencias significativas respecto a la harina nativa.

Los resultados obtenidos con la harina tratada durante 1 min siguen la misma tendencia que los de la tratada 2 min, pero, en este caso, la harina tratada durante 1 min no encuentra diferencias significativas con la harina nativa en las pruebas WAC y EA (además del WAI, WSI y SP).

Esto implica que, aquellas propiedades funcionales de las harinas tratadas cuyos resultados no muestran diferencias significativas respecto a los obtenidos con la harina nativa, no serían de interés, ya que sometiéndolas al tratamiento microondas se obtiene el mismo resultado que sin someterlas. En cambio, sí es de interés seguir estudiando en un futuro las propiedades funcionales de las harinas de tef blanco tratadas con microondas que presentan diferencias significativas con la harina nativa para mejorar la calidad de los productos alimentarios relacionados con dichas pruebas.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES

Después del tratamiento con microondas, las harinas tratadas y la nativa se sometieron a un desengrasado para realizar posteriormente un fraccionamiento proteico según el método Osborne (1924). Se analizó la concentración proteica de cada fracción extraída de cada una de las harinas con el objetivo de conocer cómo se ve modificada la concentración al someterse al tratamiento con microondas durante 1, 2 y 6 min. Este procedimiento se realizó según el método espectrofotométrico de Bradford. A continuación, se analizarán y discutirán los valores obtenidos en el análisis de la determinación de la concentración proteica de las fracciones de cada una de las harinas tratadas y nativa.

Se calculó la concentración en mg de proteína/g de materia seca a partir de los datos obtenidos en la determinación. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la determinación de la concentración proteica (mg de proteína/g materia seca)

MUESTRA	ALBÚMINAS (mg/g)	GLOBULINAS (mg/g)	PROLAMINAS	GLUTELINAS
NATIVA	12,55 ^c	3,96 ^b	17,0 ^a	47,7 ^b
MW 1	12,51 ^c	3,97 ^b	17,1 ^a	46,8 ^b
MW 2	7,23 ^b	4,14 ^b	22,6 ^c	46,2 ^b
MW 6	4,22 ^a	2,72 ^a	19,9 ^b	39,8 ^a
ERROR EST.	0,25	0,07	0,1	0,6

Los valores con letra diferente indican diferencias significativas (p -valor $<0,05$) para cada fracción estudiada. Los datos mostrados son las medias obtenidas a partir del análisis por cuadruplicado realizado a cada muestra. Estos valores están expresados en mg de proteína/g de materia seca. ERROR EST.: Error estándar agrupado obtenido en el ANOVA.

3.2.1. ALBÚMINAS

En el caso de las albúminas, no se encuentran diferencias significativas entre las concentraciones medidas en la harina nativa y la tratada con microondas durante 1 min, obteniendo un valor de 12,55 y 12,51 mg de albúminas/g de harina. En cambio, sí que hay diferencias significativas con el resto de harinas. La harina tratada durante 6 min es la que tiene una menor concentración de esta proteína, con 4,22 mg albúmina/g harina; seguida de la harina tratada durante 2 min con 7,23 mg albúminas/g harina. Esta reducción se puede deber a que a medida que aumenta la duración del tratamiento con microondas, disminuye la solubilidad de las albúminas, y es por ello que la harina sometida al tratamiento más largo presenta una concentración menor.

3.2.2. GLOBULINAS

Las globulinas son la fracción de la que menor concentración se ha encontrado. Solo se encuentran diferencias significativas entre la harina tratada con microondas durante 6 min y todas las demás. La harina nativa y las tratadas durante 1 y 2 min tienen una concentración cercana a los 4 mg globulinas/g harina, en cambio, en el caso de la harina tratada 6 min el valor desciende hasta los 2,72 mg globulinas/g harina.

3.2.3. PROLAMINAS

En el caso de las prolaminas, no se han encontrado diferencias significativas entre la harina nativa y la tratada durante 1 min, con 17 mg prolamina/g harina en los dos casos. En cambio, sí

se encuentran diferencias significativas entre estas y las otras dos harinas tratadas. La harina tratada durante 2 min es la que tiene mayor concentración de prolaminas, alcanzando 22,6 mg prolaminas/g harina. La tratada con microondas durante 6 min tiene una concentración menor, con 19,89 mg prolaminas/g harina; pero, aun así, tiene un valor superior al obtenido en la harina nativa y la tratada durante 1 min.

