



**INACTIVACIÓN DE ENZIMAS MEDIANTE MICROONDAS  
APLICADA A LAS  $\beta$ -GLUCANASAS DE CEBADA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**  
Curso 2013/14

**Alumno:**

Yeral Mesa Florian

**Tutores:**

María José Cocero

Óscar Benito Román

Soraya Rodríguez Rojo

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

## 1. RESUMEN

En este trabajo se estudió el desarrollo de un nuevo procedimiento que logre reducir el tiempo y el consumo energético en la etapa de inactivación de las enzimas  $\beta$ -glucanasas de la cebada mediante la aplicación del microondas (MW) y maximizar el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos extraídos. También se buscó minimizar el contenido en antioxidantes (polifenoles) en el etanol obtenido después de la inactivación enzimática.

Las variables de operación estudiadas fueron: relación cebada:etanol (m/v) (1:4, 1:6 y 1:8), potencia de 250W, 440W y 600W y tiempo de 5, 10 y 15 minutos). Consiguiéndose los mejores resultados con la relación de condiciones de 1:4, 600W y 10 minutos.

En comparación con el procedimiento convencional se logró reducir el tiempo de operación de 120 a 10 minutos. Además se logró disminuir el consumo energético de 954 a 389 kJ con el procedimiento con microondas. También se logró obtener  $\beta$ -glucanos con peso molecular de 449 kDa comparado con los 463 kDa obtenido con el procedimiento convencional.

En cuanto a la minimización de los polifenoles totales presentes en el etanol residual de los experimentos se obtuvieron resultados favorables con las condiciones experimentales correspondientes de: relación cebada:etanol (m/v) 1:4, tiempo de operación de 15 minutos y una potencia de 440W, cuyos resultados obtenidos fue de 2,01mg de Acido Gálico Equivalente/g cebada siendo más eficaz que el procedimiento convencional el cual dio valores de 3,04 mg de Acido Gálico Equivalente/g cebada.

## 2. INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare*) es una planta de la familia de las poáceas. Es un cereal, al igual que la avena, el arroz, el trigo o el maíz. Tradicionalmente se ha utilizado para alimentar animales, bien sea a través de piensos o con el grano directamente. En 2007 la Asociación de Malteros de España transformaron más de 650.000 toneladas de malta proveniente de la cebada de las cuales el 97% fue utilizada en la fabricación de cerveza (MAGRAMA, 2011).

Este cereal es rico en azúcares o hidratos de carbono complejos, principalmente almidón, fibra y celulosa y cantidades menores de maltosa y rafinosa. En proporciones menores, contiene también hidratos de carbono simples, como fructosa y glucosa y otros azúcares. Conjuntamente contiene (1,3), (1,4)  $\beta$ -D-glucanos localizados en el endospermo del grano.

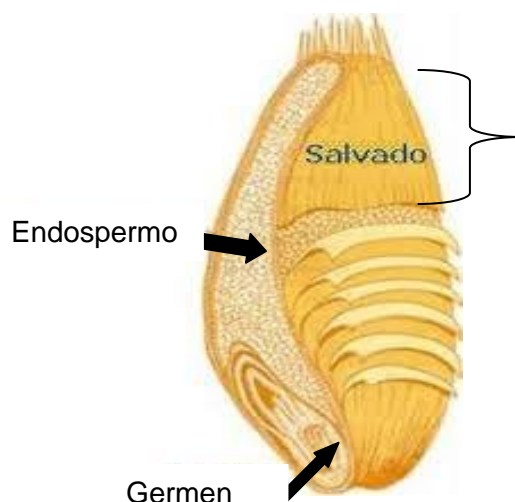


Figura 1. Vista del grano de cebada

### 2.1. Características de los $\beta$ -glucanos.

Los  $\beta$ -glucanos son polímeros de beta-D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos alternativamente entre los carbonos 1 y 4 (70% de los casos) y 1 y 3 (30% de los casos). Están localizados en su mayoría en las paredes celulares del endospermo y en la capa de aleurona de los diferentes granos de cereales, especialmente cebada y avena.

Los  $\beta$ -glucanos también son extraídos de los salvados de algunos granos de cereales como la avena y cebada, y en un grado menor en el centeno y el trigo.

La cantidad de  $\beta$ -glucanos presente en los cereales es relativamente baja en relación con otros componentes (en torno al 3-7% en la cebada), por esto es necesario desarrollar procedimientos tecnológicos eficientes para la extracción de los  $\beta$ -glucanos preservando su alto peso molecular, para así poder incorporarlos en el desarrollo de productos funcionales ricos en esta fibra alimentaria.

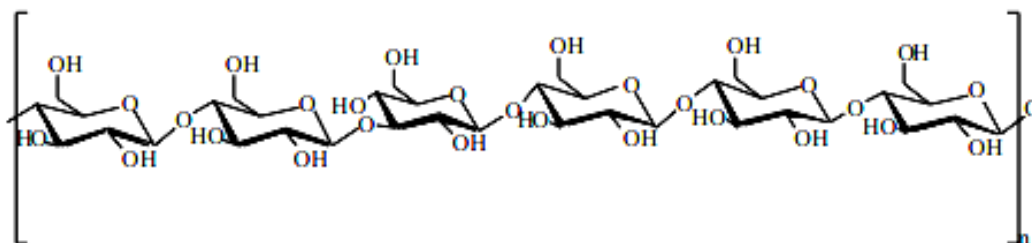


Figura 2. Estructura química del (1,3), (1,4)  $\beta$ -D-glucano.

## 2.2. Usos e importancia de los $\beta$ -glucanos

### 2.2.1. Efectos de los $\beta$ -glucanos sobre la salud

En la actualidad existe un cierto interés sobre los  $\beta$ -glucanos debido a que son un componente importante de la fibra alimenticia soluble, con gran influencia en los valores nutricionales y propiedades funcionales de la alimentación humana. Además están relacionados con la reducción de los niveles de colesterol LDL en la sangre como demuestran varios estudios que se describen a continuación.

Uno de los estudios más reciente se publicó en el periódico médico "The British Journal of Nutrition" en junio de 2007. La investigación, llevada a cabo por el Departamento de Medicina de Familia y Salud Comunitaria de la Facultad de Medicina de la Universidad de Minnesota (EE.UU.), determinó que los complementos alimenticios que contienen concentrado de  $\beta$ -glucano pueden considerarse como una opción efectiva para mejorar el perfil de lípidos sanguíneos. Así mismo, en 1997 la FDA (Food and Drug Administration, USA) incluyó los  $\beta$ -glucanos en la lista de productos que contribuyen a una disminución del colesterol en la sangre, estableciendo también el protocolo de etiquetado de los productos que contienen estos polímeros buscando resaltar sus efectos positivos sobre la salud humana (Baik and Ullrich, 2008). En la presente declaración indica claramente que la ingesta de 3 gramos al día de  $\beta$ -glucano de cebada de alto peso molecular (superior a 50000 Da) produce la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Años más tardes la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (European Food Safety Authority) también publicó sus propias conclusiones acerca de los efectos beneficiosos de los  $\beta$ -glucanos sobre la salud, que serían el mantenimiento de unos niveles normales de concentración de colesterol-LDL en la sangre, un incremento de la sensación de saciedad que conlleva una reducción en la ingesta de energía, con una reducción de las respuestas glucémicas postprandiales, y con una mejora de la función digestiva (EFSA Journal 2011). En la tabla 1 se recoge las cantidades de  $\beta$ -glucanos recomendadas por dicha entidad.

