



ESTUDIO DEL PROCESADO TÉRMICO CON MICROONDAS DE HARINAS DE ARROZ PARA SU ESTABILIZACIÓN BETA-GLUCANÁSICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2014/15

Alumno: María del Carmen Melendre Frías

Tutor: Felicidad Ronda Balbás

Tutora externa: Sandra Pérez Quirce

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento térmico mediante microondas (MW) en la inactivación de enzimas β -glucanasas presentes en harinas de arroz y la influencia de su grado de hidratación. Se ensayaron distintos grados de humedad (13%, 16%, 19%, 25%) y 5 tiempos de tratamiento diferentes (40 s, 1, 2, 4, 8 min) a una potencia fija de 900 W con muestras de 50 g de harina de arroz de variedad índica y granulometría contante. La mayor reducción de la actividad β -glucanásica se produjo en harinas con un contenido de humedad más alto, llegándose a una inactivación total de las enzimas endógenas β -glucanasas en harinas con 19 % y 25% de humedad, tratadas con MW 8 minutos y 4 minutos, respectivamente. A partir de la constante cinética de inactivación enzimática se obtuvo un modelo de predicción de tipo exponencial del grado de inactivación β -glucanásica en función de la humedad de la harina de arroz. Finalmente, se estudió el efecto de la humedad y el tiempo de tratamiento en los parámetros de empastado observándose un comportamiento viscoso diferente al de las harinas nativas, especialmente en la harina de humedad más alta (25%). En general, la viscosidad de pico, la estabilidad o *breakdown* y la temperatura de *pasting* aumentaron en las harinas tratadas.

Palabras clave: Peso molecular, β -Glucano, Actividad β -Glucanásica, Harina de arroz, Viscosidad

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of heat treatment by microwave radiation on the inactivation of β -glucanase enzymes present in rice flour and the influence of hydration. Several levels of humidity (13%, 16%, 19% and 25%) and five different durations of the treatment (40 s, 1, 2, 4 and 8 min) were tested at 900 W with samples (50 g) of flour indica rice variety of constant particle size. The greatest reduction of β -glucanase activity occurred in the flour with the highest humidity level. A complete inactivation of the β -glucanase enzymes was observed in flour with 19% and 25% humidity, treated for 8 minutes and 4 minutes, respectively. An exponential prediction model of the degree of β -glucanase inactivation depending on the humidity of the flour was obtained based on the kinetic constant of enzyme inactivation. Finally, the effect of humidity and duration of the treatment was studied on pasting parameters. A different viscous behavior from the native flour was observed, especially in flour with 25% humidity. In general, the peak viscosity, the breakdown and the pasting temperature increased in the treated samples.

Keywords: Molecular weight, β -Glucan, β -Glucanase activity, Rice flour, Viscosity

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una fuente de alimento importante para la población mundial especialmente en Asia, con una producción que se estima en alrededor de 680 millones de toneladas, equivalente a la de trigo (Friedman, 2013).

Es un cereal vestido que suele procesarse eliminando la cáscara y el salvado para su cocción antes del consumo. La distribución de peso del arroz integral es la siguiente: pericarpio, 1-2%; aleurona, nucela y tegumento, 4-6%; germen, 1%; escudete, 2%; y endospermo, 90-91% (Figura 1) (Juliano, 1985). En el salvado y el germen se encuentran mayoritariamente enzimas endógenas (lipasas, amilasas, catalasas, lipoxigenasas, polifenol oxidasas, betaglucanasas, etc.) y en el endospermo, a partir del cual se obtienen las harinas, están presentes en menor proporción.

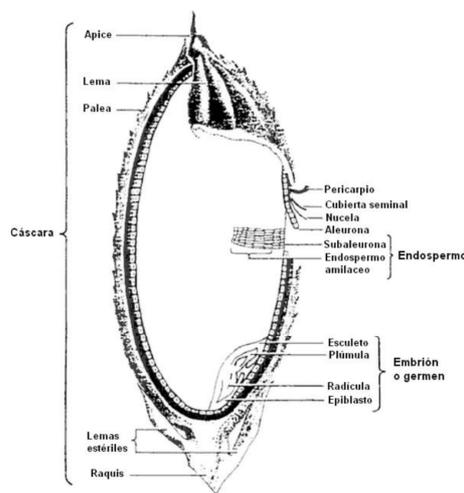


Figura 1. Estructura del grano de arroz (Juliano 1985)

El salvado de arroz es rico en materia grasa, en consecuencia, el arroz integral tiene una menor vida útil por los riesgos de enranciamiento, que hace necesaria su estabilización mediante la inactivación de enzimas por distintos métodos.

Existen muchas variedades de arroz, siendo las dos subespecies más importantes, la índica de grano largo y la japónica de grano medio o corto. La variedad índica tiene un mayor contenido de amilosa que la japónica y existen variedades céreas o waxy, llamadas glutinosas en el caso del arroz, que contienen un alto contenido en amilopectina. Durante el descascarillado y pulido del grano de arroz se obtienen como subproductos granos de arroz partidos, los cuales se destinan a la fabricación de harinas de arroz.

Los β -glucanos (BG) son polisacáridos no amiláceos formados por cadenas de unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos tipo beta. Son el componente mayoritario de las paredes de las células del endospermo y de la capa de aleurona, principalmente de cereales como la avena y la cebada, y en menor proporción del arroz y el trigo (Lazaridou y Biliaderis, 2007). Otras fuentes de BG incluyen algunos tipos de algas y varias especies de hongos (Tiwari y Cummins, 2009).

La estructura de los BG influye en su solubilidad. Los BG de cereales están formados por unidades de D-glucosa unidas en la posición (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) y son tanto solubles como insolubles (Figura 2); mientras que los BG extraídos de hongos y levaduras contienen ramificaciones (1 \rightarrow 6) y suelen ser más insolubles (Figura 3).

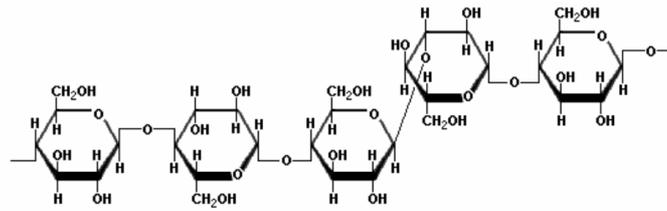


Figura 2. Estructura química de β -glucano de cereales con enlaces β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 4) (Havrlentová *et al.*, 2011)

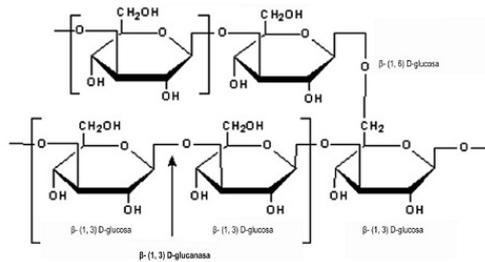


Figura 3. Estructura química de β -glucano de levadura con enlaces β -(1 \rightarrow 3) y ramificaciones en unidades β -(1 \rightarrow 6) (Volman *et al.*, 2008)

Los BG son un componente importante de la fibra alimenticia soluble que añadida a los alimentos tienen un efecto beneficioso en la salud. Se ha comprobado que BG formados por unidades de D-glucosa unidas en la posición (1 \rightarrow 3) estimulan el sistema inmunológico humano con efectos antitumorales y antimicrobianos (Havrlentová *et al.*, 2011). Asimismo, muchos autores han estudiado la relación del consumo de BG en la dieta con la reducción de los niveles de colesterol en sangre, principal factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias, y con la reducción de la hiperglucemia y la hiperinsulinemia. Estas propiedades saludables han contribuido al incremento del consumo de alimentos constituidos básicamente por cereales, como panes, muffins, pasta y cereales de desayuno (Tosh, 2013; Wood, 2007; Wolever *et al.*, 2010). Asimismo, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aprobó recientemente declaraciones saludables sobre BG de avena y cebada, según las cuales, la ingesta diaria de 3 g de BG de avena o cebada reduce los niveles de colesterol sanguíneo; y la ingesta diaria de 4 g de BG de avena o cebada por cada 30 g de carbohidratos en productos de panificación y pasta, disminuye las respuestas glicémicas postprandiales (EFSA, 2011).

El comportamiento fisiológico de las fibras dietéticas solubles, incluidos los BG, parece estar relacionado con su capacidad de aumentar la viscosidad del contenido intestinal, disminuyendo la absorción y reabsorción de lípidos, incluyendo el colesterol, ácidos biliares, y retardando el vaciado gástrico y la absorción intestinal de carbohidratos con el resultado de la reducción de la hiperglicemia postprandial y la secreción de insulina

(Dikeman y Fahey, 2006; Gunness y Gidley, 2010; Wood, 2007). Por otro lado, hay que tener en cuenta que estos efectos dependen de la viscosidad, la cual está controlada por el peso molecular (PM) de los BG y su concentración (Brummer *et al.*, 2012; Wolever *et al.*, 2010; Lazaridou y Biliaderis, 2007).

Se han realizado estudios sobre la elaboración de panes con BG. Ronda *et al.* (2013) estudiaron la incorporación de diferentes fibras solubles, incluyendo BG, en sustitución de la red de gluten, en panes elaborados con harina de arroz y su efecto en las características reológicas de las masas, en vista a desarrollar panes sin gluten enriquecidos con BG en las dosis reconocidas por la EFSA. Sin embargo, para que los productos de panificación enriquecidos con BG tengan las propiedades saludables descritas debe evitarse la degradación molecular de los BG con el fin de que conserven su elevado PM y retengan la capacidad de aumentar la viscosidad del contenido intestinal.

Aunque las harinas de arroz tienen un contenido en BG bastante pobre y contrariamente a lo esperado, se ha demostrado que durante la elaboración de panes de harina de arroz enriquecidos con BG, el PM se reduce de manera considerable debido a la acción de β -glucanasas, enzimas endógenas responsables de la despolimerización de los BG (Ronda *et al.*, 2015). El tiempo de amasado y de fermentación influye en la intensidad de la degradación, siendo recomendable tiempos lo más cortos posibles para evitar la reducción del PM del BG (Lazaridou *et al.*, 2014; Cleary *et al.*, 2007). Con el mismo objetivo, Rieder *et al.* (2015) centraron sus estudios en la elaboración de panes de cebada, reduciendo el tiempo de contacto entre la harina de cebada y el agua, y eliminando el tiempo de fermentación con la incorporación de masa madre de harina de trigo. Asimismo, la utilización de harinas de cebada de mayor granulometría o copos de cebada aumentó el PM de los BG en los panes al dificultarse el contacto entre el sustrato y la enzima.

El acortamiento de los tiempos de amasado y fermentación tiene un efecto negativo en la calidad de los productos de panificación y no parece resultar una opción lo suficientemente efectiva para evitar la degradación del BG. Como alternativa se han empezado a aplicar tratamientos térmicos en harinas para inactivar las β -glucanasas. Lazaridou *et al.* (2014) estudiaron el efecto en la actividad β -glucanásica de la aplicación de tratamientos térmicos mediante autoclave (121°C / 20 min) a harinas de cebada con diferentes grados de humedad y granulometría. Sometidas las harinas al mismo tratamiento térmico, se comprobó que la mayor inactivación de las enzimas β -glucanasas se producía con el incremento del grado de humedad de las harinas (13-14%) y tamaño medio de partícula (350 μ m), mejorando las cualidades nutricionales y fisiológicas de los productos de panificación elaborados con estas harinas y

enriquecidas con BG. Asimismo, se ha conseguido reducir la actividad β -glucanásica en harinas de cebada mediante la aplicación de tratamientos con calor húmedo y calor seco, comprobando que se reducía la degradación del BG durante el proceso de panificación (Rieder *et al.*, 2015).