3.2.4. GLUTELINAS

Entre los resultados de la harina nativa y las tratadas con microondas durante 1 min y 2 min no se han encontrado diferencias significativas, con una concentración entre 46,2 y 47,7 mg glutelinas/g harina. En cambio, sí que se encuentran diferencias significativas entre estas y la tratada con microondas durante 6 min, teniendo esta última un valor inferior, con 39,8 mg glutelinas/g harina.

Comparando fracciones, la fracción de las glutelinas es la que mayor concentración presenta, considerándose la fracción principal. La siguiente fracción con mayor concentración es la de las prolaminas, seguida por las albúminas. Por último, la fracción que presenta la menor concentración es la de las globulinas.

Además, en la Tabla 6 se puede observar como en las cuatro fracciones los valores de la harina tratada con microondas durante 6 min disminuyen de forma significativa, lo cual puede deberse a que a medida que aumenta el tratamiento microondas disminuye la solubilidad de las proteínas, como indica Yalcin, *et al.*, 2008. Este efecto ocurre porque con el tratamiento hidrotérmico al que es sometido la harina por la acción de las microondas, las proteínas sufren cambios en las propiedades físico-químicas, que dan lugar a modificaciones en la conformación, los cuales producen mayor dificultad para extraer las proteínas. Por el contrario, otros artículos indican que el tratamiento con microondas no varía la cantidad de proteínas (Campaña, *et al.*, 1993). Evidentemente la forma de aplicación y el tiempo de tratamiento afectan de forma determinante a este resultado. Los tratamientos cortos no cambian la solubilidad de ninguna de las especies proteicas analizadas mientras que los tratamientos intensos sí que ejercen un impacto significativo.

El contenido total de proteínas recuperado en las cuatro fracciones de harina nativa de tef fue de 81.21 mg/g harina desengrasada, lo que equivale a 8,12%. Este valor se comparó con el contenido total de proteína en la harina desengrasada medido por el método Dumas, que resultó ser de 9.7%. Esto nos permite concluir que el método utilizado para la extracción y medida del contenido de proteínas en las cuatro fracciones permitió cuantificar el 84% de las proteínas totales de la harina.

Los datos obtenidos de las concentraciones de las fracciones proteicas de la harina nativa y sometida a tratamiento microondas se pueden relacionar con los resultados de las propiedades funcionales, ya que, como se ha dicho, estas propiedades se ven influenciadas por el contenido proteico de la harina. Se observó que entre las concentraciones de la harina nativa y la harina sometida a tratamiento microondas de 1 min no hay diferencias significativas, lo cual vemos reflejado también en algunas de las pruebas, como WAC, WAI, WSI, SP o EA.

Por otra parte, la harina tratada durante 6 min es la que ve más afectada su concentración proteica, encontrándose reducida en las cuatro fracciones respecto al resto de harinas. Esta diferencia significativa también se refleja en prácticamente todas las propiedades funcionales.

Finalmente, se puede concluir que los tratamientos con microondas largos (6 min) afectan a la concentración de las fracciones de la harina de tef blanco, viéndose afectadas así las propiedades funcionales de dicha harina, en algunos casos positivamente (como en WAI, WSI y SP) y en otros negativamente, como en la actividad y estabilidad de las espumas. Esto implica que, según el uso que se quiera dar a la harina, convendrá realizarle un tratamiento de una duración u otra.

3.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DE HARINA DE TEF MEDIANTE SDS-PAGE

El método de fraccionamiento proteico permitió obtener los extractos de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas de la harina nativa y de cada harina tratada. Con dichos extractos se realizó un análisis SDS-PAGE para comprobar cómo es afectado el patrón de bandas proteicas de harina de tef blanco al tratarlo con microondas durante 1, 2 y 6 min.

Las muestras fueron analizadas en función de la fracción proteica. Para el análisis de dichas fracciones, se calcularon los μL necesarios para emplear $60 \mu\text{g}$ de muestra/pocillo a partir de las concentraciones obtenidas en mg/mL en la determinación de la concentración de las fracciones, ya que se observó que esta se veía modificada con el tratamiento. Partiendo del estudio realizado por Cantero (2018), para analizar las muestras se tomó de referencia la concentración del gel a un 12%. El análisis se realizó en condiciones reductoras, es decir, en presencia de 2 mercaptoetanol que rompe los puentes disulfuro proteicos.

La Figura 2 muestra la electroforesis de gel realizada con el extracto de albúminas obtenido en el fraccionamiento. Se pueden observar varias bandas de gran intensidad en el caso del extracto de la harina nativa, la tratada durante 1 y 2 min. Una de ellas entre 45-60 kDa; otra entre 35-45 kDa; otra entre 25-35 kDa; y, por último, entre 15-20 kDa.