Tabla 1. Cantidades de  $\beta$ -glucanos recomendadas por de la EFSA.

DECLARACIÓN NUTRICIONAL	INGREDIENTE FUNCIONAL	INGESTAS REQUERIDAS
Reducción de las concentraciones de LDL, colesterol y colesterol total en sangre.	$\beta$ -glucano de cebada	3 gramos diarios de $\beta$ -glucanos de manera continuada.
Reducción en la respuesta glucémica postprandial.	$\beta$ -glucano de cebada	4 gramos de $\beta$ -glucano.

**Fuente:** EFSA Journal 2011.

De acuerdo con datos del Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA) en 2011, avalado por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad de España el 37,4 % de la población adulta española presenta niveles de colesterol de entre 190 y 240 mg/dL. Es por ello que cada vez es más frecuente la lucha para combatir esta y otras enfermedades como son la obesidad y la diabetes. Según se explica en la tabla 1 la EFSA recomienda que la ingesta de 3 gramos diario de  $\beta$ -glucanos reduce la concentración de colesterol LDL en la sangre. Por esta razón se incluyen los  $\beta$ -glucanos en nuevos productos funcionales como la panadería, pastelería, bollería hechos a base de harina de cebada enriquecida con  $\beta$ -glucanos mezcladas con harina de trigo (Ronda et al, 2011).

### 2.2.2. Efectos de los $\beta$ -glucanos en panificación

Según han demostrado algunos autores, los  $\beta$ -glucanos también se pueden utilizar como aditivos alimentarios, específicamente como agentes espesantes para modificar la textura y la apariencia en las formulaciones alimenticias y también como sustituyentes de la grasa en el desarrollo de alimentos bajos en calorías. De hecho, las fracciones ricas en  $\beta$ -glucanos de cereales o  $\beta$ -glucanos purificados se han incorporado con éxito a productos como los cereales de desayuno, pasta, fideos y bollería, así como carne y otros productos de uso diario (Lazaridou et al., 2007).

### 2.2.3. Obtención de $\beta$ -glucanos de alto peso molecular (MW)

Para obtener  $\beta$ -glucanos de mayor peso molecular MW ( $\geq 200$  kDa) es necesario realizar un proceso de inactivación de las  $\beta$ -glucanasas, enzimas endógenas responsables de la despolimerización de los  $\beta$ -glucanos. Esto se consigue a través del procedimiento convencional el cual consiste en tratar la cebada a reflujo total con etanol 80% a ebullición durante 2 horas (Benito-Román et al., 2011), lo cual hace que un proceso costoso porque implica un gasto energético elevado. A esto hay que añadirle el problema que tiene el etanol cuando está a ebullición, y es que extrae los antioxidantes (polifenoles) presentes de manera natural en la cebada durante el proceso de inactivación de dichas enzimas, consiguiendo de esta manera que el producto final sea rico en  $\beta$ -glucanos y pobre en antioxidantes. En la figura 3 se puede ver el proceso completo para la obtención de  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular:

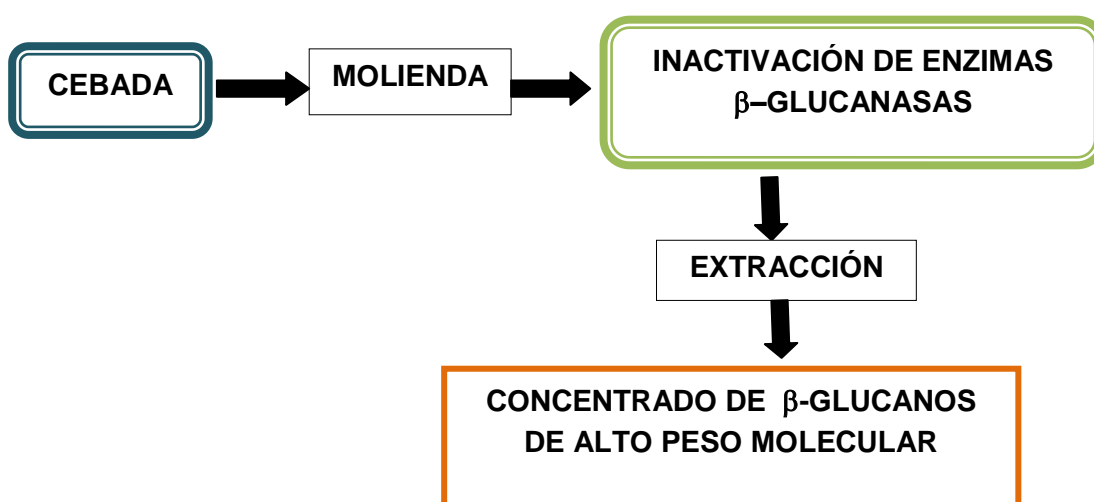


Figura 3. Esquema de las etapas implicadas en la obtención de  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular.

La etapa de extracción de los  $\beta$ -glucanos tras la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas se lleva a cabo mediante ultrasonidos, de acuerdo con lo propuesto en el trabajo de Benito-Román et al, 2013. Dicho proceso de extracción se va usar en el presente trabajo y va a ser descrito con más detalle en la sección 4.4.

Como se ve en la figura 3, la obtención de  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular es un proceso complicado debido a que conlleva la realización de muchas etapas, siendo la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas una de las más encarecen el proceso de obtención de estos.

### **2.3. La Utilización del microondas en la inactivación de enzimas.**

El interés por utilizar el microondas en la inactivación de las enzimas se realiza por las ventajas que tiene en producir un calentamiento rápido, fácil y en tiempos cortos (Irfan et al., 1998). Así mismo, recientemente se han realizado varios estudios científicos basados en la inactivación de algunas enzimas provenientes del arroz (Kaasová et al., 2001 and Kaasová et al., 2002). Uno de los trabajos más recientes consiste en inactivar la actividad de las enzimas lipasa, y lipoxidasa en arroz integral con diferentes grados de molienda mediante la aplicación del microondas. Los parámetros utilizados en esta investigación fueron: grado de molienda (0, 3, 6 y 10%), potencia (539 y 384 W), temperaturas (20 a 100 °C) y relación harina-agua (1:03) en donde se concluyó que la irradiación con microondas reduce la actividad de las enzimas mencionadas anteriormente (Zhong et al., 2013). En el caso de las  $\beta$ -glucanasas no existen estudios científicos basados en el uso del microondas que busquen la inactivación de dichas enzimas.

### 3. OBJETIVOS

En este contexto, el objetivo de este trabajo es conseguir inactivar las  $\beta$ -glucanasas de la cebada a través de un proceso alternativo al convencional mediante la aplicación de microondas para conseguir con ello reducir el tiempo de inactivación enzimática y obtener  $\beta$ -glucanos de igual o mayor peso molecular que el proceso convencional. Además se pretende estudiar las variables de operación relación cebada:etanol (m/v), tiempo(minutos) y potencia (W) del nuevo proceso.