Menos estudiados son los tratamientos térmicos mediante la energía microondas (MW) para inactivar enzimas en diversos sustratos. Las MW son ondas electromagnéticas entre 300–300,000 MHz que absorben moléculas polares e ionizables (agua y sales minerales, principalmente) y se orientan en la dirección del campo electromagnético que cambia varios millones de veces por segundo. La rotación de las moléculas genera calor debido a la fricción y choque entre ellas, dando lugar a un aumento rápido de temperatura, hecho que diferencia el calentamiento con MW de los tratamientos térmicos tradicionales. Sin embargo, la falta de uniformidad en la distribución de la temperatura es uno de los mayores inconvenientes de la aplicación de MW.

Irfan *et al.* (1998) investigaron el efecto de diferentes tratamientos con MW (2-4 minutos / 1200 W) sobre la reducción de la actividad de determinadas enzimas hidrolasas y peroxidasas endógenas de semillas de colza y lo compararon con el efecto de tratamientos térmicos en horno convencional de 55-85 minutos. Determinaron que las actividades enzimáticas se inactivan en tiempos más cortos en el caso del tratamiento con MW y que el efecto de la temperatura es más dominante que el efecto del tiempo de tratamiento en MW. Los tratamientos continuos con MW reducían mejor la actividad enzimática que los tratamientos discontinuos, debido probablemente a un incremento más rápido de la temperatura.

Varios autores informaron de resultados satisfactorios sobre la inactivación de enzimas lipasas y lipoxigenasas en salvado y germen de arroz y semillas de soja (Vetrimani *et al.*, 1992) y la estabilización de salvado de arroz hasta 4 semanas de almacenamiento mediante el tratamiento con MW a 2450 MHz durante 3 min (Jiaxun-Tao *et al.*, 1993). Chang y El-Dash (1998) comprobaron la efectividad del uso de MW para la inactivación de lipasas en arroz integral con el fin de mejorar la estabilidad durante almacenamientos largos, siendo los parámetros estudiados la potencia de MW, la humedad inicial (13,4, 14,6 y 17,3%) y el tiempo de tratamiento (20-140 s). Zhong *et al.*, 2013 estudiaron el efecto de la radiación MW en la inactivación de las enzimas lipasa y lipoxidasa en arroz integral con diferentes grados de molienda (0, 3, 6 y 10%) mejorando sus propiedades de conservación. Las condiciones del tratamiento con MW fueron: 539 y 384 W de potencia y ciclos de 30 segundos y 1 minuto de mezcla y enfriamiento, repetidos hasta tres veces.

No existen estudios científicos basados en el uso de la energía de MW para conseguir la inactivación de las enzimas β -glucanasas. Además, una vez inactivadas estas enzimas hay que considerar el efecto que los tratamiento térmicos, en este caso con MW, tienen en las propiedades térmicas y reológicas de las harinas en panificación. Se han encontrado trabajos que estudian el efecto de la energía de MW en las propiedades físico-químicas y reológicas de almidones de cereal, pero el efecto en harinas ha sido muy poco estudiado. Diraman (2010) evaluó el efecto del tratamiento térmico con MW sobre la inactivación de enzimas proteolíticas procedentes de insectos de la especie *Eurygaster* en harinas de trigo. Con tiempos de tratamiento de 120-180 segundos a 625 W y alcanzando temperaturas máximas de 75°C, se obtenía un efecto positivo en la inactivación térmica de las enzimas sin perder calidad reológica de las masas de panificación. Otros estudios anteriores determinaron que la reducción de la actividad de las α -amilasas en trigo y harina de trigo no afectaba a la capacidad de formación de la masa, sin embargo, se observó un aumento de la capacidad de absorción de las harinas y un aumento de la viscosidad de empastado (Edwards, 1964). En estudios más recientes, se ha observado un incremento de la temperatura de gelatinización y una reducción de la solubilidad en almidones de maíz y trigo (Lewandowicz *et al.*, 2000). Stevenson *et al.* (2005) informaron de un incremento de la temperatura de gelatinización y una reducción de la viscosidad en almidones de maíz. Anderson y Guraya (2006) y Luo *et al.* (2006), estudiaron en almidón de arroz con 20 % de humedad y almidón de maíz con 30% de humedad, respectivamente, el efecto de las MW en almidones con diferentes proporciones de amilosa/amilopectina. En almidones de arroz céreo se observó un incremento de la estabilidad del almidón después del calentamiento; el efecto contrario se observó en almidón de arroz no céreo. Asimismo, se observó un aumento de la temperatura de gelatinización y caída de viscosidad en almidones de maíz. Este comportamiento se explica por reagrupamientos de cadenas de amilopectina y formación de nuevas cristalizaciones durante el calentamiento con MW. Pinkrová *et al.* (2003) observaron que al aumentar la potencia de MW y temperatura en el tratamiento de granos enteros de arroz, la viscosidad máxima de la harina de arroz disminuyó. Roman *et al.* (2015) estudiaron el efecto de la radiación de MW de 400 W de potencia en harinas de maíz con 30 % de humedad a distintos tiempos de tratamiento (0,5, 1, 2 y 4 min). Las harinas sometidas a tratamiento suave (0,5 y 1 min) mostraron un incremento de la viscosidad de pico y del *breakdown*; mientras que en las harinas tratadas durante tiempos más largos se observó el efecto contrario.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento térmico mediante MW en la inactivación de enzimas β -glucanasas presentes en harinas de arroz y la influencia del grado de hidratación de estas harinas, con el fin último de utilizarlas para obtención de panes enriquecidos con BG cuyo peso molecular no se vea afectado por la actividad enzimática endógena.

Para la consecución de este objetivo, se han llevado a cabo las siguientes fases: i) Ensayos preliminares con el fin de establecer las condiciones de trabajo para el tratamiento con MW y conseguir una temperatura uniforme y humedad controlada de las harinas durante el mismo; ii) Tratamiento de las harinas a hidratación y tiempos controlados; iii) Puesta a punto del método y determinación de la actividad β -glucanásica de las harinas tratadas; iv) Estudio de las propiedades de empastado y v) Análisis de los resultados obtenidos y conclusiones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Se utilizó harina de arroz de la variedad índica (13,12% de humedad, 0,46% cenizas, 7,5% de proteína, 0,49% de grasa y 79,1% de almidón, distribución de tamaño de partícula: 6% > 150 μ m, 150 μ m > 63.2% > 100 μ m, 30.8% < 100 μ m) suministrada por Herba Ricemills S.L.U. (Tarragona, España). El BG procedente de avena es un estándar de alta pureza (> 70% db) ya utilizado en trabajos anteriores por Lazaridou *et al.* (2014) y suministrado gratuitamente por la Universidad de Tesalónica. El agua utilizada para la hidratación de las harinas se obtuvo por destilación a partir de la red sanitaria de la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias de Palencia.

3.2. Métodos

3.2.1. Experimentación previa

En esta fase del trabajo se realizaron ensayos preliminares con el fin de establecer las condiciones de trabajo para el tratamiento con MW y conseguir una temperatura uniforme y humedad controlada de las harinas durante el transcurso de los tratamientos. Para ello, se dieron los siguientes pasos: i) Aplicación de un tratamiento de MW sin paradas. Se desestimó debido a la falta de uniformidad en la distribución de la temperatura y la aparición de “puntos fríos y calientes” en las muestras; ii) Aplicación de un tratamiento de MW alternando ciclos de tratamiento MW y ciclos de

paradas, con el fin de homogeneizar la muestra y tomar temperaturas; iii) Aplicación de tratamiento MW con agitación continua mediante un horno MW adaptado para mejorar la uniformidad del calentamiento. En los anteriores ensayos se comprobó que durante el tratamiento con MW se producían importantes pérdidas de humedad. Finalmente, iv) Tratamiento MW con paradas alternas en bolsas herméticamente cerradas. Se retomó el método de ciclos alternativos de tratamiento y parada (ii) con una cantidad de muestra inferior.

3.2.1.1. Tratamiento MW sin paradas

Se trataron muestras de harina en horno microondas convencional (modelo Silvercrest SMW 800 A2, marca Kompernass, Bochum, Alemania) dispuestas en un recipiente redondo de pyrex con tapa del mismo material a distintos espesores y diferentes tiempos sin paradas (Tabla 1). Tras cada tratamiento se midió la temperatura con una sonda (modelo Testo 735, Lenzkirch, Alemania) en seis puntos calculándose la media.

Tabla 1. Tratamientos de MW sin paradas

Tto	Potencia (w)	Tiempo (s)	Espesor (mm)	Cantidad (g)	Rango de temperatura (°C)	Temperatura media (°C)
1	600	30	10,00	100	42-48°C	45
2	600	60	10,00	100	66-73°C	70
3	600	60	25	325	50-60°C	55

Se observó en las muestras una falta de uniformidad en la distribución de la temperatura, al constatar que los puntos de medida oscilaban en un amplio rango de temperatura (Tabla 1). Dinčov *et al.*, 2004 explicaron la distribución de la temperatura y la humedad dentro de la muestra a través de un mecanismo de transferencia de masa debido a la formación de un gradiente de presión generado por una rápida evaporación de agua. El comportamiento de los campos eléctrico y magnético dentro de un horno de MW y las interacciones con la muestra son muy complejas, por lo que las distribuciones de temperatura y de humedad en el interior de la muestra durante el calentamiento por MW se ven influidas por diversos factores como la geometría de la cavidad en la que el calentamiento se lleva a cabo, la geometría y el tamaño de la muestra, su composición y propiedades dieléctricas.

La consecuencia de un inadecuado control de la uniformidad del calentamiento es la aparición de “puntos fríos” en los que la inactivación enzimática es incompleta, y “puntos calientes”, donde pueden tener lugar degradaciones térmicas excesivas con el consiguiente detrimento en las propiedades funcionales, nutricionales y sensoriales de las harinas. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo tratamientos en ciclos discontinuos con paradas intermedias para homogeneizar la harina.

3.2.1.2. Tratamiento MW con paradas

La harina se sometió a ciclos de 30 segundos de calentamiento y paradas de 30 segundos para mezclar, medir temperatura e introducir de nuevo al microondas (Tabla 2). Se fijó la potencia en 600 W y la cantidad a tratar en 325 g de harina.

Tabla 2. Tratamientos de MW en ciclos de 30 segundos y 30 segundos de parada

Potencia (w)	Tiempo total de tratamiento (s)	Temperatura media (°C)
600	0	22,8
600	30	36
600	60	58
600	90	65
600	120	70
600	150	73

Las oscilaciones de temperatura ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) en los puntos de medida se redujeron considerablemente. No obstante, se decidió realizar una mezcla constante con el fin de mejorar la uniformidad del calentamiento.