La siguiente banda observada se encuentra entre 10-15 kDa, en las 4 muestras analizadas, pero en la del tratamiento durante 6 min de forma menos intensa. Por debajo de 10 kDa encontramos otra banda en las 4 muestras. Estos últimos, al tener un peso molecular por debajo de 10 kDa, se consideran péptidos; por encima de ese valor son oligopéptidos. También, se puede observar una banda de menor intensidad en 72 kDa en la harina nativa y las tratadas durante 1 y 2 min. Comparando

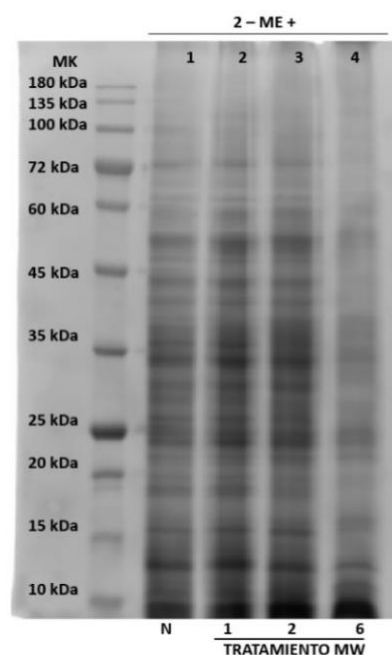


Figura 2. Electroforesis de gel al 12% en condiciones reductoras, extracto albúminas normalizado a $60 \mu\text{g}$ de albúmina/pocillo

entre la harina nativa y las tratadas, podemos observar que las albúminas más afectadas son las del tratamiento con mayor duración, es decir, el de 6 min. Este efecto se observó también en la concentración de las albúminas en la harina tratada durante 6 min (Apartado 3.2.1.).

En el trabajo realizado por Cantero, 2018, no se encontraron bandas en el caso de las albúminas en condiciones reductoras, ni en la harina nativa ni en la tratada con microondas. Shumoy et al., 2018, sí que mostró varias bandas para el grupo de albúminas entre 14.4-97.4 kDa, lo mismo que ocurre en el presente trabajo; aunque, en este caso, se encuentran bandas para las albúminas por debajo de los 10 kDa también. Además, Cantero (2018) muestra diferencias entre las bandas de la harina nativa y la harina tratada con microondas, lo mismo que ocurre en este caso entre la harina nativa y la sometida al tratamiento más largo (6 min).

La electroforesis de gel de las globulinas se encuentra en la Figura 3. En ella, se observa una banda entre 45-60 kDa en las 4 muestras, pero en menor intensidad en la harina nativa. Las harinas tratadas 1 y 2 min y la nativa presentan una banda entre 25-35 kDa.

Las cuatro muestras presentan bandas más intensas alrededor de los péptidos de 10 kDa, encontramos una banda intensa la harina nativa y las tratadas durante 1 y 2 min; y de menor intensidad en la tratada 6 min. Al igual que las albúminas, la presencia de globulinas se ve más afectada en tratamientos de larga duración tanto en pesos medios como en los oligopéptidos.

Cantero, 2018, presentó bandas entre 25-66.2 kDa, coincidiendo con los resultados obtenidos, pero en este trabajo también se encontraron bandas por debajo de 10 kDa en las cuatro muestras.

La Figura 4 presenta la electroforesis de gel realizada con los extractos de las prolaminas. Esta electroforesis inicialmente se realizó a un 12% como las anteriores, pero se observó que el patrón de bandas de mayor intensidad se encontraba en la zona de pesos moleculares más bajos a los 72 kDa, por lo que se decidió repetir dicha electroforesis esta vez con un gel del 15%, ya que este se centra más en esta parte, a pesar de que la distribución del MK sea muy similar.

En dicha electroforesis se encuentran bandas de baja intensidad entre 72-100 kDa y 60-72 kDa; y de alta intensidad entre 45-69 kDa y 35-45 kDa. También se observa una banda intensa alrededor de los 20 kDa en las cuatro muestras. La única diferencia que se observa entre unas muestras y otras es que la tratada con microondas 6 min presenta una banda entre 15-20 kDa que el resto no presenta.

