

## USO DE ENZIMAS PURIFICADAS EN LA INDUSTRIA CERVECERA <sup>1</sup>

Por: M. J. RIGONE DE PRIZT, P. ROSELL y R. SOLANES <sup>2</sup>

### SUMMARY

*A comparative study is made between the traditional process of beer elaboration and other procedures in which the malt is replaced by barley (partially); in this case, an enzimaite complex named CONVERSE is added.*

*This complex is rich in proteases and carbohydrases. Its efficiency as replacer of malt's natural enzymes is established by the analysis of the products originated by its hydrolytic action.*

*Consequently, sugars and amino acids were analyzed, using for the first ones methods of qualitative and quantitative paper chromatography. As for amino acids, the method used was that of ion exchange resin, followed by colorimetric reaction and reading in the spectrophotometer at 663 millimicrons for all of them, with the exception of proline, which was read at 440 millimicrons. Paper chromatography was also used for amino acids; it proved to be applicable for beers, but not for must, as these have an excessively sugary nature. The analytic data permit us to deduce that the use of enzymes or enzyme complexes in industry is perfectly feasible. In the case of beer, good results seem to depend on the percentage of the substitute, which may be above 25 % and below 5J %. To give more exact figures, more coction should be done.*

### INTRODUCCION

En "Estudes sur la biere" (1) Pasteur menciona que existen documentos —Teofrasto por ej.— que llaman a la cerveza "vin d'orge". White (2), hace remontar sus orígenes a muy primitivos egipcios. Es decir que como el vino, la cerveza es una bebida —en este caso ligeramente alcohólica— de naturaleza vegetal, cuyos orígenes se pierden en los tiempos.

La industria respectiva se apoya, en lo que a materia prima se refiere, en el uso de la cebada llamada "cervecera", con la cual, mediante el simple proceso de germinación se obtiene el grano de malta,

1 Trabajo subsidiado por Cervecería y Maltería de Cuyo.

2 Ing. Agr. Profesora de la Cátedra de Microbiología e Ings. Agróns. Investigadores de la Cátedra de Microbiología.

Dicho simple proceso de germinación, en la gran industria exige una serie de precauciones y cuidados que lo hacen largo y costoso. Además merece también una salvedad la de cebada llamada "cervecera". En efecto no se trata de una especie o variedad sino de una serie de variedades de dos hileras, que en nuestro país —siguiendo la tradición europea— se designan como cerveceras. En Estados Unidos, en cambio, se usan para esta industria, también cebadas de 6 hileras (3, 7, 8).

Uno de los factores importantes en la calidad cervecera de las cebadas, es el porcentaje de proteínas, que en Europa, en los lugares que usan únicamente malta en la elaboración, no debe pasar del 11 %, mientras que entre nosotros con una legislación más elástica en cuanto a materia prima, como ocurre con la mayoría de los países productores, se puede llegar al 15% (4). Por consiguiente no es este un factor que preocupe demasiado. Si interesan, entre nosotros, los demás factores de calidad, que van desde el color y olor del grano (5, 6, 7), hasta los porcentajes de sus otros componentes, como hidratos de carbono. Hay que tener en cuenta que la cebada es hoy, en nuestro país, un cultivo menos redituable que el de trigo, con el cual puede competir por la época de siembra, y en consecuencia no es de extrañar, que en buena medida, se haya desplazado, en la pampa húmeda, hacia el oeste, hacia tierras más deficientes y en especial a zonas donde las lluvias son factor limitante. De allí la inseguridad de cosecha y en consecuencia las oscilaciones en la producción, los problemas de calidad, etc.

Para el año 1967, publicaciones como IDIA del INTA (8, 9) estiman una superficie de aproximadamente 900.000 Has. con una producción de alrededor del millón de toneladas. La relación pastoreo-grano se considera de 1/7 y el grano tiene como uno de sus destinatarios el malteado (sg. las publicaciones citadas, se estiman como necesarias para el año 1970, 200.000 toneladas), y éste a la industria cervecera local.