3.2.1.3. Tratamiento térmico con agitación continua

Se utilizó un microondas (modelo GD566M *inverter*, marca Panasonic, China) de 1000W y 50Hz, facilitado por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Valladolid, al que se le había practicado previamente un orificio en la parte superior (por el que se comprobó que no había fuga de MW). Para conseguir el volteo de la harina durante el tratamiento y facilitar la homogeneización de la temperatura se procedió a realizar un montaje según se indica en la Figura 4.



Figura 4. Montaje estructural completo

Se realizaron tres tratamientos con 360 gramos de harina de 13% y 16% de humedad a 900W y 600W y tiempo total de tratamiento de 400 segundos, alternando ciclos de 20 segundos y paradas de 1 minuto, durante las cuales se midió la temperatura introduciendo una sonda (modelo Testo 735, Lenzkirch, Alemania) hasta estabilización de la medida. Se obtuvieron rampas de temperatura de calentamiento y enfriamiento (Figura 5).

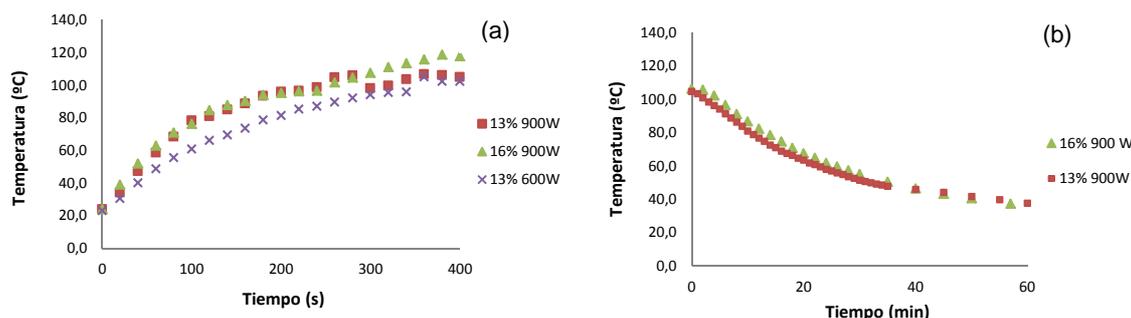


Figura 5. Rampa de calentamiento de harinas de 13 y 16% de humedad a 900 W y 600 W de potencia (a); rampa de enfriamiento de harinas de 13 y 16% de humedad a tratadas a 900 W (b)

En las rampas se observa que se alcanzaron mayores temperaturas en el tratamiento de la harina de mayor humedad (16%) y menores temperaturas en la harina tratada a menor potencia de MW (600 W), aunque a tiempos suficientemente altos ambas temperaturas coincidían. El descenso de temperatura se midió sin sacar la muestra del microondas a distintos tiempos durante la primera hora después de la aplicación del tratamiento. La curva de enfriamiento de la harina que alcanzó más temperatura durante el tratamiento se sitúa por encima de la curva de enfriamiento de la harina con menor humedad, igualándose prácticamente en los últimos 20 minutos. El ritmo de enfriamiento fue aproximadamente de 1,0-1,2 °C/min.

Antes y después de cada tratamiento se midió el contenido de humedad y se observó que disminuía entre 3-6% en función de la potencia del tratamiento y la humedad inicial. A mayor potencia de tratamiento y contenido de humedad inicial, mayor fue la temperatura final alcanzada y la pérdida de humedad.

Siendo los grados de humedad de las harinas a estudiar del 13, 16, 19 y 25%, se consideró inadmisibles una pérdida del contenido de humedad igual o mayor al 3% durante el tratamiento. Para evitar pérdidas de humedad se decidió realizar el tratamiento de MW introduciendo las muestras de harina en bolsas herméticamente cerradas.

3.2.1.4. Tratamiento MW con paradas alternas en bolsas herméticamente cerradas

Se siguió el mismo procedimiento, alternado ciclos de tratamiento de 20 segundos y paradas de 1 minuto. En bolsas de poliamida-polipropileno de 20 x 30 cm (NOP101, CRYOVAC) suministradas gratuitamente por el fabricante CRYOVAC, se envasaron muestras de 360 g, 125 g y 100 g de harina al 13% de humedad, se cerraron mediante termoselladora (modelo 300 MG, marca Audio Elektro, Holanda) y se introdujeron en el recipiente plástico giratorio, al objeto de mantener la muestra hermética al tiempo que agitada continuamente. Los resultados obtenidos se describen en la Figura 6. En todos

los casos la bolsa reventó (a los 40 s la bolsa de la muestra de 360 g y a los 80 s las de 100 y 125 g).

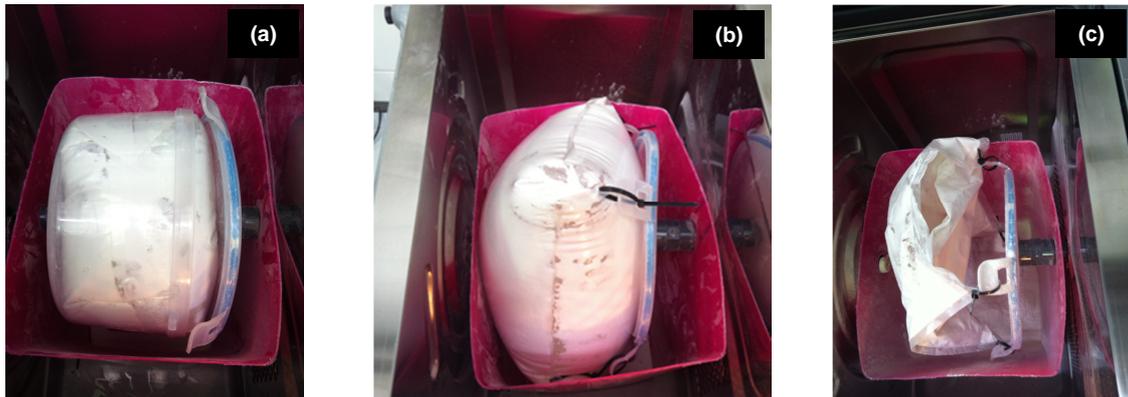


Figura 6. Dispositivos para agitación de la harina dentro de bolsas herméticas: (a) bolsa introducida en recipiente plástico sometido a giro; (b) bolsa sujeta con abrazaderas directamente al mecanismo de giro; (c) detalle de la calentamiento de la muestra.

Asimismo, el acoplamiento del recipiente al eje, fabricado en PVC, se deformó debido a las altas temperaturas alcanzadas impidiendo su conexión. En este punto hubo que decidir la cantidad máxima admisible para evitar que las bolsas se rompiesen en todos los tratamientos de las diferentes muestras, y las condiciones de trabajo para el tratamiento con MW. Por lo tanto, se redujo la cantidad a 50 g de harina ampliando el tratamiento máximo con MW hasta 480 segundos (8 minutos) a una potencia fija de 900 W. Se ensayó el tratamiento con la harina de mayor humedad (25%) colocando el microondas en su posición original y eliminando el montaje que se había dispuesto para el giro (Figura 7).



Figura 7. Tratamiento térmico con paradas en bolsas herméticamente cerradas

El procedimiento consistió en ciclos de 30 segundos de tratamiento y paradas de 1 minuto, agitando manualmente la bolsa antes de volverla a introducir. En este ensayo se comprobó la resistencia de la bolsa al hinchamiento y la distribución uniforme de temperatura debido a la escasa cantidad de muestra y su disposición en una fina capa dentro de la bolsa.

Tras la experimentación previa se definieron las condiciones de trabajo del tratamiento con MW en microondas convencional a una potencia constante de 900 W para conseguir una temperatura uniforme y humedad controlada de muestras de 50 g de harina de arroz en bolsas herméticamente cerradas a diferentes grados de humedad y tiempos de tratamiento.

3.2.2. Procedimiento experimental

3.2.2.1. *Hidratación de la harina*

Se analizó el contenido inicial de la harina de arroz mediante desecación en estufa de ventilación forzada (serie FED 115, marca WTB Binder, Tuttlingen Alemania) siguiendo el método método ACC 49.19, y se calculó el agua necesario para ajustar el contenido de humedad hasta el $13\pm 0,3\%$, $16\pm 0,3\%$, $19\pm 0,3\%$ y $25\pm 0,3\%$. La humedad deseada se consiguió por pulverización directa del agua sobre la harina mientras se agitaba en una batidora (modelo 5KPM50, marca KitchenAid, Michigan, Estados Unidos). Las harinas hidratadas resultantes se envasaron en bolsas de polietileno-polipropileno extrayendo manualmente el aire y se sellaron herméticamente. Después, se mantuvieron durante 24 horas a temperatura ambiente para equilibrar la humedad antes de su uso.

3.2.2.2. *Inactivación enzimática*

Se ensayaron por duplicado distintos grados de humedad (13%, 16%, 19%, 25%) y 5 tiempos de tratamiento diferentes a una potencia fija de 900 W con muestras de 50 g de harina de arroz, siendo para 13%, 16%, 19% de humedad, 1, 2, 4, 8 min; y para 25%, 40 s y 1, 2, 4 min. En total se diseñó un plan con 16 condiciones experimentales diferentes y el control.

Para realizar cada experimento se procedió de la siguiente manera: se pesó 50 g de harina en una bolsa de poliamida-polipropileno de 20 x 30 cm (NOP101, CRYOVAC) y se termoselló para asegurar una total hermeticidad. Se colocó la bolsa en el centro del plato giratorio del MW y se programó 20 s a 900 W. Tras este primer ciclo, se sacó la bolsa del MW y se agitó manualmente, siguiendo un procedimiento estandarizado. Transcurrido 1 min de reposo se volvió a someter la muestra a un nuevo ciclo. Este procedimiento se repitió tantas veces como ciclos de 20 s de tratamiento y 1 min de parada, fueron necesarios para alcanzar un tiempo acumulado de tratamientos de 40 s, 1, 2, 4 y 8 min.

Se determinó el contenido de humedad de la harina siguiendo el método ACC 49.19, antes y después del tratamiento en MW, con el fin de comprobar que la pérdida de humedad no superaba el 1%.

3.2.2.3. Medida de las temperaturas de calentamiento de las harinas durante el tratamiento con MW y durante el enfriamiento

Se midió la temperatura de calentamiento durante el tratamiento en microondas de 50 g de muestra de harinas al 13% y 25 % de humedad. Las medidas se realizaron inmediatamente después de cada ciclo de 20 segundos con un termómetro de infrarrojos (modelo Testo 826-T2, Lenzkirch, Alemania) (Figura 8), obteniéndose dos curvas. Sin sacar las muestras de harina del microondas, se midió el descenso de temperatura a distintos tiempos durante la primera hora después de la aplicación del tratamiento. Debido a la baja fiabilidad de los termómetros de infrarrojos, previamente se realizó una verificación del termómetro empleando una sonda de contacto (modelo Testo 735, Lenzkirch, Alemania) en diferentes rangos de trabajo entre 25 y 100°C. Las lecturas se realizaron tres veces para cada intervalo de temperatura y en distintos puntos: sobre el exterior de la bolsa y directamente en contacto con la harina. En ambos casos, la desviación máxima registrada del termómetro de infrarrojos fue inferior a $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con respecto a la lectura de la sonda de contacto.