Por otra parte, se busca minimizar el contenido de polifenoles totales en el residuo etanólico que se recoge tras la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Materia prima

Para realizar este trabajo se utilizó un tipo de cebada desarrollada y proporcionada por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL; Valladolid, España). Se dispuso de una variedad de cebada cerosa correspondiente a la cosecha del año 2006; esta variedad de cebada denominada D24 y registrada con el nombre comercial de FIALIS, es una cebada “vestida” al presentar cubierta externa adicional. El cereal se molió con un molino de rodillo CHOPIN CD1 situado en el Centro Tecnológico de Cereales (CETECE; Palencia, España) (*Benito-Román et al., 2013*). Este molino da tres fracciones de molienda: subproducto de compresión, subproducto de trituración y subproducto de compresión + trituración, en este trabajo de investigación el que realmente tiene interés es el subproducto de trituración, es decir, los salvados gruesos, el cual tiene un tamaño de partículas muy heterogénea.

Como se explicaba en el párrafo anterior, una vez molida la cebada se procedió a medir el tamaño de partícula de la fracción de salida del cereal en un equipo de difracción láser (Malvern Mastersizer 2000). La medida se hizo en vía seca con el accesorio Scirocco dando un tamaño de partículas medio de  $984 \pm 22 \mu\text{m}$  (el 90% de las partículas tiene más de  $600 \mu\text{m}$ ). En tabla 5 se encuentra recogida la composición de los parámetros de interés de este trabajo.



Tabla 2. Composición de la fracción de molienda de cebada usada en el presente trabajo.

COMPOSICIÓN			
$\beta$ -Glucanos	Fibra Alimentaria	Tamaño de Partícula Inicial	Tamaño de Partícula Final
%	g/100g	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$
5,24	22,7	985 $\pm$ 22	630

## 4.2. Procedimiento experimental.

### 4.2.1. Homogeneización del tamaño de partícula de la cebada.

Para facilitar la penetración del flujo de etanol hacia todas las partículas de cebada y permitir así una disminución del tiempo de inactivación de las  $\beta$ -glucanasas es necesario hacer una segunda molienda previa que se efectuó con un molino de uso doméstico modelo Automatic KSM2 (tipo 4041) de la casa comercial BRAUN. Esto se hace porque de esta forma se homogeniza el tamaño y la forma de la materia prima que como se explicaba anteriormente. En función del tiempo y cantidad de material a triturar se pueden obtener extractos de diferente tamaño de partículas. En el presente se pudo obtener un tamaño de partícula adecuado empleando 3 ciclos de tiempo de 20 segundos y una cantidad aproximada de 35 gramos de la materia prima. Con la relación de estas dos variables se logró alcanzar un tamaño de partícula medio de 630  $\mu\text{m}$  y una apariencia física de antes y después de la segunda molienda como se puede ver en la siguiente figura:



**1<sup>era</sup> Molienda (Molino CHOPIN CD1)**      **2<sup>da</sup> Molienda (Molinillo Domestico)**

*Figura 4. Apariencia física de la cebada antes y después de la segunda molienda.*

### **4.3. Inactivación de Enzimas**

#### **4.3.1. Procedimiento Convencional**

La inactivación de las  $\beta$ -glucanasas se llevó a cabo mediante la utilización del procedimiento convencional el cual consiste en someter la cebada molida a ebullición con reflujo total de etanol, relación cebada:etanol 80% (m/v) de 1:6 (120 g de cebada, 720 ml de etanol 80%) durante 2 horas en un montaje de vidrio formado por un balón de 2000 mL (en donde se coloca la mezcla etanol/cebada), una manta calefactora (potencia 530W) y un condensador. De esta manera se busca hacer una comparativa en término de eficacia de inactivación de las  $\beta$ -glucanasas entre el procedimiento convencional y el procedimiento alternativo con Microondas (MW) como se describe en la sección 4.3.2.

#### **4.3.2. Procedimiento Alternativo con la aplicación del Microondas (MW)**

A continuación se explica detalladamente la estructura el montaje experimental en el cual se llevará a cabo el desarrollo del presente trabajo:

Primeramente se conecta un balón de vidrio de 500 mL (donde va la mezcla etanol-cebada) con un tapón de plástico colocado dentro del microondas (modelo GD566M, marca Panasonic, China) de 1000W y 50Hz, y unido a un condensador. El condensador va conectado a una fuente de refrigeración (con agua del grifo) para que de esta forma no pueda evaporarse el etanol 80% v/v que está en ebullición. En las siguientes figuras 5 y 6 se muestra el montaje estructural completo visto desde diferentes perspectivas (exterior e interior):

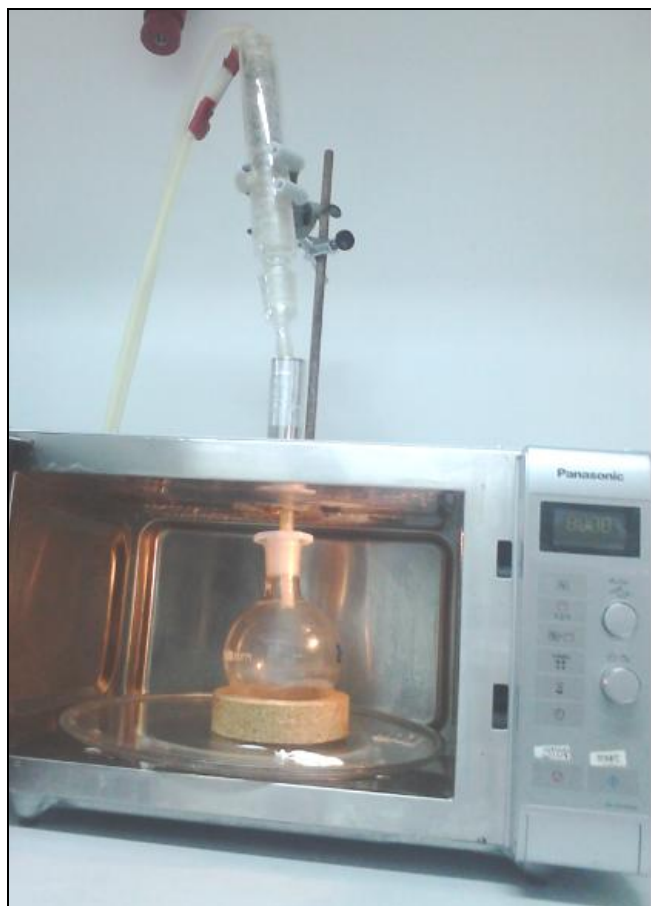


Figura 5. Vista exterior del montaje completo del proceso alternativo con microondas.



Figura 6. Vista interior del montaje con el balón de 500ml.

#### 4.3.2.1. Variables de operación a estudiar

Las variables de operación a estudiar en este trabajo son: relación cebada:etanol 80% (1:4, 1:6 y 1:8) (m/v), potencia (250, 440 y 600W) y tiempo (5, 10 y 15 minutos). Al mismo tiempo, en cada experimento se colocaron 25 gramos de cebada en el balón correspondiente con la cantidad de etanol relacionada con las muestras tal como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 3. Condiciones experimentales seguidas en este trabajo.