En este caso, las prolaminas no muestran una reducción de su patrón de bandas con el tratamiento, en cambio, al evaluar la concentración de prolaminas en cada harina (apartado 3.2.3) se podía observar que la concentración de prolaminas en el tratamiento de 2 min

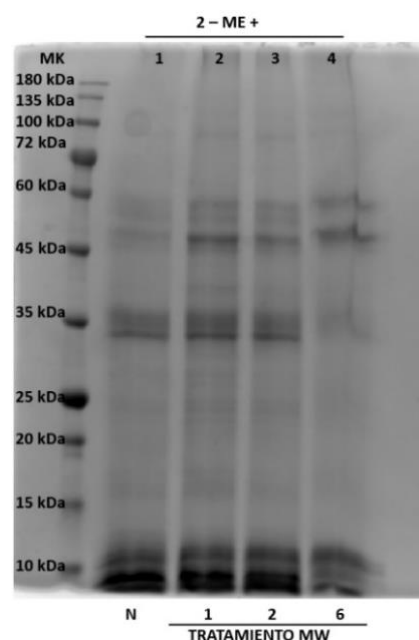


Figura 3. Electroforesis de gel al 12% en condiciones reductoras, extracto globulinas normalizado a 60 µg globulinas/pocillo

aumentaba y la tratada durante 6 min disminuía, en comparación con la concentración de prolaminas de la harina nativa y la tratada 1 min.

En el trabajo de Cantero, 2018, las bandas que presentaban mayor intensidad en condiciones reductoras eran las de la fracción de las prolaminas; en este caso, las de mayor intensidad las presentan las glutelinas.

Las bandas de prolaminas presentadas por Cantero, 2018, se situaban entre 18.4-25 kDa, lo mismo que para Shumoy *et al.*, 2018, y Adebowale *et al.*, 2011; al contrario que en este trabajo, donde se presentan bandas desde 10 kDa hasta 135 kDa. Aun así, en el presente trabajo se puede observar que las bandas de mayor intensidad se sitúan entre 15-25 kDa, al igual que en los trabajos comentados anteriormente.

Cantero, 2018, sí que presenta diferencias entre las bandas presentadas en la harina nativa respecto a la que se ha sometido a tratamiento con microondas; en cambio, en este trabajo no se observan diferencias significativas entre las bandas de la harina nativa y de las harinas tratadas.

La electroforesis de gel del extracto de las glutelinas se encuentra en la Figura 5. Esta imagen muestra bandas de baja intensidad en las cuatro muestras entre 60-72 kDa y 35-45 kDa; y bandas de alta intensidad entre 15-20 kDa, 10-15 kDa y 10 kDa en los cuatro casos. Por debajo de 10 kDa también se observa una tenue banda, la cual se consideran péptidos debido a su bajo peso molecular. En cambio, entre 20-25 kDa hay bandas de la misma intensidad en las tres primeras muestras (nativa, tratada 1 min y 2 min), y de menor intensidad en la tratada durante 6 min.

En la cuantificación de la concentración de las glutelinas se observaron diferencias significativas en la harina tratada durante 6 min respecto al resto de harinas; en este análisis, no hay diferencias entre unas harinas y otras, el patrón de bandas es el mismo. Esto quiere decir que el tratamiento con microondas durante 6 min sí que afecta a la concentración de glutelinas, pero no a su patrón de bandas.

Shumoy *et al.*, 2018, apenas obtuvo bandas en la fracción de las glutelinas; en cambio, Cantero, 2018, presentó bandas entre 20-35 kDa. En este trabajo, las bandas de mayor intensidad se

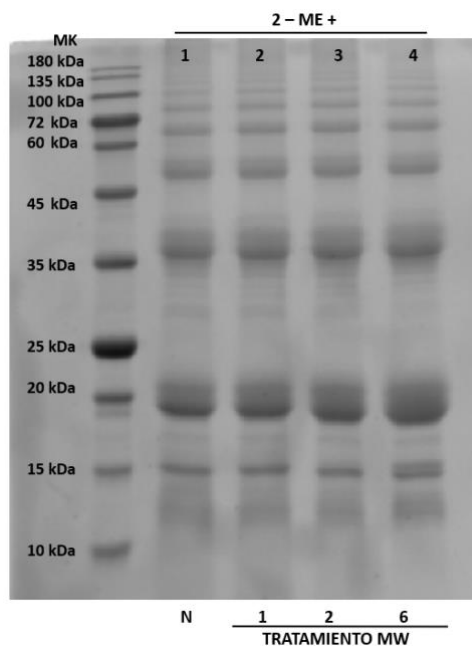


Figura 4. Electroforesis de gel al 15% en condiciones reductoras, extracto prolaminas normalizado a 60 µg de prolamina/pocillo