Figura 8. Medición de temperatura

3.2.2.4. Determinación de la actividad β -glucanásica en harina de arroz

Las enzimas β -glucanasas presentes en un extracto de la harina de arroz actúan rompiendo los enlaces de una solución de BG reduciendo su peso molecular, y por consiguiente, la viscosidad de la mezcla. El método para determinar la actividad β -glucanásica de la harina de arroz fue adaptado del utilizado por Lazaridou *et al.* (2014) y consistió en la estimación del ritmo de descenso con el tiempo de la viscosidad

específica de una disolución patrón de BG de concentración 0,1% p/v, debido a la presencia de una determinada cantidad de harina de arroz.

La viscosidad específica es la diferencia entre la viscosidad dinámica de la mezcla de solución de BG y extracto de harina de arroz (control y tratada) y la de agua destilada, dividida por la viscosidad dinámica del agua destilada, medidas a la misma temperatura. Esta variable es adimensional y se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$\mu_{sp} = \frac{\mu - \mu_0}{\mu_0}$$

Siendo μ , la viscosidad dinámica de la mezcla de solución de BG y extracto de harina de arroz, y μ_0 , la viscosidad dinámica del agua destilada, en cSt.

La viscosidad dinámica se estableció con un viscosímetro capilar de vidrio modelo Ubbelohde (UBBEL04NC, K 0,01, rango 2-10 cSt, marca Paragon Scientific Ltd, Wirral, Reino Unido) (Figura 9a) a partir del tiempo requerido para que el líquido, una vez termostatado a $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$, caiga entre las dos marcas que el viscosímetro tiene practicadas para la medida. La viscosidad específica puede también obtenerse a partir de la expresión:

$$\mu_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Siendo t , el tiempo de recorrido de la mezcla de solución de BG y extracto de harina de arroz y t_0 , el tiempo de recorrido del agua destilada.

El extracto de harina de arroz, añadido a la disolución del patrón de BG, se obtuvo a partir de la disolución acuosa de 2 g de materia seca de harina y agua destilada en una proporción de 1:10 mediante agitación a 25°C durante 30 minutos, centrifugación a 2500g durante 20 minutos y filtración del sobrenadante. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 6 ml y se adicionó a 36 ml de solución de BG (0,1% p/v). Previamente, esta solución se preparó a partir de 0,5 g de BG en agua destilada con agitación en caliente hasta total disolución. Después se filtró y enrasó hasta 500 ml. Esta mezcla se transfirió al viscosímetro capilar de vidrio, el cual se introdujo en un baño termostático para fijar la temperatura a $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Figura 9b). Se midió la viscosidad específica durante la primera hora a razón de una medida cada 5 minutos y se ajustó a un modelo de regresión de tipo lineal, en el cual, la pendiente de la recta representó la actividad β -glucanásica expresada como el descenso de la viscosidad específica por hora de una solución de BG (0,1% p/v) a la que se adicionó un extracto de enzimas β -glucanasas de harina de arroz. Entre cada uno de los ensayos, se mantuvo el viscosímetro al menos durante 24 horas en una solución de ácido crómico para asegurar la completa eliminación del BG.



Figura 9a. Viscosímetro capilar



Figura 9b. Equipamiento: baño, viscosímetro y cronómetro

3.2.2.5. Estudio de las propiedades de empastado de las harinas tratadas en un ciclo de calentamiento-enfriamiento.

Las propiedades de empastado de las harinas tratadas se estudiaron utilizando el equipo de RVA-4 (Rapid Visco Analyzer) de Newport Scientific (Warriewood, Australia) controlado por el software Thermocline v 2.2 de la misma casa comercial. Las mediciones se realizaron de acuerdo al método AACC 76.21.01.

Se registraron tres perfiles de viscosidad de cada muestra preparada a partir de suspensiones de harinas y agua (3 g de MS de harina y 25 ml de agua), y sometida a “empastado” que consistió en un ciclo de calentamiento y enfriamiento. Tras mantener las muestras durante 1 min en equilibrio a 50°C, se calentaron de 50 a 95 °C a un ritmo de 12,16 °C/min, y se mantuvieron durante 3,30 min a 95 °C. La fase de enfriamiento se llevó a cabo desde 95 a 50 °C a un ritmo de 11,8 °C/min y se mantuvo durante 2 min a 50 °C. Durante el proceso se registraron los siguientes parámetros: la temperatura a la que los gránulos de almidón comienzan a hincharse y gelatinizar debido a la absorción de agua (temperatura de *pasting*); la viscosidad del pico o viscosidad máxima alcanzada por la pasta (*peak viscosity*); el tiempo al cual se alcanza la viscosidad máxima (*peak time*); la viscosidad mínima o de caída (*trough viscosity*), que es la viscosidad registrada en la etapa final cuando la temperatura es de 95 °C; la viscosidad final a 50 °C; la estabilidad o *breakdown* que es la diferencia entre el pico de viscosidad y la viscosidad de caída; y la retrogradación o *setback*, diferencia entre la viscosidad final y la viscosidad de caída.

3.2.2.6. Análisis estadístico

Con el programa STATISTICA (Tulsa, OK, EEUU) v.6, se realizó el análisis de varianzas de los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades de empastado de las harinas. La prueba LSD (Least Significant Difference) se utilizó para evaluar las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras. Para el cálculo de los valores de

la constante cinética de inactivación enzimática (K) en función de la humedad de las harinas, se realizó una regresión no lineal con el programa Statgraphics Centurion v.6 (Bitstream, Cambridge, MN, USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Medida de las temperaturas de calentamiento de las harinas durante el tratamiento con MW y durante el enfriamiento posterior

Se midió la temperatura de calentamiento durante el tratamiento en microondas de 50 g de muestra de harinas al 13% y 25 % de humedad, así como las temperaturas de enfriamiento posterior. En las rampas de la temperatura registradas (Figura 10) se observa que se alcanzaron mayores temperaturas en el tratamiento de la harina de mayor humedad. A los 20 y 40 segundos la harina del 25% alcanzó unas temperaturas de 72,0°C y 83,4°C, respectivamente, mientras que la del 13% solo llegó a 58,7 °C y 75,8°C, acortándose progresivamente las diferencias a partir de los 2 min, hasta una determinada temperatura (95-100°C). Esta temperatura se mantuvo prácticamente constante a partir del minuto 3, debido a la conservación de la humedad de la harina gracias a la hermeticidad de la bolsa. La curva de enfriamiento de la harina que alcanzó más temperatura durante el tratamiento se sitúa por encima de la curva de enfriamiento de la harina con menor humedad, igualándose prácticamente en los últimos 40 minutos. El ritmo de enfriamiento fue aproximadamente de 3,5-5,0 °C/min.

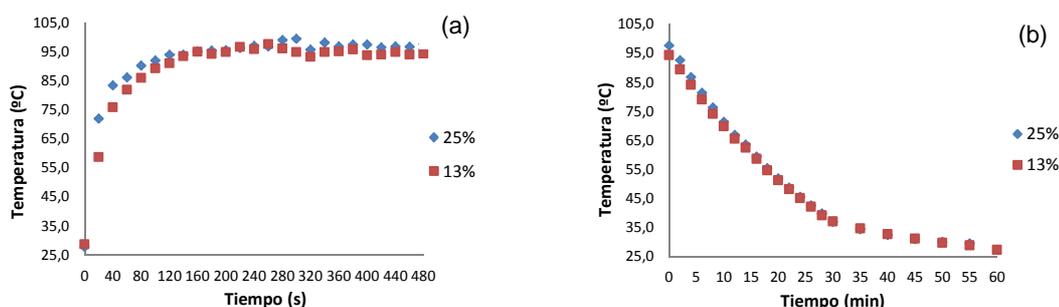


Figura 10. Rampa de calentamiento de harinas de 13 y 25% de humedad (a); rampa de enfriamiento de harinas de 13 y 25% de humedad (b)

4.2. Actividad β -glucanásica de las harinas de arroz tratadas térmicamente mediante MW

La actividad β -glucanásica de las harinas de arroz se estimó midiendo el ritmo de descenso de la viscosidad específica de una mezcla de solución de BG y extracto de harina de arroz a temperatura constante $20\pm 0,1^\circ\text{C}$. La Figura 11 muestra la evolución con el tiempo de la viscosidad específica de estas mezclas para las muestras de

harina de diferente humedad y diferentes tiempos de tratamiento por MW. En las harinas de arroz no tratadas con MW se observó una caída muy pronunciada de los valores de viscosidad debido a la actividad de enzimas β -glucanasas endógenas de las harinas, responsables de la degradación de BG. Sin embargo, en las harinas de arroz tratadas con MW se redujo la actividad β -glucanásica, siendo mayor el descenso a medida que aumentó el tiempo de tratamiento. Asimismo, se comprobó que se producía una mayor reducción de la actividad β -glucanásica en harinas con un contenido de humedad más alto, llegándose a una inactivación total de las enzimas endógenas β -glucanasas en harinas con 19 % y 25% de humedad y tratadas con MW 8 minutos y 4 minutos, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Actividades β -glucanásicas resultantes de someter a distintos tiempos de tratamiento con MW (40 s, 1, 2, 4 y 8 min) muestras de harinas de arroz con diferentes grados de humedad (13, 16, 19 y 25%)

Humedad (%)	Tiempo de tratamiento (min)	Actividad β -glucanásica ^{a b}	Humedad final (%) ^c
13	0	0,1088 (\pm 0,0054) h	13,00 (\pm 0,30)
13	1	0,1027 (\pm 0,0002) h	13,02 (\pm 0,10)
13	2	0,0576 (\pm 0,0013) f	13,10 (\pm 0,01)
13	4	0,0339 (\pm 0,0012) d	12,57 (\pm 0,05)
13	8	0,0139 (\pm 0,0002) b	12,83 (\pm 0,06)
16	0	0,1088 (\pm 0,0054) h	16,00 (\pm 0,30)
16	1	0,0760 (\pm 0,0014) g	15,93 (\pm 0,13)
16	2	0,0490 (\pm 0,0110) ef	15,42 (\pm 0,01)
16	4	0,0237 (\pm 0,0095) c	15,44 (\pm 0,01)
16	8	0,0101 (\pm 0,0001) ab	15,10 (\pm 0,00)
19	0	0,1088 (\pm 0,0054) h	19,00 (\pm 0,30)
19	1	0,0440 (\pm 0,0040) de	18,61 (\pm 0,15)
19	2	0,0110 (\pm 0,0002) b	17,81 (\pm 0,14)
19	4	0,0036 (\pm 0,0003) ab	18,15 (\pm 0,01)
19	8	0,0001 (\pm 0,0001) a	17,66 (\pm 0,13)
25	0	0,1088 (\pm 0,0054) h	25,00 (\pm 0,30)
25	0,67	0,0123 (\pm 0,0017) b	24,44 (\pm 0,00)
25	1	0,0089 (\pm 0,0004) ab	24,20 (\pm 0,01)
25	2	0,0051 (\pm 0,0005) ab	24,21 (\pm 0,09)
25	4	0,0002 (\pm 0,0000) a	23,87 (\pm 0,10)

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

^a Descenso de la viscosidad específica por hora de una solución de β -glucano (0,1% p/v) a la que se ha adicionado un extracto de harina de arroz.

^b Los valores son medias (\pm desviación estándar) de duplicados.