Relación cebada:etanol (m/v)	Potencia (W)	Tiempo (min)
1:4	250	5
1:6	440	10
1:8	600	15

Por otra parte, se utilizó un diseño experimental RSM box Behnken con 12 condiciones experimentales diferentes, 4 repeticiones del punto central y en total 16 experimentos como se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4. Plan experimental seguido en este trabajo

Nº Exp.	Relación cebada:etanol (m/v)	Potencia (W)	Tiempo (min)
1	1:4	440	5
2	1:8	440	5
3	1:4	440	15
4	1:8	440	15
5	1:4	250	10
6	1:8	250	10
7	1:4	600	10
8	1:8	600	10
9	1:6	250	5
10	1:6	250	15
11	1:6	600	5
12	1:6	600	15
13	1:6	440	10
14	1:6	440	10
15	1:6	440	10
16	1:6	440	10

Para realizar cada experimento se procedió de la siguiente manera:

- i) Primeramente se pesaron los 25 g de cebada y se colocó dentro del balón de 500 mL,
- ii) Después se midieron con una probeta el volumen de etanol 80% (v/v) a utilizar en cada experimento,
- iii) Después se procedió a conectar el balón al condensador,
- iv) Una vez hecha esta conexión se precalienta la mezcla de cebada-etanol aplicando un tiempo de 1,5 minuto que es el tiempo que tarda en empezar la ebullición,
- v) Posteriormente se procede a aplicar ciclos cortos de calentamiento (20 segundos) y pausas (30 segundos) en el microondas. Esto se debe a que con la aplicación de tiempo continuo de calentamiento provoca un flujo de ebullición muy turbulento dentro del balón lo que causa una subida incontrolada de la mezcla de cebada y etanol por las tuberías hasta el condensador,
- vi) Transcurrido el tiempo total de tratamiento térmico se dejó enfriar la suspensión, filtrándose a vacío (con un embudo Büchner, kitasato y papel de filtro) a fin de recuperar la cebada,
- vii) Una vez terminada la filtración, el etanol residual que ha conseguido la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas, se recoge una alícuota de 30 mL como se muestra en la figura 7, para análisis posteriores de polifenoles totales, y desechándose el resto. La parte sólida, la cebada, se secó en una estufa a 70°C durante 12h,
- viii) Luego se le aplicó una tercera molienda durante 20 segundos, para con ello homogeneizar y eliminar los grumos provocados por la combinación calor-humedad. Esta operación se realizó con el molinillo doméstico cuyas características se encuentran en el punto (4.2.1),
- ix) Después se pesaron los 20g de cebada necesarios para emplear en cada experimento y con ello poder realizar la extracción de los  $\beta$ -glucanos.
- x) Inmediatamente se realizó la extracción de los  $\beta$ -glucanos con la técnica de ultrasonidos como se explica en el 4.4,
- xi) Finalmente se separó la cebada de los  $\beta$ -glucanos a través de centrifugación consiguiéndose así dos alícuotas de 30 mL de la disolución para posteriormente analizarles el peso molecular como se indica en punto 4.4.



Figura 7. Etanol residual después de la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas.

#### 4.4. Extracción.

Por el momento no existe una metodología rápida que pueda comprobar la eficacia de los procedimientos utilizados para inactivar las  $\beta$ -glucanasas. Por lo tanto, para saber si estas enzimas han sido inactivadas o no resulta imprescindible efectuar una extracción de los  $\beta$ -glucanos, para analizarles el peso molecular tras su extracción. Así mismo, si se ha conseguido la inactivación enzimática el peso molecular se incrementa. De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis se evaluará la eficacia del procedimiento de inactivación de las  $\beta$ -glucanasas, siendo más eficaz cuanto más elevado sea el peso molecular del  $\beta$ -glucano extraído. De esta manera se comparará la eficacia de los diferentes procedimientos con microondas como se explica en el plan experimental expuesto en la tabla 4 comparando el peso molecular de los concentrados de  $\beta$ -glucanos extraídos procedentes de cebada pretratada. A continuación se detalla el tipo de técnica utilizada para realizar la extracción  $\beta$ -glucanos:

La extracción de los  $\beta$ -glucanos a partir de la cebada pretratada se llevó a cabo con la técnica de ultrasonidos, la cual fue desarrollada en la tesis doctoral denominada “Estudios para la intensificación del proceso de producción de  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular a partir de cereal” (Benito-Román. 2013). Por lo tanto, todos los parámetros y condiciones de trabajo ya estaban establecidas por dicho autor.

El proceso de extracción se llevó a cabo a 52°C empleando un sonicador (UP400S, Hielscher) con un sonotrodo de 22 mm fabricado en titanio. Las condiciones de operación fueron determinadas en el trabajo de tesis anteriormente citado y son las que se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Variables de operación del equipo de ultrasonidos.

Amplitud de oscilación (%)	Tiempo de operación (min)	Ciclo (-)
80	7,36	0,8 (Discontinuo)

La relación cebada:etanol empleada en cada experimento fue 1:10 (20 gramos de cebada por 200 mL de agua destilada), la cual se precalentó en el microondas a máxima potencia durante un minuto hasta alcanzar una temperatura de 50°C.

Una vez obtenida la disolución se centrifugó (Thermo Scientific, Alemania) a 5500 rpm durante 9 min, y se consiguió la separación de la parte sólida de la líquida. El extracto líquido obtenido se dividió en 2 alícuotas de 30mL cada una empleadas para analizar el peso molecular del  $\beta$ -glucano extraído.

## 4.5. Análisis

### 4.5.1. Peso molecular (GPC)

El peso molecular del  $\beta$ -glucano se determinó por cromatografía de exclusión molecular (GPC) usando un sistema cromatográfico que consistía en una bomba isocrática (Waters 1515), un inyector automático (Waters 717), una precolumna (Shodex SB-G), una columna de GPC (Shodex SB804HQ) y un detector de índice de refracción diferencial (Waters 410). La columna se mantuvo a 35 °C, y el caudal de la fase móvil (0,1 M  $\text{NaNO}_3$  + 0,02% de  $\text{NaN}_3$ ) se fijó en  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Además se utilizaron patrones de polulano (P-82) de Shodex en el rango de 5,9 a 708 kDa. Los cromatogramas obtenidos se procesaron con el software Breeze de Waters.

Los resultados de análisis de cada experimento se expresarán en peso molecular promediado en peso, lo cual se hace calculando una media ponderada de los  $\beta$ -glucanos que hay en la distribución, en lo que se tiene en cuenta la cantidad presente de estos de cada peso molecular.

#### 4.5.2. Fenólicos totales

La concentración total de compuestos fenólicos presentes en el etanol residual recogido tras la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas se determinó por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu (Singleton et al., 1965). Se procedió a la preparación de las muestras como se indica a continuación:

- i. Se escogieron 40  $\mu$ L de las diluciones apropiadas de muestras y/o muestras en blanco o de calibración),
- ii. Se adicionaron a 3600  $\mu$ L de agua destilada y se oxidaron con 200  $\mu$ L de reactivo de Folin Ciocalteu, (después se agitaron bien las muestras para homogeneizar los reactivos),
- iii. La neutralización de la reacción fue llevada a cabo con 600  $\mu$ L de una solución saturada de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) realizándose antes de que pasaran 8 minutos desde la adicción del reactivo Folin,
- iv. Por último, se dejan las muestras incubando a 40°C durante 30 minutos en una placa calefactora con baño controlado con papel de aluminio para reducir la exposición a la luz. Una vez terminada esta última operación se procede a la medición de los polifenoles totales a cada experimento como indica a continuación:

La recta de calibrado se hizo con ácido gálico con una concentración entre 0-900 ppm (0, 112,5, 225, 450, 675, 900), mezcla etanol: agua pH=1 al 50% v/v, procediendo después a realizar la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 763 nm. Esto se hizo con un Espectrofotómetro Ultravioleta Visible (UV-2550, PC, Shimadzu).



## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Procedimiento convencional**

En el desarrollo de este trabajo se utilizó como referencia para inactivar las enzimas  $\beta$ -glucanasas el procedimiento convencional. Con este procedimiento se obtuvo un peso molecular de los promedio de los  $\beta$ -glucanos extraídos de 463 kDa, conseguidos mediante las condiciones experimentales descritas más adelante en la tabla 6 del punto 5.2. De acuerdo con un trabajo previo realizado por el Grupo de Proceso a Alta presión de la Universidad de Valladolid (no publicado), la no realización de este pretratamiento para inactivar enzimas  $\beta$ -glucanasas dio lugar a un  $\beta$ -glucano extraído con peso molecular inferior a 30 kDa. Además se obtuvieron los polifenoles totales presentes en el etanol residual dando un valor de 3,04 mg EAG (equivalentes de ácido gálico) /g de cebada.

Estos resultados nos sirven para evaluar el efecto del procedimiento alternativo con microondas desarrollado en este trabajo y de esta manera poder evaluar la efectividad de este en la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas y el de los polifenoles totales presentes en el etanol residual.

### **5.2. Procedimiento Alternativo con la aplicación del Microondas**

La tabla 6 mostrada a continuación se recoge los resultados correspondientes a los experimentos llevados a cabo en este trabajo, los cuales serán estudiados más adelante en los puntos 5.2.1 y 5.2.2. También se incluirán los resultados obtenidos en el procedimiento convencional para facilitar así la comparación de los dos procedimientos (el convencional y el alternativo).

Tabla 6. Resultados de los experimentos realizados en este trabajo.

Nº Exp.	s:d (-)	Tiempo (min)	Potencia (W)	Energía (kJ)	Mw (kDa)	TP (mg EAG/g)
1	4	5	440	132	396	3,30
2	8	5	440	132	316	3,85
3	4	15	440	396	357	2,01
4	8	15	440	396	351	2,68
5	4	10	250	150	386	2,48
6	8	10	250	150	372	5,07
7	4	10	600	360	449	4,32
8	8	10	600	360	364	5,83
9	6	5	250	75	399	6,43
10	6	15	250	225	319	5,55
11	6	5	600	180	336	4,45
12	6	15	600	540	371	5,92
13	6	10	440	264	342	4,55
14	6	10	440	264	346	5,00
15	6	10	440	264	379	4,62
16	6	10	440	264	349	4,17
<b>Convencional</b>	6	120	132,5	954	463	3,04

### 5.2.1. Peso Molecular (Mw) de los $\beta$ -glucanos extraídos

Los resultados mostrados en la tabla 6 muestran que los tratamientos con relación cebada:etanol baja (1:4), tiempos de aplicación bajos (5-10 minutos) y alta potencia (600W) logran resultados significativos en la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas. En ese contexto se puede observar que el experimento nº 7 es el que mejor efectividad presenta ya que alcanza un peso molecular de los  $\beta$ -glucanos de 449 kDa con unas condiciones de operación relación cebada:etanol (1:4), potencia (600W) y un tiempo de (10 minutos). Así mismo, cabe destacar que el experimento nº 9 es el más efectivo en cuanto a ahorro de energía (75 kJ), disminución de tiempo de inactivación de las  $\beta$ -glucanasas y obtención de  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular se refiere (399 kDa) consiguiendo estos objetivos con las variables de operación siguientes: relación cebada:etanol (1:6), una potencia de (250W) y un tiempo de aplicación de (5 minutos).

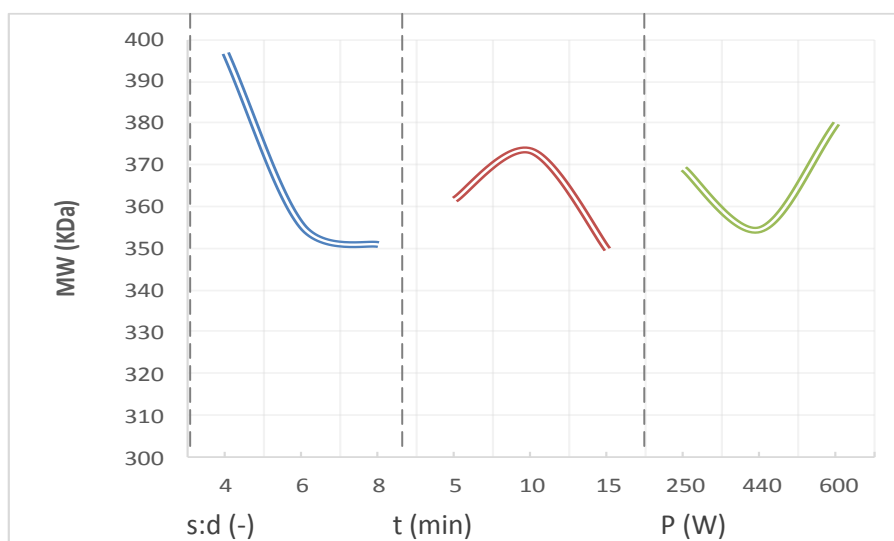
Por otro lado, los peores resultados se consiguieron con los experimentos nº 2 y nº 10 dando  $\beta$ -glucanos con pesos moleculares de 316 y 319 kDa respectivamente y con unas condiciones experimentales de: relación cebada:etanol de 1:8 y 1:6 (m/v), una potencia de 440 y 250W y tiempos de aplicación de las microondas de 5 y 15 minutos sucesivamente. Del mismo modo le sigue con una mala valoración el experimento nº 10, el cual presenta un peso molecular de los  $\beta$ -glucanos de 319 kDa trabajando con unas condiciones de operación de: relación cebada:etanol (1:6), potencia (250W) y un tiempo de (15 minutos).

Los resultados de las 4 repeticiones del punto central realizadas con las siguientes condiciones: relación cebada:etanol 1:6 (m/v), tiempo de tratamiento de las microondas de 10 minutos y una potencia de funcionamiento de 440W no ofrecen diferencias en el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos, obteniendo unos pesos moleculares de 342, 346, 349 y 379 kDa respectivamente, lo que significa que existe repetibilidad de los experimentos.

Visto lo expresado en el segundo párrafo del presente punto (5.2.1.) se aprecia que a medida que se incrementa el volumen de etanol (1:8) y el tiempo de aplicación (15 min), el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos tiende a disminuir, la causa podría deberse a que los  $\beta$ -glucanos se degradan con el aumento del tiempo de aplicación de las microondas, y por la presencia de etanol. Para comprobar estas hipótesis sería necesario realizar futuros trabajos que permitan dar una explicación clara de esto.