La industria de la malta se estableció en el país hacia 1918. En 1940 ya no se importó más malta y se empezó a exportar especialmente a Brasil e Italia (aproximadamente 15.000 toneladas).

Si bien ya no se importa malta, en los últimos años se importó cebada de países limítrofes, como Chile (sg. informe de Cervecería y Maltería de Cuyo). Esto se debe por una parte a los problemas que plantea el cultivo en sí (los ya apuntados: inseguridad de cosecha y de calidad) y el aumento de la demanda. En 1951/52 habíamos llegado a un consumo de cerveza de 22 litros "per cápita" (Alemania Occ. 127, Bélgica 122 (10); en el 63/64 bajó a 7 litros y desde 1965 va en aumento.

En el país hay 5 malterías, de ellas 4 son también cervecerías, como las de Cuyo y San Juan. Hay un total de 9 cervecerías. En el cultivo, el primer lugar lo ocupa la provincia de Buenos Aires

con más de la mitad del total. Le siguen La Pampa y Córdoba con algo más de 100.000 y 80.000 Has. cultivadas respectivamente. Luego vienen Santa Fe con algo más de 14.000 y Mendoza con 2.819 Has. Menos de 1.000 Has. tienen San Luis y Entre Ríos. Hay que destacar que la cebada de la Provincia de Mendoza se cultiva con riego artificial y que en las fábricas de la región se la prefiere a las de la zona pampeana por su calidad. Pero para la provincia es también un cultivo poco redituable por el costo del riego.

La circunstancia de contar en la zona con dos importantes establecimientos industriales, hace necesario colaborar en el esclarecimiento de los problemas técnicos que las mismas plantean. En el presente caso se trata de cotejar el método tradicional de malteado con el uso de preparados enzimáticos que tienen análoga finalidad: la hidrólisis de polímeros que van a constituir el sustrato fermentescible de la levadura y a la vez el aporte de los factores de crecimiento, indispensables para la proliferación de la misma.

#### ANTECEDENTES

La alta tecnología de nuestros días, reconoce varios hitos. Desde el punto de vista de la fermentación y conservación del producto, las bases se dieron en el texto, clásico hoy, ya citado de Pasteur. Los aspectos restantes de la elaboración fueron cubiertos entre otros, por Petit P. (11), en Francia; Wührer (12), en Italia; de Clerck J. en Alemania (13).

Para la determinación de la calidad cercevera de las cebadas, en especial, merecen citarse los trabajos de Anderson, Sallans, Meredith y Bendelow, publicados en *Canadian Journal Research* y en *Can. J. of Agric. Science* (14). Uno de estos autores Meredith en colaboración con Bass (15) estudió las enzimas que degradan las gomas de la cebada, demostrando la relación entre la composición de las mismas, la actividad citolítica y la calidad de la malta elaborada con dicha cebada.

Los carbohidratos de las gramíneas han sido estudiados, entre ellos, por Gilles y colaboradores (16), quienes encuentran además de hexosas, arabinosa y xilosa. La composición de las proteínas en gramíneas ha sido estudiada por cromatografía por Coates (17) con DEAE-celulosa y la actividad proteolítica de la malta durante la germinación y elaboración del mosto por De Clerck y colaboradores (18). Un estudio detallado de los amino-ácidos contenidos en cebada es el de Taira (19), usa método microbiológico para su determinación; mediante cepas de *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* llega a determinar 16 amino-ácidos, siendo el triptofano el que encuentra en menor proporción: 1,4% del total y glutámico y prolina los que están en mayor proporción: 22,4% y 14,3%, respectivamente,

En 1959, Lautenbach y West (20) estudiaron la sustitución de malta por enzimas comerciales: los mejores resultados los obtuvieron con el uso de un 20% de alfa-amilasa y un 80% de malta diastasa. Este trabajo lo hicieron extensivo a maíz y demostraron un mayor desdoblamiento cuando se usaban enzimas.