^c Contenido de humedad medida después del tratamiento con MW.

Con el aumento del contenido de humedad y del tiempo de tratamiento se alcanzaron temperaturas más altas, tal como se puede observar en la rampa de calentamiento (Figura 10), y por tanto, se produjo mayor destrucción enzimática. Lazaridou *et al.* (2014) también comprobó que la mayor inactivación de las enzimas β -glucanasas, aplicando tratamientos térmicos mediante autoclave, se producía con el incremento del

grado de humedad en harinas de cebada. También se ha comprobado que ligeros incrementos de humedad en sistemas acuosos de humedad baja como las harinas, tienen un importante efecto en la reducción de la temperatura de desnaturalización de las proteínas (Arntfield, Ismond y Murray, 1990). Este doble efecto del aumento de humedad sobre la temperatura (aumento de la temperatura de las harinas durante el tratamiento por MW y reducción de la temperatura de desnaturalización de las β -glucanasas) favorece la inactivación enzimática a tiempos más cortos de tratamiento. Las actividades β -glucanásicas de muestras de harinas de arroz con diferentes grados de humedad (13, 16, 19 y 25%) sometidas a distintos tiempos de tratamiento con MW (40 s, 1, 2, 3, 4 y 8 min), se calcularon a partir de la pendiente de las rectas obtenidas por regresión lineal como se muestra en la Figura 11. La disminución de las pendientes de las rectas a medida que se incrementaba el tiempo de microondas indica la inactivación enzimática de las β -glucanasas.

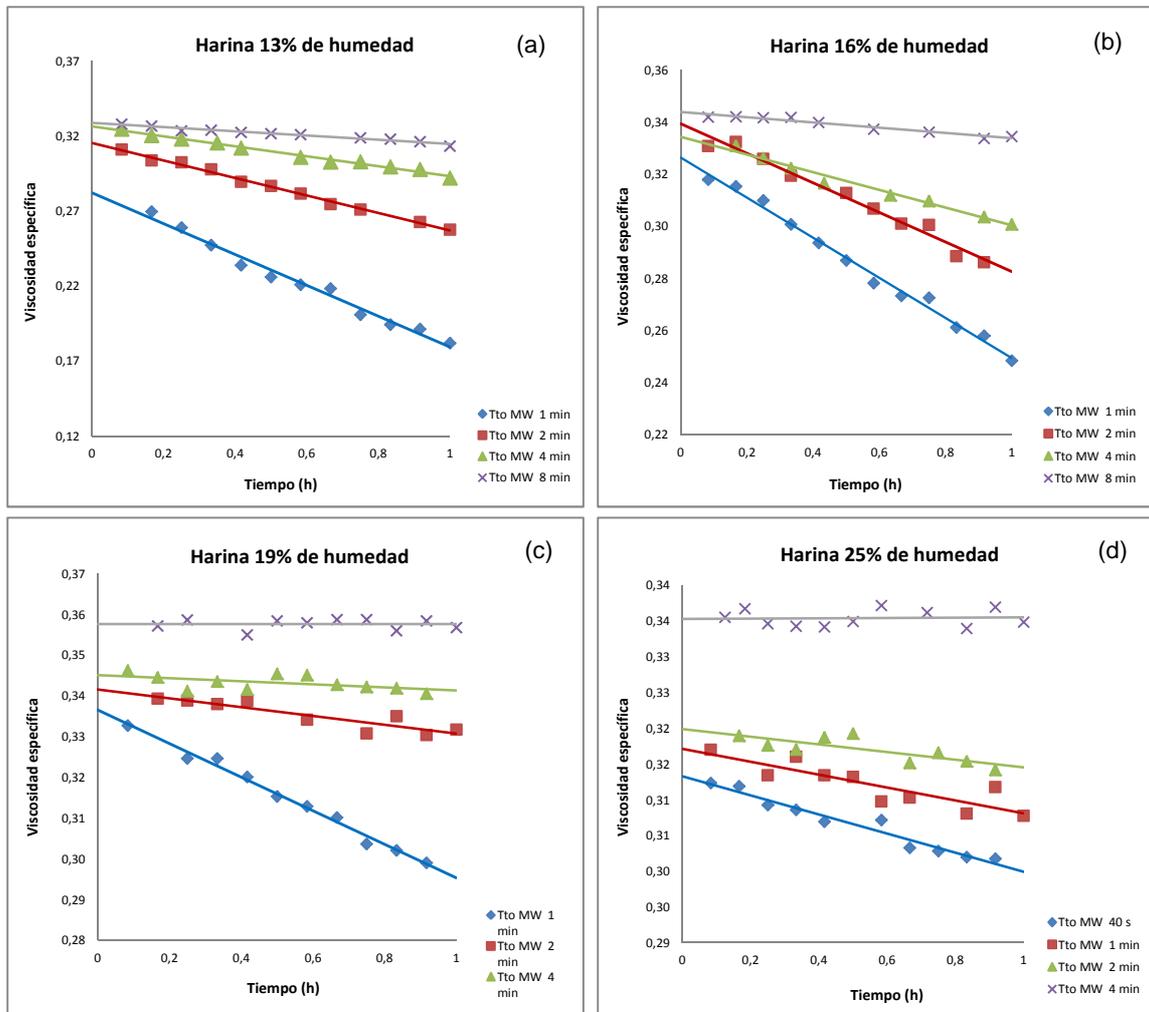


Figura 11. Representación gráfica de la dependencia de la viscosidad específica de soluciones de BG (0,1% p/v) a las que se adicionó extractos de enzimas β -glucanasas de harina de arroz. La viscosidad específica se midió a $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Las actividades β -glucanásicas de muestras de harinas de arroz al 13% (a), 16% (b), 19% (c) y 25% (d) sometidas a distintos tiempos de tratamiento con MW (40 s, 1, 2, 3, 4 y 8 min), se calcularon a partir de la pendiente de las rectas obtenidas por regresión lineal.

La Figura 12 muestra la evolución de la actividad β -glucanásica con el tiempo de tratamiento de MW. En ella puede comprobarse que se consiguió una destrucción enzimática total en harinas del 19 y 25% de humedad, tratadas con MW 8 min y 4 min, respectivamente, lográndose en el último caso reducir a la mitad el tiempo de tratamiento (4 min) al incrementar un 6% la humedad de la harina.

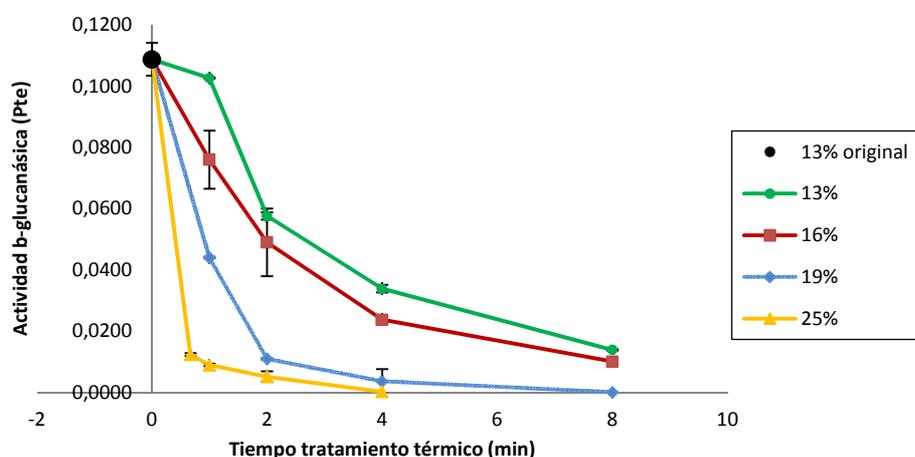


Figura 12. Representación de las actividades β -glucanásicas resultantes de someter a distintos tiempos de tratamiento con MW (40 s, 1, 2, 3, 4 y 8 min) muestras de harinas de arroz con diferentes grados de humedad (13, 16, 19 y 25%)

4.3. Predicción del grado de inactivación β -glucanásica en función de la humedad de las harinas

Las curvas de la gráfica de la Figura 12 se ajustaron a una ecuación exponencial:

$A = A_0 \cdot \exp(-K \cdot t)$; donde A es la actividad β -glucanásica dependiente del tiempo (t); A_0 es la ordenada en el origen o actividad inicial de las harinas sin tratar ($t=0$); y K (min^{-1}) es la constante cinética de inactivación enzimática que representa la actividad enzimática que se reduce por unidad de tiempo. Para el cálculo de los valores de K (Tabla 4) en función de la humedad de las harinas, se realizó un ajuste de regresión no lineal.

Tabla 4. Cálculo de la contante cinética (K) en función de la humedad de las harinas de arroz tratadas

Humedad	13% ^a	16%	19%	25%
A_0	0,108 ($\pm 0,003$)	0,108 ($\pm 0,003$)	0,109 ($\pm 0,003$)	0,108 ($\pm 0,004$)
K (min^{-1})	0,291 ($\pm 0,018$)	0,375 ($\pm 0,022$)	0,981 ($\pm 0,066$)	3,010 ($\pm 0,330$)
R^2	99,62	99,54	99,63	99,53

^a Se elimina el primer valor de la serie de actividades β -glucanásicas (1 min) de las harinas tratadas con el 13% de humedad.

Como puede verse en la Tabla 4 los valores de A_0 de todos los ajustes, independientemente de la humedad de la harina, fueron iguales a 0.108 ± 0.003 , que coincide con el valor experimental de la actividad β -glucanásica de la harina original.

Ello es debido a la buena calidad de los ajustes obtenidos de los puntos experimentales al modelo exponencial.

A partir de los valores obtenidos en la Tabla 4, se modelizó el efecto de la humedad en la constante cinética de inactivación enzimática mediante la ecuación de regresión de tipo exponencial: $y = 0,018e^{0,2046x}$; tal como se observa en la Figura 13, en el rango de humedades del estudio (13-25%). También, se probaron otros modelos de ajuste, obteniéndose peores valores del coeficiente de correlación. Esta ecuación permite hacer una predicción del tiempo de tratamiento térmico necesario, a una potencia constante de 900W y en las condiciones ensayadas, para conseguir una cinética de inactivación enzimática determinada, en función de la humedad de las harinas. Según este modelo la humedad tiene un efecto muy importante en la constante cinética de inactivación enzimática, al aumentar exponencialmente con el incremento de la humedad. No obstante, aunque se puede conseguir una destrucción enzimática a tiempos cortos y humedades altas equivalente a la obtenida con una combinación de tiempos más largos y humedades más bajas, es necesario estudiar cómo afectan las condiciones de tratamiento a las propiedades funcionales de las harinas. Las propiedades de empastado son unas de las propiedades funcionales más importantes de las harinas.