Si se comparan los pesos moleculares de los  $\beta$ -glucanos obtenidos con las condiciones experimentales más favorables del procedimiento alternativo frente a los conseguidos con el procedimiento convencional se puede apreciar que no existe mucha diferencia entre un proceso y otro. Con el primero se consiguen pesos moleculares de 449 kDa con unas condiciones experimentales de: relación cebada:etanol de 1:4 m/v, tiempo de aplicación de las microondas de 10 minutos y una potencia de 600W, mientras que con el segundo se obtienen pesos moleculares de 463 kDa utilizando una relación cebada:etanol de 1:6 m/v, un tiempo de ebullición de 120 minutos y una potencia de 132,5W. Esto hace comprobar que con el procedimiento alternativo se consiguen pesos moleculares similares a los obtenidos con el procedimiento convencional, empleando menos tiempo y menos energía.

En la figura 8 mostrada a continuación se puede observar las tendencias del peso molecular frente a las condiciones experimentales seguidas en este trabajo.



*Figura 8. Efectos principales del peso molecular de los  $\beta$ -glucanos promediado en peso frente a las diferentes condiciones experimentales.*

Se observa que cuando se aumenta s:d (-) el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos tiende a disminuir. Igualmente llega a alcanza valores máximos con la aplicación de tiempos intermedios. No obstante, los resultados más desfavorables se consiguen con la aplicación de potencias intermedias, obteniendo los mejores valores con la aplicación de las potencias mínima y máxima.

En la figura 10 se muestra el efecto que tiene la relación cebada:etanol en el desarrollo del plan experimental. Para ello se seleccionaron 4 tratamientos con diferente relación cebada:etanol: 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10 (m/v) aplicándoles a todos un mismo tiempo de trabajo (5 minutos) y una misma potencia de aplicación (440W) para ver como influía la relación cebada:etanol en la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas. Esto se hace porque la relación cebada:etanol es la variable de operación estudiada más significativa, conforme a la figura 8.

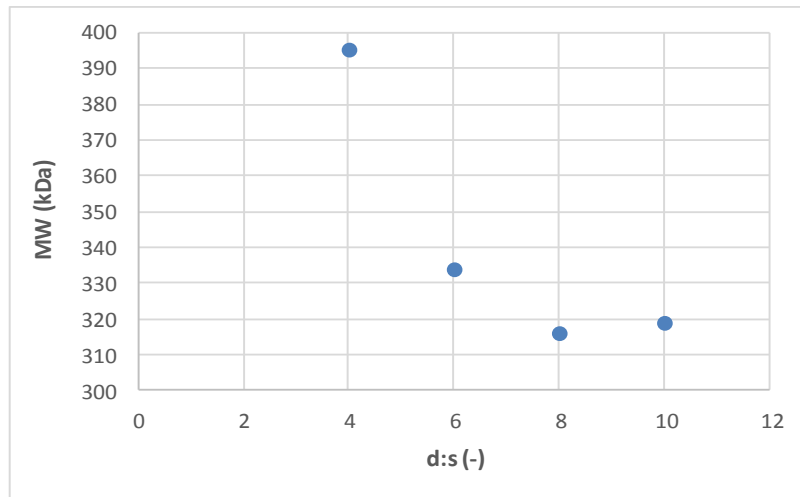


Figura 9. Efecto relación cebada:etanol en el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos.

De acuerdo a lo mostrado en la figura anterior se observa que cuanto más se aumenta la relación cebada:etanol más tiende a disminuir el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos. Sin embargo, se puede ver que cuanto menor es la relación cebada:etanol mayores pesos moleculares de los  $\beta$ -glucanos se alcanzan. Esto ocurre porque al haber más masa molecular en el sistema se necesita más energía para poder efectuar el calentamiento de la misma.

Por otra parte, en la figura 10 se muestra una comparativa del peso molecular frente a la energía consumida en los experimentos realizados en este trabajo, tanto con el nuevo procedimiento como con el convencional, cuyos resultados se pueden consultar en la tabla 6 del apartado 5.2.

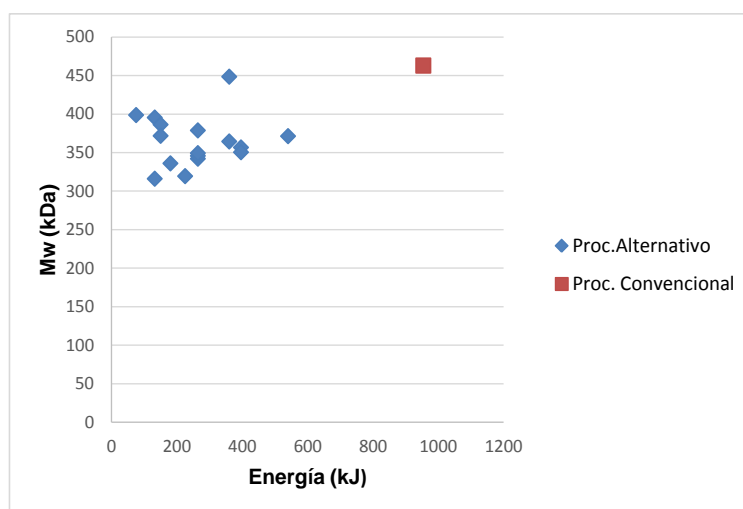


Figura 10. Comparativa de Energía consumida (kJ) frente al peso molecular de los  $\beta$ -glucanos.

Como se puede observar en la figura anterior, la distribución de la mayoría de los experimentos se encuentran consumen una cantidad de energía por debajo de los 400 kJ frente al peso molecular de los  $\beta$ -glucanos extraídos, mientras que el consumo energético del procedimiento convencional se encuentra por encima de los 900 kJ.

Por consiguiente, se observa que no hay un efecto significativo entre la alcanzar  $\beta$ -glucanos de alto peso molecular y el gasto de energía, debido a que como se puede ver en esta figura, con el procedimiento convencional se obtienen  $\beta$ -glucanos con peso por encima de 460 kDa y un consumo de energía por encima de los 900 kJ, mientras que con el procedimiento alternativo se consiguen pesos moleculares de los  $\beta$ -glucanos extraídos próximos a 450 kDa con un consumo de energía próximo a los 400 kJ, es decir, 2 veces menor que con el procedimiento anterior.

En resumen, según los resultados anteriormente estudiados para conseguir una inactivación eficaz de las  $\beta$ -glucanasas se recomienda trabajar con las siguientes condiciones experimentales desarrolladas en el presente trabajo:

**Opción 1:** Relación cebada etanol 1:4 (m/v), tiempo de aplicación de las microondas de 10 minutos y una potencia de 600W, consiguiéndose  $\beta$ -glucanos con pesos moleculares de 449 kDa y un empleo de energía de 360 kJ.

**Opción 2:** Relación cebada:etanol 1:6 (m/v), tiempo de tratamiento de las microondas de 5 minutos y una potencia de 250W, obteniéndose  $\beta$ -glucanos con pesos moleculares de 399 kDa y un empleo de energía de 75 kJ.

### 5.2.2. Fenólicos Totales

El análisis de los fenólicos totales en este estudio es un objetivo secundario ya que se persigue minimizar el contenido fenólico presente en el etanol residual que queda tras la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas.