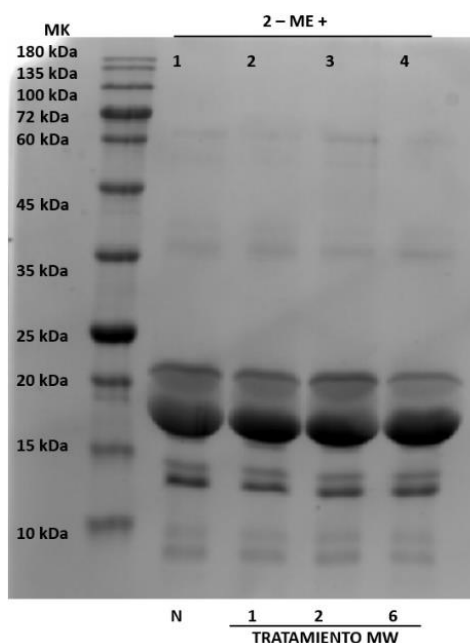


Figura 5. Electroforesis de gel al 15% en condiciones reductoras, extracto glutelinas normalizado a 60 µg glutelinas/pocillo

encuentran entre 10-25 kDa. Ambos trabajos coinciden en que la diferencia de bandas entre la harina nativa y las tratadas es nula.

Los distintos resultados presentados por los trabajos que han sido comparados se pueden deber a diferencias en el método de fraccionamiento o en las soluciones de extracción empleada, por ejemplo, Cantero, 2018, emplea una solución extractante para las prolaminas distinta a la empleada en el presente trabajo, lo cual puede haber influido en la extracción y ser el motivo por el que se vean más bandas en este trabajo. Es de interés seguir estudiando la puesta a punto del procedimiento de fraccionamiento proteico.

También, se puede deber a diferencias en los tiempos de tratamiento, ya que, por ejemplo, Cantero, 2018, somete a su harina a un tratamiento de 8 min, y en este trabajo el de mayor duración es de 6 min.

Finalmente, haciendo un análisis global, se observa que las albúminas y las globulinas en tratamientos de larga duración (6 min) ven afectadas su patrón de bandas a pesar de que la cantidad empleada de estas proteínas es la misma para las cuatro muestras; y en cambio, las prolaminas y las glutelinas no muestran cambios en su patrón de bandas cuando son tratadas con microondas. Esto se puede deber a que los tratamientos con microondas (especialmente el de 6 min de duración) modifiquen las propiedades físicas de las proteínas, en este caso, de albúminas y globulinas. Este cambio puede provocar una modificación de la conformación proteica hidrofílica que presentan estas proteínas (ya que se extraen con agua), pasando a ser hidrofóbicas, debido a la desnaturalización de la proteína por acción térmica, originando así dificultades para su extracción con agua.

4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha estudiado el impacto que tiene el tiempo de tratamiento con microondas durante 1, 2 y 6 min sobre las propiedades funcionales y las fracciones proteicas de la harina de tef blanco. Tras analizar y discutir los resultados obtenidos, se llega a estas conclusiones:

1. El tratamiento con microondas durante 1, 2 y 6 min sí ejerce un efecto significativo en las propiedades funcionales de la harina de tef blanco, especialmente el tratamiento de 6 min. Esto implica que, en función del uso final que se quiera dar a la harina, será de mayor interés emplear una duración u otra del tratamiento con microondas.
2. El método de fraccionamiento proteico utilizado ha resultado eficaz para para la extracción de las fracciones proteicas de harina de tef, ya que, como se ha indicado, se han podido analizar un 84% de total de proteínas que contiene la harina.
3. El tratamiento con microondas durante 1 min no ocasiona diferencias significativas en la concentración proteica de la harina de tef blanco. En cambio, en el caso de las prolaminas y las albúminas de la harina de tef tratada durante 2 min sí que se ven afectadas, el contenido de prolaminas aumenta y el de albúminas disminuye. Se confirmó que las fracciones de harina de tef blanco sometida a tratamiento microondas durante 6 min sí se ven afectadas, reduciendo su concentración.
4. El análisis mediante SDS-PAGE muestra que el tratamiento microondas de 6 min ocasiona una reducción o modificación del patrón de bandas de globulinas y albúminas, viéndose afectadas las proteínas más hidrofílicas. Por el contrario, el patrón de bandas de prolaminas y glutelinas no se ve afectado en tratamientos largos. En el caso de las harinas tratadas con microondas 1 y 2 min no se encuentran diferencias respecto a la harina nativa en ninguna de las fracciones estudiadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVa y al departamento de bioquímica de la facultad de ciencias por los equipos empleados.