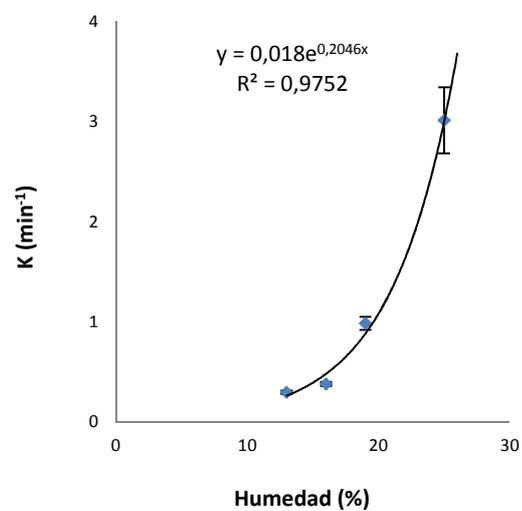


Figura 13. Efecto de la humedad en la constante cinética de inactivación enzimática

4.4. Estudio de las propiedades de empastado de las harinas tratadas

Se midió la viscosidad de las harinas (tratadas y control) durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento de una suspensión de harina y agua con el fin de evaluar efecto de la humedad y el tiempo de tratamiento MW en las propiedades de empastado. Las curvas de *pasting* obtenidas (un ejemplo de ello se puede observar en la Figura 14), mostraron la evolución típica de la viscosidad de la masa durante un ciclo de calentamiento programado en el equipo RVA; en este ensayo los gránulos de almidón presentes en la masa comienzan a absorber agua al comienzo del ciclo de calentamiento. A una determinada temperatura comienza la gelatinización del almidón con el consiguiente incremento de la viscosidad de la pasta. Al mantenerse la temperatura, llega un momento en que los gránulos comienzan a romperse, por lo que una vez alcanzado un máximo de viscosidad, esta tiende a disminuir. Cuando la pasta vuelve a enfriarse el almidón se reorganiza y como consecuencia de este fenómeno,

llamado retrogradación, la viscosidad vuelve a incrementarse. Los valores medios y grupos homogéneos obtenidos para los parámetros de empastado se recogen en la Tabla 6. Para determinar los efectos provocados por la humedad de las harinas y el tiempo de tratamiento MW, así como por su interacción doble sobre las propiedades de empastado, se sometieron los resultados obtenidos a análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba LSD. Los factores estudiados y sus interacciones mostraron un efecto significativo sobre todos de los parámetros estudiados, a excepción del factor “humedad” que no afectó a la viscosidad final (VF), tal y como se observa en la Tabla 5, que recoge los p-valores de los factores simples y la interacción doble correspondiente a las diferentes variables de empastado.

Tabla 5. p-valores

	PV	VC	BD	VF	SB	VT	PT
Humedad	0,0000	0,0000	0,0000	0,0569	0,0000	0,0000	0,0000
Tiempo de tratamiento	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000
Humedad*Tiempo tratamiento	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000

PV: viscosidad del pico; VC: viscosidad de caída o *trough*; BD: *breakdown* o estabilidad; VF: viscosidad final; SB: *setback* o retrogradación; VT: tiempo al que se alcanza la viscosidad máxima y PT: temperatura de *pasting*.

Tabla 6. Valores medios y grupos homogéneos para los parámetros de viscosidad

Humedad (%)	Niveles Tiempo tto ^a	PV (mPa·s)	VC (mPa·s)	BD (mPa·s)	VF (mPa·s)	SB (mPa·s)	VT (min)	PT (°C)
13	0	2270 a	1343 a	862 fg	3244 b	1864 de	5,665 bcde	78,93 abc
13	1	2414 fgh	1488 cd	926 ij	3338 c	1850 d	5,690 de	78,62 a
13	2	2422 gh	1504 de	918 ij	3353 cd	1850 d	5,600 abcd	78,57 a
13	3	2357 cde	1540 ef	833 ef	3392 cde	1852 d	5,600 abcd	79,55 abcde
13	4	2398 defgh	1538 ef	881 gh	3404 de	1866 de	5,510 a	79,95 de
16	0	2270 a	1343 a	862 fg	3244 b	1864 de	5,665 bcde	78,93 abc
16	1	2363 cdef	1446 b	940 jh	3346 cd	1845 d	5,577 abc	78,58 a
16	2	2365 cdef	1465 bc	901 hi	3335 c	1870 def	5,577 bcde	78,88 ab
16	3	2390 cdefgh	1564 fg	826 ef	3452 efg	1900 f	5,647 bcde	79,93 cde
16	4	2344 cd	1561 fg	783 d	3438 efg	1877 def	5,553 ab	80,22 e
19	0	2270 a	1343 a	862 fg	3244 b	1864 de	5,665 bcde	78,93 abc
19	1	2375 cdefg	1451 bc	924 ij	3340 c	1871 def	5,623 bcd	79,70 bcde
19	2	2277 a	1474 bcd	825 ef	3262 b	1810 c	5,600 abcd	79,13 abcd
19	3	2332 bc	1594 gh	730 c	3477 fg	1892 ef	5,643 bcde	81,68 f
19	4	2285 ab	1617 h	668 b	3417 ef	1800 c	5,667 cde	84,10 g
25	0	2270 a	1343 a	862 fg	3244 b	1864 de	5,665 bcde	78,93 abc
25	1	2445 h	1713 l	732 c	3101 a	1425 a	5,980 g	88,10 h
25	2	2391 cdefgh	1563 fg	820 de	3352 cd	1788 c	5,867 f	87,83 h
25	3	2256 a	1632 h	624 a	3491 g	1851 d	5,753 e	88,12 h
25	4	2398 efg	1714 l	735 c	3417 defg	1736 b	5,737 e	88,15 h
SD		21	16	14	26	13	0,048	0,39
IC (95%)		42	33	28	53	26	0,097	0,80

Valores con letras distintas dentro de una misma columna indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

PV: viscosidad del pico; VC: viscosidad de caída o *trough*; BD: *breakdown* o estabilidad; VF: viscosidad final; SB: *setback* o retrogradación; VT: tiempo al que se alcanza la viscosidad máxima y PT: temperatura de *pasting*.

^aEl factor “tiempo de tratamiento” se estudió para cuatro niveles, siendo para las humedades del 13, 16 y 19%, el nivel 1, 1 min; el nivel 2, 2 min; el nivel 3, 4 minutos; y el nivel 4, 8 min. Para la humedad del 25% el nivel 1, se corresponde con un tratamiento de 0,67 min; el nivel 2, de 1 min; el nivel 3, de 2 minutos; y el nivel 4, de 4 min.

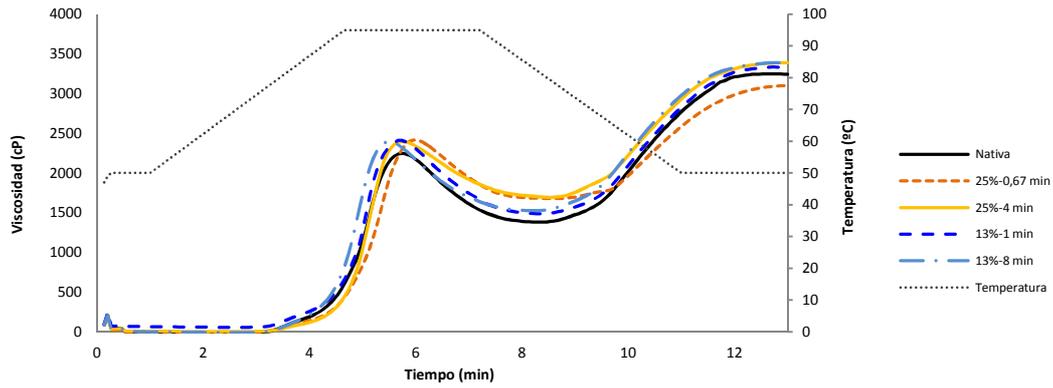


Figura 14. Perfiles de viscosidad de harina control no tratada (nativa) y harina al 25% de humedad tratada durante 0,67 y 4 min y harina al 13% de humedad tratada durante 1 y 8 min.

Como puede verse en la Figura 14 la viscosidad de pico aumentó en las muestras tratadas por MW en comparación con la correspondiente a la harina sin tratar. La Figura 15 muestra el efecto de la humedad y del tiempo de tratamiento por MW sobre la viscosidad de pico. Puede verse que el incremento fue más acusado a tiempos de tratamiento suaves (40 s, 1 y 2 min), tendiendo a disminuir a humedades más altas (19 y 25%) y tiempos de tratamiento más largos. La viscosidad de pico más alta se obtuvo con la combinación de máxima humedad (25%) y menor tiempo de tratamiento (40 s) y la más baja a la misma humedad sometida a un tiempo de tratamiento más largo (2 min). Un comportamiento similar fue también observado por Roman *et al.* (2014) en harinas de maíz con una humedad del 30%. Luo *et al.* (2006) también observaron en almidón de maíz con 30% de humedad, tratado con MW durante 20 min a razón de 1 W/g, que existía una disminución de la viscosidad, la cual relacionó con la formación de nuevos enlaces entre las cadenas de almidón aumentando las zonas de mayor reagrupamiento y cristalinidad durante el tratamiento. Según los resultados obtenidos parece que el efecto de la reducción de la viscosidad máxima a tiempos altos de tratamiento se empieza a observar en las harinas con 25% de humedad, siendo más claro el efecto en harinas tratadas con MW con humedades superiores al 19% como lo corroboran anteriores trabajos.

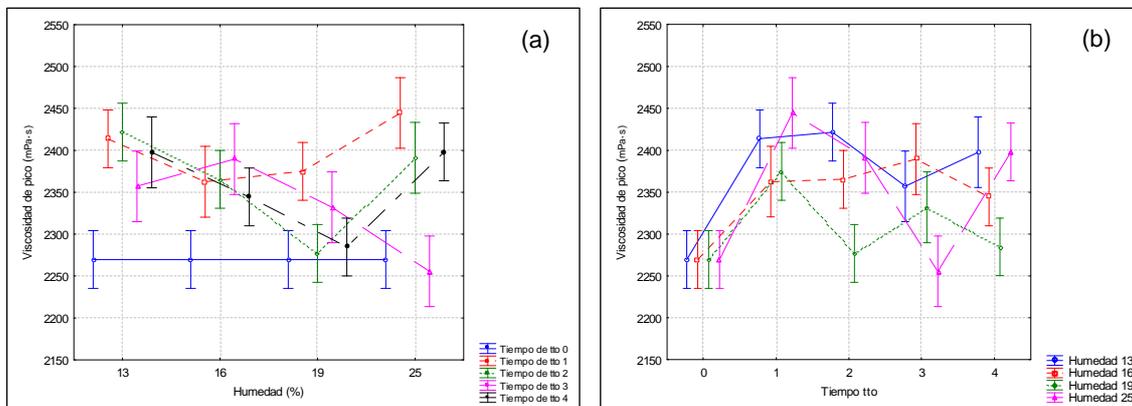


Figura 15: Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la viscosidad de pico (PV)

La temperatura de *pasting* aumentó al incrementarse el tiempo de tratamiento (Figura 16), siendo mayor a humedades más altas. Se observó un ligero aumento con humedades bajas (13 y 16%) y tiempos de tratamientos altos (4 y 8 min); en harinas con 19% de humedad el aumento fue mayor; mientras que en las harinas con el 25% de humedad el aumento fue el más pronunciado no teniendo efecto el tiempo de tratamiento sobre la temperatura de *pasting*. Roman *et al.* (2014) explicaron este aumento de temperatura a causa de una mayor dificultad de las harinas tratadas para absorber agua. El agua es absorbida principalmente por las regiones amorfas; el tratamiento con MW a humedades altas favorece el reagrupamiento molecular en los gránulos de almidón incrementándose la cristalinidad y rigidez e impidiendo la absorción de agua. Gupta *et al.* (2008) investigaron el efecto del tratamiento con MW y del tratamiento térmico en medio acuoso o *annealing* en almidón de trigo sarraceno a tres niveles de humedad 30.3, 40.0, and 50.4 kg/100kg y comprobaron que se incrementaba significativamente la temperatura de *pasting*. Además, se producía una disminución de la solubilidad de la amilosa. La resistencia a la solubilidad de la amilosa y el incremento de la temperatura de gelatinización a mayor nivel de humedad se atribuyó a un incremento de entrecruzamientos entre los componentes amilosa y amilopectina en el almidón de trigo sarraceno.