En los últimos años, del 66 en adelante, son varios los trabajos que se han llevado a cabo tratando de reemplazar la malta por el uso de enzimas. Wieg (21) cita varios de dichos estudios, y describe un método de reemplazo parcial de malta por enzimas. Se trata de un procedimiento que representa ventajas desde el punto de vista económico. Su aplicación es perfectamente viable en nuestro país, ya que nuestra legislación es más flexible que en algunos países del viejo mundo (Alemania por ejemplo), pues entre nosotros se exige solamente un 70 % de malta y por el 30 % restante se usan materias azucaradas diversas y aún sémolas u otros sucedáneos.

Hay que tener en cuenta que la cebada no malteada, contiene suficiente beta-amilasa, para transformar el almidón en azúcar fermentescible, pero dicha transformación es imposible, dado que carece por completo de alfa-amilasa y las enzimas proteolíticas son también insuficientes para el desdoblamiento de las respectivas proteínas. En consecuencia, los procesos de proteólisis y sacarificación (donde trabajan complejos enzimáticos), se posibilitan, en la fabricación de la cerveza, con el uso de malta.

Su finalidad —conocida desde antiguo— es entonces suplementar el almidón de la cebada con las enzimas de que éste carece (caso de la alfa-amilasa) y aumentar la dosis de las insuficientes (caso de las proteinasas).

Como ya se expresó, algunos países europeos usan únicamente malta. Hoy algunos proponen reemplazar parcialmente la falta por complejos enzimáticos, pudiéndose, en consecuencia, usar granos —cebada, arroz, maíz, etc.— en lugar de malta.

El trabajo de Wieg demuestra la correspondencia entre el uso de malta y su reemplazo parcial, con cebada (usando en este caso enzimas), no sólo por la comparación de los caracteres organolépticos sino por análisis de los amino-ácidos que constituyen el mosto obtenido con los distintos tratamientos, de los azúcares del mismo, de los extractos, etc.

Wieg trabajó con mostos de hasta 85 % de reemplazo de malta por cebada, y usó además de cebada cervecera también cebada forrajera. Llega a la conclusión que para obtener el mínimo de 250 mg por litro de N de alfa-aminoácidos, grado de fermentación final aparente de 75 % y demás caracteres cerveceros, hay que mantener un mínimo de malta de 15%. Los mejores resultados los obtuvo con: 25 % de malta, 20 % de maíz y 55 % de cebada. La cebada se fractura gruesa para facilitar la filtración (el rendimiento del extracto sigue siendo bueno).

Wieg sostiene que la idea del uso de enzimas en la industria no es nueva y que a pesar de los ensayos de laboratorio no se ha llevado a la escala industrial. Admite que la falta de difusión del método puede deberse a la carencia, en el mercado, de complejos enzimáticos eficientes. Este autor trabajó con Brewenzime fabricado por N. V. Chemische Fabriek Naarden, Holanda.

*Objeto del trabajo:* El presente trabajo tiene por objeto estudiar los caracteres físico-químicos y organolépticos de un ensayo a escala industrial, donde se compara el método tradicional de elaboración con malta, como es norma en la fábrica de nuestro medio: Cervecería y Maltería de Cuyo, con el de reemplazo de malta por cebada, usándose en este caso un preparado enzimático.

La finalidad del trabajo es establecer, mediante métodos analíticos rigurosos, como el de cromatografía de papel (Mc Farren) (22) y el de cromatografía de columna de resina de intercambio iónico (Moore y Stein) (25) las diferencias mínimas y más absolutas que pueden existir entre ambos procedimientos a fin de tener suficientes elementos de juicio para abonar la aplicación del método en la industria.

#### MATERIAL Y METODOS

Se usaron mostos y cervezas proporcionados por Cervecería y Maltería de Cuyo. La puesta a punto de los métodos se realizó con mostos cerveceros filtrados y sin filtrar y cervezas que se obtuvieron según los procesos normales del establecimiento.