A mis tutores, Javier Arias Vallejo y a Felicidad Ronda Balbás la oportunidad que me han brindado, así como su cercanía, paciencia y confianza. También agradecer todo el equipo de Smart Devices for NanoMedicine Group y ProcerealTech, especialmente a Laura Murillo, por acompañarme en este proceso.

A mis amigos del grado, por hacer esta etapa más amena y llenarla de innumerables risas; y a mis amigos de siempre, por darme su apoyo en todo momento.

Y por supuesto, a mi familia, por ayudarme y apoyarme siempre en cada decisión. Sin ellos no habría llegado hasta donde estoy ahora.

Gracias a todos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AACC Approved Methods of Analysis. (2009). 11th Ed. Method 44-19.01. *Moisture – Air- Oven Method, drying at 135°*. St. Paul, MN, USA: Cereal & Grains Association.
- Abebe, W., Collar, C., y Ronda, F. (2015). Impacto f variety type and particle size distribution on starch enzymatic hydrolysis and functional properties of tef flour. *Carbohydrate Polymers*, 115, 260-268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.080>.
- Adebowale, A. R. A., Emmambux, M. N., Beukes, M., y 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., y 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>
- Ashraf, S., Saeed, G., Saeed, S. A., y Ali, R. (2012). Impact of microwave treatment on the functionality of cereals and legumes. *International Journal of Agriculture & Biology*., 14(3),356-370.
https://www.researchgate.net/publication/237051496_Impact_of_Microwave_Treatment_on_the_Functionality_of_Cereals_and_Legumes
- Assefa, K., Cannarozzi, G., Girma, D., Kamies, R., Chanyalew, S., Plaza-Wüthrich, S., et al. (2015) Genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Frontiers in Plant Science*, 6, 177. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00177>
- Assefa, K., Yu, J.-K., Zeid, M., Belay, G., Tefera, H., Sorrells, M.E. (2011). Breeding tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) trotter]: conventional and molecular approaches. *Plant Breeding*, 130 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2010.01782.x>
- Base de Datos BEDCA. Recuperado el 29 de marzo de 2021, de <https://www.bedca.net/bdpub/index.php>
- Biesiekierski, J.R. (2017). What is gluten?. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, 78-81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Campaña, L. E., Sempé, M. E., y Filgueira, R. R. (1993). Physical, chemical and baking properties of wheat dried with microwave energy. *Cereal Chemistry*., 70(6), 760-762. https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1993/Documents/70_760.pdf
- Cantero Bahillo, E. (2019). *Caracterización proteica de harinas sin gluten de tef y arroz nativas y modificadas por tratamiento microondas y de ultrasonidos* (Trabajo de fin de grado). Valladolid: Universidad de Valladolid.

- Chaparro, A., Gil, G., Aristizábal, T. (2011). Efecto de la hidratación y la cocción en las propiedades físicas y funcionales de la harina de vitabosa (*Mucuna deeringiana*). *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 18(2), 133-143. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1673743>
- Du, S.-K., Jiang, H., Yu, X., y Jane, J.-L. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT – Food Science and Technology*, 55(1), 308-313. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.06.001
- Ekeru, D., Haile, W., Alemu, L., Bibiso, M. (2021). Response of Tef (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter) to Balanced Fertilizer in Wolaita Zone, Southern Ethiopia. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 10, 124-142. DOI: 10.4236/jacen.2021.101009
- Feillet, P. (2000). *Le grains de blé, conposition et utilisation*. París, Francia: INRA Paris
- 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. doi: 10.1007 / s13197-012-0745-5
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J.G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science Technology*, 28(3). <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000300031>
- Kaur, M., y Singh, N. (2005). Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpeas (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 91, 403-411. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.06.015
- Kinsella, J. E., Wang J. C. (1976). Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. *Journal of Food Science*, 41, 286-292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00602.x>
- Latham, M. C. (2002). Nutrición Humana en el mundo en desarrollo. *FAO: Alimentación y Nutrición*. 29 (26). <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0u.htm>
- López Pérez, A., y González Manzano, S. (2018). Determinación de la composición fenólica del grano de *Eragrostis Tef*. *FarmaJournal*, 3(1), 99-110. https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/137745/Determinacion_de_la_composicion_fenolica.pdf;jsessionid=E67446D3A5A04E1BCC1BAF58D9B6DDDD?sequence=1
- McCown, S., Brummer, M., Hayes S., Olson, G., Smith Jr., SR, Lawrence, L. (2012). Acceptability of Teff Hay by Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 327-331. <https://standleeforage.com/standlee-barn-bulletin/how-feeding-teff-grass-pellets-can-help-you-and-your-horse>
- Moscoso, J. F. y Quera P., R. (2015). Enfermedad Celiaca: Revisión. *Revista Médica Clínica Los Condes*, 26(5), 613-627. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.09.007>