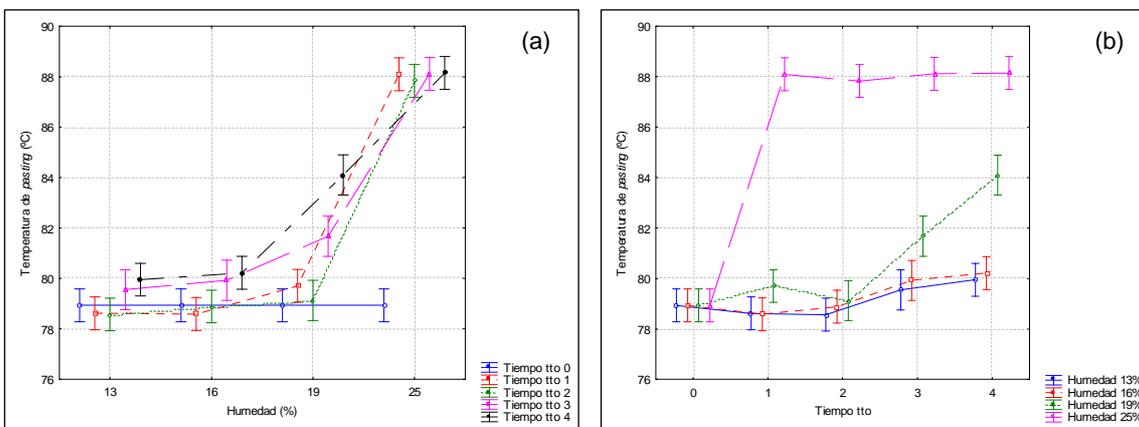


Figura 16. Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la temperatura de *pasting* (PT)

El tiempo al que se alcanzó la viscosidad máxima (Figura 17) se retrasó a humedad alta (25%), especialmente a tiempo de tratamiento corto (40 s); por el contrario, se adelantó en harinas a las que se habían aplicado tiempos de tratamiento mayores a humedades bajas (13 y 16%) (Figura 14). Varias pueden ser las causas de este comportamiento a humedades más altas: la formación de complejos lípido-amilosa retrasa el hinchamiento de los gránulos durante la cocción debido a que el complejo es poco soluble; asimismo, se favorece el reagrupamiento molecular incrementándose la cristalinidad y se dificulta la absorción de agua Roman *et al.* (2014).

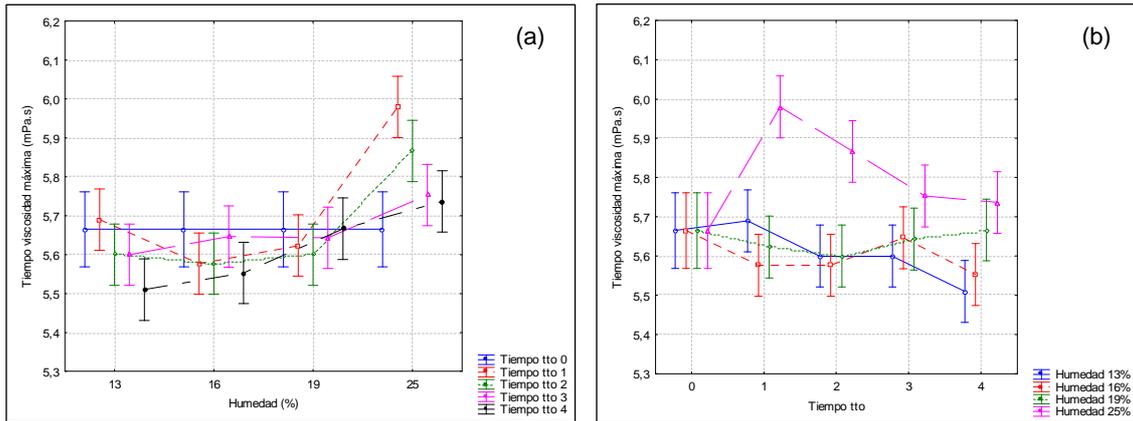


Figura 17. Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la viscosidad máxima (VT)

La viscosidad de caída (Figura 18) aumentó con la humedad y el tiempo de tratamiento (Tabla 6). Los mayores aumentos de la viscosidad de caída se encontraron en las harinas con mayor contenido de humedad (19 y 25%). La viscosidad de caída más alta se observó en harinas con el 25% de humedad.

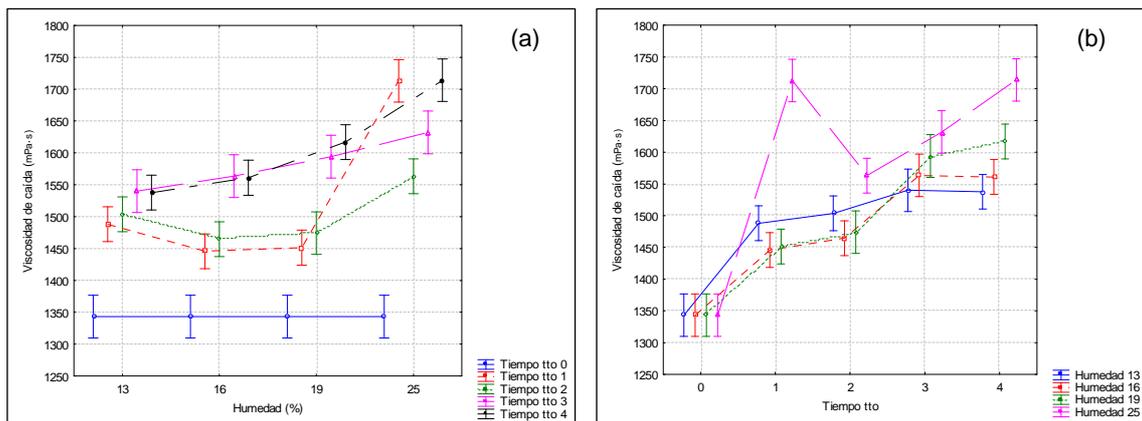


Figura 18. Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la viscosidad de caída (VC)

Consiguientemente, el *breakdown* (Figura 19) disminuyó al incrementarse la humedad y los tiempos de tratamiento (Tabla 6); esto significa que aumentó la estabilidad de las harinas (Anderson y Guraya, 2006). Sin embargo, también se observa que el *breakdown* aumentó a humedades bajas (13 y 16%) y tiempos de tratamiento suaves (1 y 2 minutos) y la disminución del *breakdown* fue mayor a humedades y tiempos de tratamientos altos (19 y 25%; 4 y 8 min.), tal como observaron Roman *et al.* (2014) debido posiblemente a la formación de complejos lípido-amilosa en gránulos más rígidos y estables (Rumroytum *et al.* 2014).

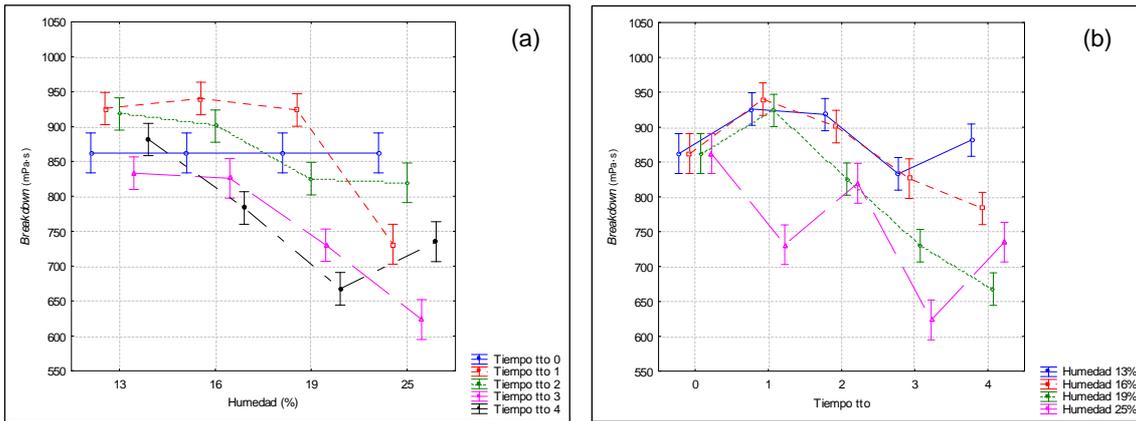


Figura 19. Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la estabilidad o *breakdown* (BD)

La retrogradación o *setback* (Figura 20) disminuyó en las harinas con humedades altas (19 y 25%) sometidas a tratamientos con MW más largos (4 y 8 min), en concordancia con la tendencia observada por Roman *et al.* (2014) en harina de maíz. La formación de complejos lípido-amilosa (tipo V) retrasa la retrogradación porque evita la formación de dobles hélices y la recrystalización de la amilosa. En el resto de las harinas apenas varió, a excepción de un pronunciado descenso de la retrogradación en la harina con el 25% de humedad sometida a un tiempo de tratamiento bajo (40 s).

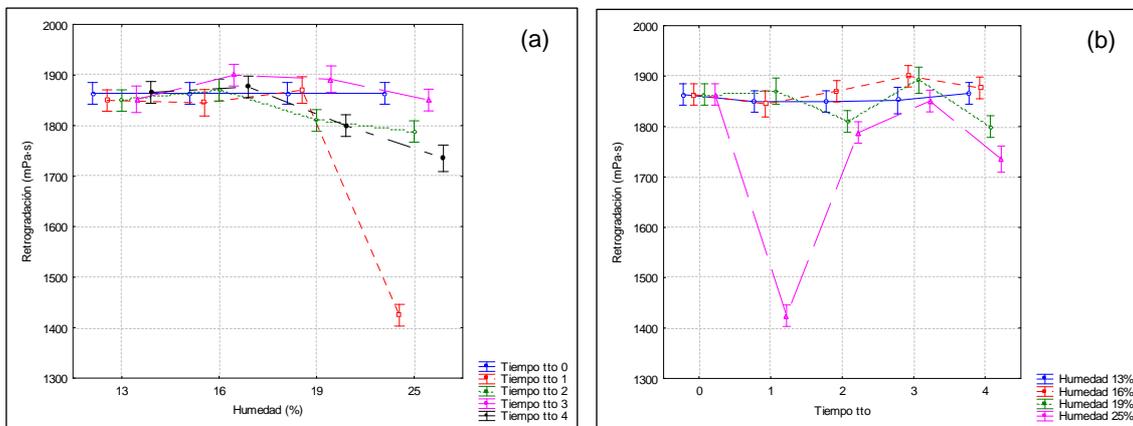


Figura 20. Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la retrogradación o *setback* (SB)

La viscosidad final (Figura 21) se vio afectada por el tiempo de tratamiento y la interacción doble de la humedad y el tiempo de tratamiento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las muestras debidas al efecto simple de la humedad. La tendencia general fue el aumento de la viscosidad final, sin embargo, se observa un marcado descenso de este parámetro en harinas de 25% de humedad sometidas a tratamiento suave (40 s), posiblemente debido a la formación de complejos amilosa-lípidos que retardan la interacción y agregación de las moléculas de almidón reduciendo la retrogradación (Figura 14).