Las determinaciones analíticas se hicieron a continuación sobre mostos y cervezas según el siguiente detalle:

Mosto 147 que se elaboró con 4.500 kg. de malta y 1.900 de Amber Brú (jarabe). Con dicho cocimiento se elaboró cerveza que se almacenó en el tanque 21.

Mosto 145 que se elaboró con 3.360 kg. de malta, 1.300 de cebada y 1.900 de Amber Brú, es decir que se hizo un reemplazo de aproximadamente 25% de malta por cebada y se usaron 1,3 kg. de Converse (complejo enzimático). La cerveza elaborada con este mosto se almacenó en el tanque 17.

Mosto 146, elaborado con 2.260 kg. de malta, 2.600 de cebada y 1.900 de Amber Brú. La cerveza elaborada con este último cocimiento se almacenó en el tanque 18 y por los datos citados se deduce que en este caso el reemplazo fue del 50 % y se usó el doble de la cantidad de enzimas, o sea 2,6kg. de Converse (lo mismo que en el caso 145, al 0,1 %).

En todos los casos el lupulado, filtrado, pasteurizado, etc., fueron los corrientes en la industria.

Como puede apreciarse el N<sup>o</sup> 147 corresponde al procedimiento tradicional en la zona y en consecuencia sirvió de patrón o contra-muestra.

Los porcentajes de 25 % y 50 % de reemplazo, se entienden sobre la malta y no sobre el total, pues en este último caso resultaban sensiblemente superiores dado que ya existe un 30 % (aproximado) del peso total que no es malta.

Los datos analíticos correspondientes a los tres cocimientos fueron:

*Cocimiento 147 - Proceso Normal.*

*Análisis del mosto.*

Extr. Balling .....	11,5 %
Atenuación óptima .....	2,9 %
Grado de fermentación .....	74,7 %
pH .....	5,30

*Análisis de la cerveza.*

P.e. ....	1,01284
Alcohol .....	4,56 cc x 100 cc
Extracto aparente .....	3,28 gr x 100 gr
Extracto real .....	4,89 gr x 100 gr
pH .....	4,15
Acidez .....	0,187 gr ác. láct. %
Proteínas .....	0,33 gr x 100 cc
Atenuación óptima .....	2,7 %
Azúcares fermentescibles .....	77,1 %
Extracto primitivo .....	11,79 % (calculado)

*Cocimiento 146 - Proceso con 50% de reemplazo de malta.*

*Análisis del mosto.*

Extr. Balling .....	11,2 %
Atenuación óptima .....	3,1 %
Grado de fermentación .....	72,3 %
pH .....	5,25

*Análisis de la cerveza.*

P. e. ....	1,00956
Alcohol .....	4,53 cc x 100cc
Extr. aparente .....	2,44 gr x 100 gr
Extr. real .....	4,20 gr x 100 gr
pH .....	4,45
Acidez .....	0,177 gr ác. láct. %
Proteínas .....	0,31 gr x 100 cc
Extr. primitivo .....	11,09 % (calculado)
Atenuación óptima .....	1,9 %
Azúcares fermentescibles .....	82,8 %

*Cocimiento 145 - Proceso con 25 % reemplazo de malta.*  
*Análisis del mosto.*

Extr. Balling .....	11,0 %
Atenuación óptima .....	2,6 %
Grado de fermentación .....	76,3 %
pH .....	5,20

*Análisis de la cerveza.*

P. e. ....	1,00872
Alcohol .....	4,60 cc x 100 cc
Etr. aparente .....	2,23 gr x 100 gr
Extr. real .....	3,97 gr. x 100 gr.
pH .....	4,25
Acidez .....	0,167 gr. ác. láct. %
Proteínas .....	0,30 gr x 100 cc
Extr. primitivo .....	10,98 % (calculado)
Atenuación óptima .....	1,8 %
Azúcares fermentescibles .....	83,6 %

MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES:

Se utilizó un sistema de separación por cromatografía sobre papel.