- Muñoz, J., Alfaro, M. C. y Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*, 58(1), 64-73. <https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/10/10>
- Pérez Yágüez, F. (2020). *Estudio de la modificación física de harinas de teff mediante tratamientos hidrotérmicos y de ultrasonidos* (Trabajo de Fin de Máster). Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Ramos-Flores, A., González-Luna, R., García-González, S., Báez-González, J. y Bautista-Villareal, M. (2020). Evolución tecno-funcional de la harina de Teff (*Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 5, 590-593. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume5/5/9/116.pdf>
- Radeloff, M. A. y Beck, R. H. (2016). "Clean label" – Starches and their functional diversity. *Sugar Industry-Zuckerindustrie*, 141(4), 209-215. https://www.researchgate.net/publication/303754619_Clean_label_-_Starches_and_their_functional_diversity
- Riad, M. Efecto del almidón dañado en los productos horneados. *Milling and Grain*. Recuperado el 16 de junio de 2021, de <https://millingandgrain.co/entrada/efecto-del-almid-n-daado-en-los-productos-horneados-177/>
- Rodríguez, C. (2020). *Impacto del tratamiento de microondas sobre la composición química de los biopolímeros principales de las harinas sin gluten* (Trabajo de fin de máster). Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Ronda, F., Abebe, W., Pérez-Quirce, S. y Collar, C. (2015). Suitability of tef varieties in mixed wheat flour bread matrices: A physico-chemical and nutritional approach. *Journal of Cereal Science*, 64, 139-146. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.05.009
- Shumoy, H., Pattyn, S., y Raes, K. (2018). Tef protein: Solubility characterization, invitro digestibility and its suitability as a gluten free ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 697–703. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.11.053
- Shumoy, H., Raes, K. (2016). Antioxidant Potentials and Phenolic Composition of Tef Varieties: An Indigenous Ethiopian Cereal. *Cereal Chemistry*, 93, 465-470. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-10-15-0210-R>
- Traynham, T. L., Myers, D. J., Carriquiry, L.A., y Johnson, L.A. (2007). Evaluation of Water-Holding Capacity for Wheat-Soy Flour Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 151-155. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1018-0>
- Valdivia, M. A. (2014). Espuma en alimentos. *Revista digital universitaria (UNAM)*, 15(5). <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num5/art34/>
- Villanueva, M., Harasym, J., Muñoz, J. M., y Ronda, F. (2018). Microwave absorption capacity of rice flour. Impacto f the radiation on rice flour microstructure, termal and viscometric properties. *Journal Food Engineering*, 224, 156-164. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.12.030

- Yalcin, R., Sakiyan, O., Sumnu, G., Celik, S., y Koksel, H. (2008). Functional properties of microwave-treated wheat gluten. *European Food Research Technology*, 227, 1411-1417. https://www.researchgate.net/publication/225269882_Functional_properties_of_microwave-treated_wheat_gluten
- Yousf, N., Nazir, F., Salim, R., Ashan, H., y Sirwal, A. (2017). Water solubility index and water absorption index of extruded product from rice and carrot blend. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 2165-2168 <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue6/PartAD/6-6-326-909.pdf>
- 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>

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I (Equipos y material fungible)

7.1.1. EQUIPOS UTILIZADOS Y DISPONIBLES EN LOS LABORATORIOS:

1. Estufa de secado y calor convección forzada VELP Scientifica Binder GmbH
2. Balanzas:
 - a. COBOS AX-200 precision
 - b. FR3200 GRAM
 - c. COBOS CB COMPLET
3. Placa agitadora: MR Hei-Mix L. Heidolph
4. Desecador
5. Microondas:
 - a. R-342. Sharp.
 - b. CMG 30D S
6. Motor externo microondas: WX128 WORX
7. Vortex: VELP Scientifica. Heidolph
8. Mezcladora: Teddy Bear 5l. Varimixer.
9. Molino eléctrico: FIDIBUS 21 KOMO
10. Placa de inducción VATRA CRAFT
11. Centrífugas:
 - a. Tubos falcon: Sorvall ST16R. ThermoFisher
 - b. Eppendorf: miniSpin eppendorf
12. Agitadores:
 - a. Stuart orbital shaker SSL1
 - b. Agitador mecánico/Homogeneizador T25 ULTRA TURRAX IKA
13. Liofilizador: Virtis
14. Hervidor: Thermo Fisher Scientific
15. Máquina electroforesis: Vertical electrophoresis system. Hoefer miniVE
16. Espectrofotómetro Lambda 25 PERFIN ELMER
17. Proformador gel: Multiple Gel Caster. Amersham Biosciences.
18. Equipo de agua Elix: MiliPore
19. Frigorífico
20. Congelador -40° y -80°C.
21. Baño calefactor 70°C E1 Julaba
22. Baño termostático para eppendorf. Heidolph
23. Incubadora: ICP 260 memmert
24. Tamiz 250: CISA
25. Espectrofotómetro: Tensor 24 FTIR. Bruker
26. Placa calefactora y agitadora ARE VELP Scientifica
27. Etiquetadora P-touch 1000 Brother
28. Selladora PFS 300-400 PFS
29. pHmetro waterproof XS
30. Termómetro con sonda 108-2 TESTO
31. Gel Doc EZ Imager BIO RAD
32. miniVE Vertical Complete