Según los resultados mostrados en la tabla 6 del punto 5.2. los mejores experimentos son aquellos con menor contenido en polifenoles totales (TP mg EAG/g de cebada) correspondiendo con los experimentos nº 3 y 5, los cuales presentan valores de 2,01 y 2,48 mg EAG/g de cebada, obtenidos con las condiciones experimentales de: relación

cebada:etanol (1:4), tiempo de aplicación de las microondas de 15 y 10 minutos, y potencia de 440 y 250W respectivamente. En ese mismo orden, los tres experimentos más desfavorables del estudio corresponden a los ensayos nº 8, 9 y 12, realizados con unas condiciones experimentales de: una relación cebada:etanol de 1:8, 1:6 y 1:6), tiempos de tratamiento de 10, 5 y 15 minutos, y con unas potencias de 600, 250 y 600W sucesivamente.

En sentido general, la mayor parte de los experimentos han dado resultados desfavorables, ya que los valores se encuentran dentro del rango de (3,85-6,43 mg EAG/g de cebada) por lo son elevados con respecto al obtenido con el procedimiento convencional (3,04 mg EAG/g de cebada). En cierto modo este resultado era esperable ya que es común emplear procesos de extracción con disolventes, tanto acuosos como orgánicos, asistida por microondas (MAE) para aumentar la eficiencia de extracción de antioxidantes, tal como se recoge en la bibliografía (Sólyom et al., 2014 and Rodríguez-Rojo et al., 2012).

En cuanto a las 4 repeticiones del punto central realizadas a diferencia de cómo ocurría en el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos extraídos en este caso si que existen diferencias en los resultados de los fenólicos totales entre unos experimentos y otros obteniéndose resultados de 4,55, 5,00, 4,17 y 4,62 mg EAG/g de cebada con las mismas condiciones de realización de: relación cebada:etanol de 1:6 (m/v), un tiempo de aplicación del microondas de 10 minutos y una potencia de trabajo de 440W.

La figura 11 muestra más adelante los resultados del efecto de las diferentes condiciones experimentales en el contenido de polifenoles totales.

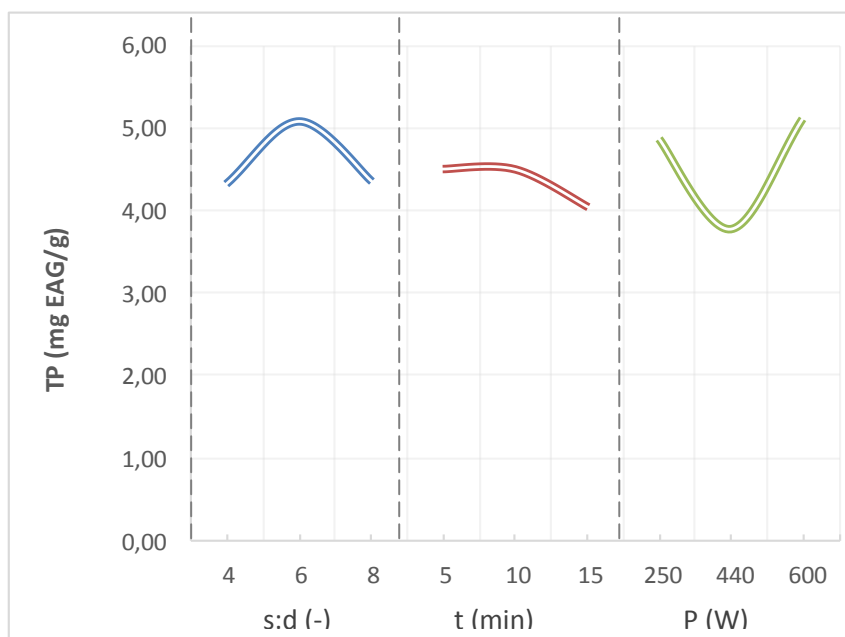


Figura 11. Efectos principales del contenido en polifenoles totales frente a las diferentes condiciones experimentales seguidas en este trabajo.

De acuerdo con los resultados expuestos en la figura anteriormente se puede ver que los resultados más favorables se obtienen con la menor relación cebada:etanol, observándose además buenos resultados con la máxima relación cebada:etanol. En cambio, el máximo contenido en polifenoles totales presente en el etanol residual proveniente de la inactivación de las  $\beta$ -glucanasas se consigue se agrega una relación cebada:etanol intermedia. Por otra parte, se puede observar que cuando se aplica mayor tiempo de tratamiento con las microondas se alcanzan mejores resultados, siendo menor cuando se aplican tiempos bajos y medios. No obstante, cuando se emplean potencias medias se logra obtener los contenidos fenólicos más favorables comparados cuando se aplican otras potencias, debido a una degradación de estos compuestos.

A continuación, en la figura 12 se muestra una comparativa de los polifenoles totales frente a la energía consumida en los experimentos realizados en este trabajo, tanto con el nuevo procedimiento como con el convencional, cuyos resultados se pueden consultar en la tabla 6 del apartado 5.2.



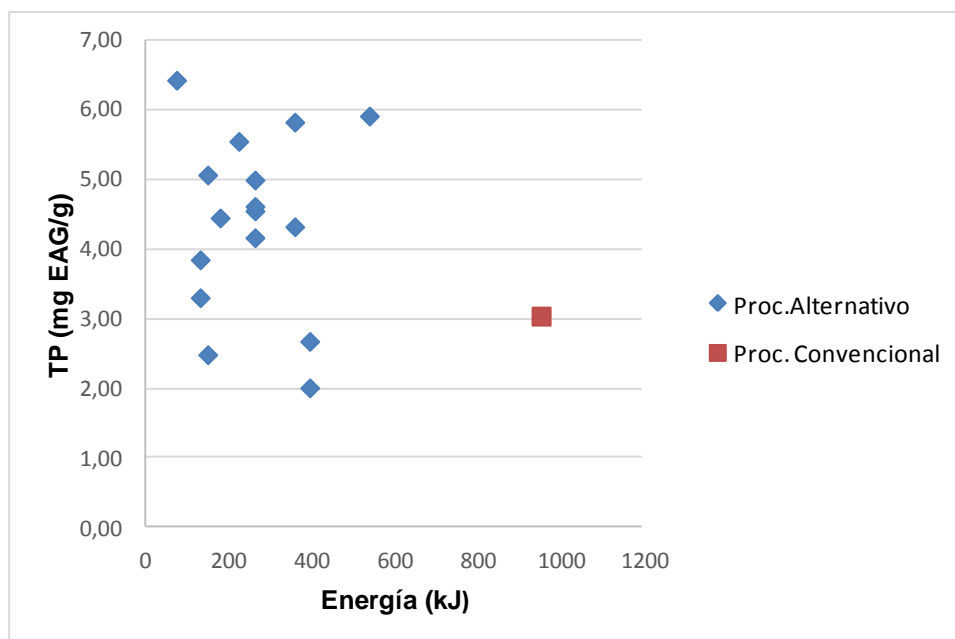


Figura 12. Representación del contenido en polifenoles totales frente a la energía consumida en los experimentos con el procedimiento convencional y alternativo.