Las muestras fueron colocadas sobre papel WHATMAN N° 1, y se hicieron correr en forma descendente durante 48 hs con un solvente propuesto por WHISTLER (citado por BLOCK, DURRUM y ZWEIG, pág. 198, N° 24 de la bibliografía), compuesto de acetado de etilo: piridina; agua (10 : 4 : 3 v/v).

Se usó un pliego de papel para cada determinación, intercalándose entre las bandas de las muestras, bandas con manchas piloto de los azúcares a determinar, con el fin de poder ubicarlas. Las bandas piloto fueron reveladas con pulverizaciones de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  en acetona y luego con  $\text{NaOH}$  en solución alcohólica, lavadas con  $\text{NH}_3$  en solución acuosa y luego fijadas con  $\text{Na}_2\text{S}$  (24).

Las zonas correspondientes a cada azúcar de las soluciones problemas, fueron recortadas y eluidas con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, llevadas a volumen y los azúcares reductores fueron determinados sobre una alícuota con el método colorimétrico de SCHALES y SCHALES, (27) que se basa en la reducción del ferricianuro de potasio en solución alcalina, a pH controlado.

MÉTODOS USADOS PARA LA DETERMINACION DE AMINO-ACIDOS:

Los amino-ácidos fueron determinados, en las respectivas muestras, por el método de Mc FARREN (22). Se basa en la separación

cromatográfica de los amino-ácidos, por cromatografía en papel, impregnado en diferentes soluciones de buffer, de acuerdo al amino-ácido o grupo de amino-ácidos a separar; luego se hacen correr las muestras con diferentes solventes, saturados con los buffers correspondientes al del papel. El papel utilizado fue el WHATMAN N° 1.

Este método se utilizó en las muestras de cerveza pero no pudo aplicarse en los mostos, por el excesivo tenor azucarino de los mismos.

Las muestras de amino-ácidos patrones, fueron colocadas en cantidades crecientes, de modo tal de tener una escala, con el fin de poder apreciar aproximadamente las cantidades, y las del problema se intercalaron entre las mismas y también se colocaron en cantidades distintas de acuerdo a la proporción estimada de los amino-ácidos totales.

Los cromatogramas fueron revelados con solución de ninhidrina al 0.1% en alcohol butílico acuoso a la que se agrega unas gotas de colidina. Cuando los buffers que saturaban al solvente y al papel fueron alcalinos, se agregó al revelador, ácido acético, en proporción de 2%, para buffer de pH desde 7.5 a 9 y 5% para buffer de pH 9 a 12. Después de la puerización se los sometió a un suave calentamiento hasta la aparición de las manchas.

En los mostos los amino-ácidos fueron aislados y determinados usando el método de MOORE y STEIN (25). Dicho método se basa en la separación de los amino-ácidos, mediante una columna termostaticada, cargada con resina de intercambio iónico AG 50 W-X de malla 200 a 400 en la forma hidrógeno. Esta columna se equilibra con buffer de pH 2.2 y luego se coloca 5 ml de muestra con pH ajustado a 2.5 y se hace correr con buffer de pH 3.1 sometiéndoselo luego a un gradiente de pH y de salinidad por el agregado gradual de buffer a pH 5.1, además de sucesivos aumentos de temperatura.

Los eluidos de 1 ml aproximadamente fueron recibidos en tubos mediante colector de fracciones y en dichos tubos se determinaron colorimétricamente los amino-ácidos mediante la reacción de ninhidrina en solución de metilcellosolve (éter monometílico del etilenglicol) y buffer de pH 5.5 para controlar el pH de la solución. Los tubos fueron leídos en espectrofotómetro a 570 milimicrones para todos los amino-ácidos, salvo prolina, que se leyó a 440 milimicrones.

#### ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los complejos enzimáticos usados en la industria cervecera como BREWENZYM y CONVERSE, son particularmente ricos en carbohidrasas y proteasas. Por consiguiente la mejor forma de establecer la eficacia de su acción, consiste, en realizar los análisis de los respectivos desdoblamientos. Así se consideró imprescindiblemente,

para el caso de las carbohidrasas, analizar los azúcares resultantes del proceso enzimático normal y los de reemplazo, por cromatografía cuali y cuantitativamente.