33. Electrophoresis Power Supply – EPS 301 amersham pharmacia biotech
34. Agitador de balanceo en 3D DIGITAL SWING 3D
35. Vertical electrophoresis sistem Hoefer miniVE

7.1.2. EQUIPO UTILIZADO DEL LABORATORIO DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE LA UVa EN PALENCIA:

1. Analizador elemental LECO CNS928

7.1.3 EQUIPO UTILIZADO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA (FACULTAD DE CIENCIAS), VALLADOLID:

1. Centrífuga al vacío (speed-back), centrivac Heraeus

7.1.4. MATERIAL FUNGIBLE

1. Bolsas de poliamida y polipropileno (PA/PP): Cyrovac
2. Botes de polietileno
3. Cápsulas de metal
4. Espátulas metálicas
5. Gradillas para tubos
6. Guantes de nitrilo
7. Guantes de tela
8. Falcon para centrifugar sin faldón (tapón morado)
9. Tubos eppendorf 2 mL
10. Pipeta Pasteur
11. Pipetas automáticas:
 - a. 1:10 µL Gilson PIPETMAN
 - b. 2:20 µL Gilson PIPETMAN
 - c. 20:100 µL Gilson PIPETMAN
 - d. 20:200 µL Labnet autoclavable
 - e. 50:200 µL Gilson PIPETMAN
 - f. 100:1000 µL Labnet autoclavable
 - g. 200:1000 µL Gilson PIPETMAN
12. Puntas pipetas: D10, D200, D1000 Diamond, Gilson
13. Anaclin 125 mL
14. Tijeras
15. Vasos de precipitados
16. Probetas
17. Matraces
18. Cristales electroforesis: 10x10. Hoefer.
19. Cubetas 20 mL para pesar
20. Parafilm
21. Cubeta de cristal para espectrofotometría
22. Peine, cristales y formador para electroforesis
23. Gradillas para eppendorf 2 mL y para tubos Falcon 50 mL

7.2. ANEXO II (Reactivos)

REACTIVO	NOMBRE COMPLETO	SUMINISTRADOR	LOTE/REFERENCIA	PUREZA
TRIZMA BASE	Tris [hydroxymethyl] amino-methane	SIGMA	66H5711	99,9%
KCl	Cloruro de potasio	PanReac	0000407774	99%
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	SIGMA	SLBT9686	≥99%
HCl	Ácido clorhídrico	PanReac	0000414371	-
Hexano	-	labkem	-	95%
Propanol	-	PanReac	491061BT	99,5%
DTT	Dithiothreitol	Formedium	DTT010	99,55%
BSA	Albúmina suero bovino	SIGMA	SLBW1243	≥98%
Gliadina de trigo	-	Fluka	1177168 44805125	100%
Azul Brillante de Coomassie G-250	-	PanReac	7M011349	-
H₃PO₄	Ácido ortofosfórico	PanReac	0001927776	85%
SDS	Sodium dodecyl (lauryl) sulfato	Formedium	SDS0500	-
Ácido acético	Acetic acid glacial	Fisher Chemical	2034813	99%
Glicina	L-Glycine	Formedium	DOC0141	-
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamide	Thermo Scientific	188129	-
Metanol	Methanol	Thermo Scientific	2047536	99,9%
Acrilamida	Acryl/BIS 37.5.1	Life Science	19J1556190	40%
PSA	Ammonium persulfate	Fisher Chemical	1999846	99%
Tris base	Tris (hydroxymethyl)- aminomethane	Formedium	TRIS01	99,95%
2-ME	2-Mercaptoethanol	Alfa Aesar	10225425	98%