Igualmente como se observó para el peso molecular de los  $\beta$ -glucanos extraídos, en este caso tampoco existe una relación directa entre la cantidad de compuestos fenólicos extraídos y el consumo energético empleado mediante la aplicación del procedimiento alternativo. También se puede apreciar en la figura que con el procedimiento convencional se obtienen igual o más polifenoles que con algunos de los experimentos realizados con el procedimiento alternativo, consumiendo más del doble de la energía que se consume con el nuevo proceso.

También se nota claramente que los experimentos que tienen menor contenido fenólico no son ni lo que más ni menos consumen, sino que están situados en puntos de consumo de energía medios con respecto al convencional y al resto de experimentos del procedimiento basado con la aplicación del microondas.

## 6. CONCLUSIONES

El empleo del microondas como procedimiento alternativo para inactivar la actividad enzimática de las  $\beta$ -glucanasas ha logrado inactivar dichas enzimas, reducir el tiempo de operación comparado con el procedimiento convencional (de 120 a 10 minutos) y en cuanto al consumo energético (de 954 a 389 kJ). Así mismo se consiguió alcanzar pesos moleculares de los  $\beta$ -glucanos de 449 kDa frente a 463 kDa obtenido con el proceso convencional.

Los resultados correspondientes a los polifenoles totales se concluyó valorando que con el procedimiento alternativo se consiguieron contenido menores que el que se obtiene con el procedimiento convencional (2,01 frente a 3,04 a mg EAG/g respectivamente)

Las variables de operación más favorables en inactivar las  $\beta$ -glucanasas fueron:

- 1) Relación cebada:etanol de 1:4 (m/v), tiempo de aplicación de 10 minutos y una potencia de calentamiento de (600W), obteniéndose un peso molecular de los  $\beta$ -glucanos extraídos de 449 kDa y una energía empleada de 360 kJ.
- 2) Relación cebada:etanol (1:6), tiempo (5 minutos) y potencia (250W) con peso molecular de 399 kDa y una energía consumida de 75 kJ.

Mientras que según los resultados, las condiciones experimentales que mejor contenido en polifenoles totales proporcionan son:

- 1) Relación cebada:etanol (1:4), tiempo (15 minutos) y potencia (600W) dando un contenido en polifenoles totales de 2,01 mg EAG/g de cebada y un consumo de energía de 396 kJ.
- 2) Relación cebada:etanol (1:4), tiempo (10 minutos) y potencia (250W) dando un contenido en polifenoles totales de 2,48 mg EAG/g de cebada y un consumo energético de 150 kJ.

A la vista de los resultados, se puede decir que los concentrados de  $\beta$ -glucanos obtenidos a través del tratamiento de inactivación con las microondas pueden ser

incluidos en las formulaciones de alimentos funcionales, lo que le confiere un interés tecnológico además del nutritivo y de beneficio para la salud ya reconocido, entre otros, por la EFSA y la FDA.

## **7. AGRADECIMIENTOS**

Óscar Benito, Soraya Rodríguez y M<sup>a</sup> José Cocero por la ayuda prestada para el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster y a la elaboración de esta memoria.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Baik B.K and Ullrich S.E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* 48, 233-242.

Banegas JR.; Graciani A.; Guallar-Castillón P.; León-Muñoz LM.; Gutiérrez-Fisac JL.; López-García E.; Otero-Rodríguez A.; Regidor E.; Taboada JM.; Aguilera MT.; Villar F.; Zuluaga MC.; Rodríguez-Artalejo F. (2011). Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA). Madrid: Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad Autónoma de Madrid.

Benito-Román O. (2011). Optimization of the  $\beta$ -glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science* 53, 173-276.

Benito-Román Ó.; Alonso E.; Cocero M.J. (2013). Ultrasound assisted extraction of  $\beta$ -glucans from barley. *LWT-Food Science and Technology* 50, 57-63.

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. (2011). 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. *EFSA Journal* 2011;9(6):2207 [21 pp.].

Food and Drug Administration (FDA). (1997). Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women. *Feb;16(1):46-51.*

Irfan I. (1998). Proceeding of the 7th International Working Conference on Stored product Protection.

Kaasová J.; Kadlec P.; Bubnik Z.; Hubáèková B.; and Pøíhoda J. (2002): Microwave treatment of rice. Physical and Chemical Changes during Microwave Drying of Rice. *Chemical Papers* 56 (1): 32-35.

Kaasová J.; Kadlec P.; Bubnik Z.; Pour V. (2001). Microwave treatment of rice. Czech Journal Food Science Impact Factor 19, 62-66.

Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G. (2007). Molecular aspects of cereal beta -glucan functionality: physical properties, technological applications and physiological effects. Journal of Cereal Science 46(2): 101-118.

Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. (2011). Agricultura y Ganadería.

Rodríguez-Rojo S.; Visentin A.; Maestri D.; Cocero J.M. (2012), Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, J. of Food Engineering Journal of Food Engineering 109 (1) 2012, 98-103.

Ronda F.; Oliete B.; Gómez M.; Caballero P.A.; Pando V. (2011). Rheological study of layer cake batters made with soybean protein isolate and different starch sources. Journal of Food Engineering 102, 272–277.

Singleton V.L and Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Viticult. 16:144-58.

Sólyom K.; Álvarez A.; Cocero M.J.; Mato R.B. (2014). Microwave assisted extraction of grape marc: comparison to conventional process and economic evaluation., in Proceedings of the 10th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries RRB-10, Valladolid, Spain.

Zhong Y.; Zongcai T.; Chengmei L.; Wei L.; Xingfeng X.; Yimin A.; Weilin L.; Jun C.; Jianyong W. Effect of microwave irradiation on composition, structure and properties of rice (*Oryza sativa* L.) with different milling degrees. Journal of Cereal Science 58 (2013) 228-233.

## ANEXO I: Tablas del Análisis de Varianza realizadas en los experimentos del trabajo.

Tabla 11. ANOVA (análisis de varianza) para el análisis del peso molecular calculada con Statgraphics Centurion XVI.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:s:d	4278,13	1	4278,13	15,71	0,0074
B:tiempo	300,125	1	300,125	1,10	0,3342
C:potencia	242,0	1	242,0	0,89	0,3822
AA	1406,25	1	1406,25	5,16	0,0634
AB	1369,0	1	1369,0	5,03	0,0661
AC	1260,25	1	1260,25	4,63	0,0750
BB	1260,25	1	1260,25	4,63	0,0750
BC	3306,25	1	3306,25	12,14	0,0131
CC	1600,0	1	1600,0	5,88	0,0516
Error total	1633,75	6	272,292		
Total (corr.)	16656,0	15			

Tabla 12. ANOVA(análisis de varianza) para el análisis de los fenólicos totales Statgraphics Centurion XVI.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:s:d	3,5378	1	3,5378	4,46	0,0792
B:tiempo	0,437113	1	0,437113	0,55	0,4860
C:potencia	0,122513	1	0,122513	0,15	0,7080
AA	7,77016	1	7,77016	9,79	0,0204
AB	0,0036	1	0,0036	0,00	0,9485
AC	0,2916	1	0,2916	0,37	0,5666
BB	0,213906	1	0,213906	0,27	0,6222
BC	1,38062	1	1,38062	1,74	0,2353
CC	6,08856	1	6,08856	7,67	0,0324
Error total	4,76202	6	0,793671		
Total (corr.)	24,6079	15			