En el último caso (cuantitativo), se usaron dos métodos colorimétricos, el de SCHALES y SCHALES (27), y el de NELSON (28), habiendo resultado más satisfactorio en cuanto a la reproducibilidad de datos, el de SCHALES y SCHALES, descartándose, por lo tanto el de NELSON. Los resultados se resumen en los cuadros 3 y 4.

Del análisis de dichos cuadros, se deduce que la acción enzimática es efectiva. No obstante, los azúcares totales que aparecen en el mosto, no guardan el mismo orden decreciente que en el caso de los amino ácidos. Así la depresión que se observa en el total y parciales de la muestra 145 con 25% de reemplazo, es difícil de explicar. Los análisis fueron repetidos y los resultados confirmados.

Dado que el 146 con 50% de reemplazo da cifras levemente superiores al Normal (no significativas), como se ve en el cuadro N° 4 hay que concluir, por fuerza, que el proceso enzimático mediante el uso de Converse, es efectivo en el desdoblamiento de azúcares.

El examen individual de los azúcares (si se deja de lado la glucosa, debido a que se usó, para estos cocimientos, el procedimiento corriente que agrega Amber Brú o sea un jarabe), permite ver que es altamente efectivo para maltosa, ya que las respectivas cifras son 49.4; 53.4 y 56.6 para los cocimientos Normal, con 25% de reemplazo y 50% de reemplazo, respectivamente.

En el cocimiento 145 o sea con 25% de reemplazo, no apareció maltotetraosa y en el de 50% de reemplazo solamente se detectó 4.2 contra 11.8 del procedimiento normal. En consecuencia la mayor diferencia entre el proceso Normal y los procesos mediante el agregado de enzimas, se da para este azúcar (cuadro N° 4). La maltotriosa sigue aproximadamente el mismo orden que los totales: el máximo para el de 50% de reemplazo, luego el Normal y finalmente el de 25% de reemplazo.

El análisis continuó con la determinación de amino-ácidos que se hizo por cromatografía de papel sg. Mc FARREN, (22) para las cervezas elaboradas con los mostos de cada cocimiento.

Este método no pudo aplicarse en el caso de los respectivos mostos ya que el exceso de azúcares dificultó las determinaciones.

Se hizo necesario entonces, usar un método de separación de los amino-ácidos mediante resina de intercambio iónico. Los eluidos se recogieron mediante un colector de fracciones y fueron determinados coloriméricamente sg. MOORE y STEIN (25). Los resultados se consignan en los cuadros 1 y 2 y se grafican en las láminas.

Del examen de los mismos se deduce que el mayor porcentaje de amino - ácidos totales se tiene para el proceso con 25% de reemplazo con 966.8 mg p/l; le sigue el Normal con 957.08 mg p/l pudiéndose considerar como similares ya que la diferencia es insignificante.

Si el examen se lleva sobre los amino - ácidos individualmente y no sobre los totales, se observa que la tirosina aparece únicamente en el procedimiento Normal y no se detecta en los procedimientos que agregan enzimas. La diferencia en los totales, estriba, en buena medida, en esta presencia, ya que para los amino - ácidos:

- 1 - Fenilalanina
- 2 - Asp.NH<sub>2</sub>- Glut. NH<sub>2</sub>
- 3 - Leucina
- 4 - Treonina
- 5 - Aspártico
- 6 - Isoleucina
- 7 - Glicina - alanina

o sea 7 sobre 13, los tenores son levemente superiores en el procedimiento con 25% de reemplazo, cocimiento 145. Los seis restantes por el contrario, son algo inferiores que en el cocimiento normal.