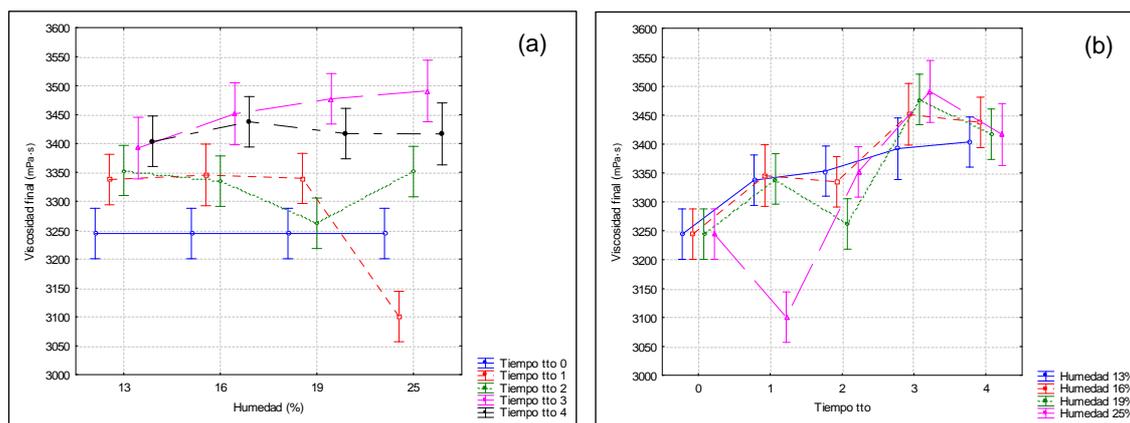


Figura 21. Efecto de la humedad de la harina (a) y del tiempo de tratamiento por MW (b) sobre la viscosidad final (VF)

5. CONCLUSIONES

El tratamiento térmico con MW resulta ser un método eficaz para la inactivación de enzimas β -glucanasas presentes en harinas de arroz responsables de la reducción del peso molecular de los BG. El incremento del contenido de humedad de las harinas condujo a una mayor reducción de la actividad β -glucanásica. Esta actividad se ajustó a una ecuación exponencial dependiente del tiempo de tratamiento de MW y de una constante cinética de inactivación enzimática que dependió muy marcadamente de la humedad de la harina. La constante cinética aumentó exponencialmente con la humedad de las harinas. Un adecuado ajuste del tiempo de tratamiento y de la humedad de las harinas puede ser efectivo para preservar el peso molecular de los BG en los productos de panificación.

El tratamiento térmico con MW de la harina de arroz afectó a las propiedades de empastado de la harina. La humedad de la harina y el tiempo de tratamiento por MW tuvo un efecto significativo en todos los parámetros de empastado, a excepción de la viscosidad final que resultó independiente del factor humedad.

En harinas de humedad más alta (25%), los tratamientos con MW mostraron cambios en las propiedades de empastado que sugieren una mayor modificación de la estructura de los gránulos de almidón con el aumento de la cristalinidad debido a reagrupamientos de las cadenas de amilosa y la formación de complejos lípido-amilosa. El resultado fue la obtención de harinas con un comportamiento viscoso diferente al de las harinas originales.

El fin último de este estudio es la obtención de panes de calidad enriquecidos con BG cuyo peso molecular no se vea afectado por la actividad enzimática endógena. Para ello, completando este estudio, trabajos futuros deben determinar a través de propiedades físicas y características sensoriales, la calidad de los panes elaborados a partir de harinas de arroz tratadas con MW con actividad β -glucanásica residual o nula.

6. AGRADECIMIENTOS

A Felicidad Ronda, Sandra Pérez y Pedro Luis Vega por la ayuda prestada para el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster y la elaboración de esta memoria.

Este Trabajo Fin de Master ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2012-35088). Las bolsas utilizadas fueron suministradas gratuitamente por Cryovac.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, A. K., & Guraya, H. S. (2006). Effects of microwave heatmoisture treatment on properties of waxy and non-waxy rice starches. *Food Chemistry*, 97, 318–323.
- Arntfield, S.D., Ismond, M.A.H., Murray, E.D.(1990). Thermal analysis of food proteins in relation to processing effects. In V. R. Harwalkar, & C. -Y. Ma (Eds.), *Thermal analysis of foods* (pp. 51–91). London & New York: Elsevier Applied Science.
- Brummer, Y., Duss, R., Wolever, T.M.S., Tosh, S.M. (2012). Glycemic response to extruded oat bran cereals processed to vary in molecular weight. *Cereal Chemistry*, 89, 255–261.
- Chang, Y. K. & El-Dash, A. A. (1998). Effect of microwave energy on lipase inactivation and storage stability of brown rice. *Acta Alimentaria*, Vol. 27, No.2, 193-202, ISSN-0139-3006.
- Cleary, L.J., Andersson, R., Brennan, C.S. (2007). The behaviour and susceptibility to degradation of high and low molecular weight barley β -glucan in wheat bread during baking and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 102, 889–897.
- Dikeman, C.L., Fahey, G.C. (2006). Viscosity as related to dietary fiber: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 649–663.
- Dinčov, D.D., Parrott, K.A. y Pericleous, K.A. Heat and mass transfer in two-phase porous materials under intensive microwave heating. *Journal Food Engineering*, 65:403-412, 2004.
- Diraman, H. (2010). Effect of microwaves on technological and rheological properties of suni-bug (*eurygaster spp*) damaged and undamaged wheat flour. *Food Science and Technology Research*, 16(4), 313-318.
- Edwards, G. H. (1964). Effects of microwave radiation on wheat and flour: the viscosity of the flour pastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.15, No.1, 108-114, ISSN-0022-5142.
- Friedman, M. (2013). Rice brans, rice bran oils, and rice hulls: Composition, food and industrial uses, and bioactivities in humans, animals, and cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10626-10641.
- Gunness, P., Gidley, M.J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol - lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food & Function*, 1, 149–155.

- Gupta, M., Gill, B. S., Baw, A. S. (2008). Gelatinization and X-ray Crystallography of Buckwheat Starch: Effect of Microwave and Annealing Treatments. *International Journal of Food Properties*, Vol. 11, No. 1, 173 – 185, ISSN (electronic)- 1532-2386.
- Havrlentová, M., Petrušáková, Z., Burgárová, A., Gago, F., Hlinková, A., Šturdík E. (2011): Cereal β -glucans and their significance for the preparation of functional foods – a review. *Czech J. Food Sci.*, 29: 1–14.
- Irfan, I., Pawelzik, E., Luecke, W. (1998). Proceeding of the 7th International Working Conference on Stored product Protection.
- Jiaxun-Tao; Rao, R. & Liuzuo, J. (1993). Microwave heating for Rice bran stabilization. *Journal of Microwave, Power and Electromagnetic Energy*, Vol. 28, No.3, 156-164, ISSN-0832-7823.
- Juliano, B.O. (1985). Rice bran. In: *Rice Chemistry and Technology*, pp. 647–680. Juliano, B. O., Ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C.G. (2007). Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science*, 46, 101–118.
- Lazaridou, A., Marinopoulou, A., Matsoukas, N. P., & Biliaderis, C. G. (2014). Impact of flour particle size and autoclaving on β -glucan physicochemical properties and starch digestibility of barley rusks as assessed by in vitro assays. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 4(1), 58-73.
- Lewandowicz, G., Jankowskib, T., & Fornal, J. (2000). Effect of microwave radiation on physicochemical properties and structure of cereal starches. *Carbohydrate Polymers*, 42, 193–199.
- Luo, Z., He, X., Fu, X., Luo, F., & Gao, Q. (2006). Effect of microwave radiation on the physicochemical properties of normal corn, waxy corn and amylomaize V starches. *Starch-Starke*, 58, 468–474.
- Pinkrová, J., Hubáčková, B., Kadlec, P., Příhoda, J., & Bubník, Z. (2003). Changes of starch during microwave treatment of rice. *Czech Journal of Food Sciences*, 21, 176–184.
- Rieder, A., Ballance, S., Løvaas, A., & Knutsen, S. H. (2015). Minimizing molecular weight reduction of β -glucan during barley bread making. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 767-774.
- Roman, L., Martinez, M. M., Rosell, C. M., & Gomez, M. (2015). Effect of microwave treatment on physicochemical properties of maize flour. *Food and Bioprocess Technology*, 8(6), 1330-1335.
- Ronda, F., Perez-Quirce, S., Angioloni, A., & Collar, C. (2013). Impact of viscous dietary fibres on the viscoelastic behaviour of gluten-free formulated rice doughs: A fundamental and empirical rheological approach. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 252-262.

- Ronda, F., Perez-Quirce, S., Lazaridou, A., & Biliaderis, C. G. (2015). Effect of barley and oat beta-glucan concentrates on gluten-free rice-based doughs and bread characteristics. *Food Hydrocolloids*, 48, 197-207.
- Rumroytum, P., Borompichaichartkul, C., & Kongpensuk, V. (2014). Effect of drying involving fluidisation in superheated steam on physicochemical and antioxidant properties of Thai native rice cultivars. *Journal of Food Engineering*, 123, 143–147.
- Scientific opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and “digestive function” (ID 850) pursuant to article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006, 2207. (2011).
- Stevenson, D. G., Biswas, A., & Inglett, G. E. (2005). Thermal and pasting properties of microwaved corn starch. *Starch-Starke*, 57, 347–353.
- Tiwari, U., Cummins, E., (2009). Factors influencing β -glucan levels and molecular weight in cereal-based products. *Cereal Chemistry* 86(3), 290-301.
- Tosh, S.M. (2013). Review of human studies investigating the post-prandial blood-glucose lowering ability of oat and barley food products. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67, 310–317.
- Vetrimani, R.; Jyothirmayi, N.; Rao, H. P. & Ramadoss, C. S. (1992). Inactivation of lipase and lipoxygenase in cereal bran, germ and soybean by microwave treatment. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, Vol.6, No. 6, 532-535, ISSN (printed) - 0023-6438.
- Volman, J., Ramakers, J., Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiol Behav.* 94: 276-284.
- Wolever, T.M.S., Tosh, S.M., Gibbs, A.L., Brand-Miller, J., Duncan, A. M., Hart, V., et al. (2010). Physicochemical properties of oat β -glucan influence its ability to reduce serum LDL cholesterol in humans: A randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 723–732.
- Wood, P.J. (2007). Cereal beta-glucans in diet and health. *Journal of Cereal Science*, 46, 230–238.
- Zhong, Y., Tu, Z., Liu, C., Liu, W., Xu, X., Ai, Y., et al. (2013). Effect of microwave irradiation on composition, structure and properties of rice (*oryza sativa* L.) with different milling degrees. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 228-233.