Hay además amino - ácidos que hemos catalogado como DESCONOCIDOS y su ubicación es aproximativa en los tres procesos. Como puede verse en los cuadros 1 y 2 y en los gráficos, se trata del grupo de la Cisterna, del Alfa - amino - butírico y además se registra fosfo - etanol - amina, que no figura en los totales pues la presencia del grupo amino no justifica su inclusión en los amino - ácidos y su registro y representación se hace al sólo efecto de ilustrar lo acontecido en nuestras determinaciones.

Si se compara el cocimiento 146 o sea el de 50% de reemplazo con los restantes, las diferencias son altamente significativas. En efecto, basta la sola mención de los totales de: 957,08 y 966,8 mg p/l, para el Normal y el de 25% de reemplazo respectivamente, contra 524 mg p/l para el 146 (50% de reemplazo) para notar que los dos primeramente mencionados, casi duplican al de 50% de reemplazo.

Estos totales no concuerdan, en absoluto, con los señalados por WIEG (21). En efecto, según este autor, el mínimo de N, de alfa amino-ácidos, para un mosto cervecero, es de 250 mg p/l, lo que hace un total de amino - ácidos de aproximadamente de 1,665 mg p/l.

WIEG no especifica el método seguido y, en consecuencia, no hemos podido hacer las correspondientes verificaciones.

Nuestro total de N de alfa amino - ácidos, se detalla en el cuadro Nº 5, como puede apreciarse, los totales para cada cocimiento son: 106,97; 114,4 y 64,2 mg p/l, para los cocimientos Normal, 25%, y 50.0% (de reemplazo), respectivamente.

Dado que los caracteres organolépticos de los productos elaborados resultaron aceptables para el Normal y para el de 25% de reemplazo y habiendo efectuado las determinaciones por duplicado y usado un método tan riguroso como el de MOORE y STEIN (25), consideramos que nuestros resultados son correctos. De allí que nos permitamos concluir que el tenor de amino-ácidos de alrededor del gramo p/l, da un producto de buenas condiciones.

Incluso podría activar la fermentación, aún en el caso de cepas de levaduras industriales, relativamente independientes de los factores de crecimiento. En cambio cantidades tan inferiores de amino-ácidos como los del 146 (50% de reemplazo), pueden traducirse en variaciones organolépticas del producto elaborado. En este último cocimiento, 146, con bajo tenor de amino-ácidos, el examen individual de los mismos, en ningún caso supera el procedimiento Normal y el valor decreciente de los mismos es aproximadamente igual a los otros cocimientos (ver cuadro N<sup>o</sup> 3).

#### CONCLUSIONES

- 1 — Se separan y determinan azúcares y amino-ácidos de un cocimiento Normal (o sea el corriente en la industria cervecera, que usa malta como materia prima) y dos cocimientos donde la malta es reemplazada parcialmente por cebada, usándose entonces enzimas puras, en lugar de malta.
- 2 — Tomando el proceso Normal como patrón, se cotejan los datos analíticos de todas las determinaciones y se deduce:
  - a — Los datos analíticos para azúcares no resultan muy explicables en el cocimiento 145, que es inferior al Normal, salvo en el caso de la maltosa.
  - b — Hay muy buena correlación entre los datos del proceso Normal y el de 50% de reemplazo.
  - c — Los datos analíticos referentes a los amino-ácidos, muestran perfecta correlación entre el procedimiento Normal y el de 25% de reemplazo.
  - d — Hay gran discrepancia entre los dos cocimientos arriba citados y el de 50% de reemplazo, ya los dos primeros llegan casi a duplicar el total de amino-ácidos del último.
- 3 — El uso de enzimas puras, en lugar de malta, es perfectamente aplicable en la industria cervecera y la única limitación la constituye el % de reemplazo de malta.
- 4 — De acuerdo a nuestro trabajo en ese reemplazo no puede llegarse al 50% de la malta por cebada y sí es estimulante el de 25%

Cuadro Nº 1

## AMINO-ACIDOS EN mg. CONTENIDOS EN LA MUESTRA

147 - NORMAL		145 - 25%		146 - 50%		
1	Fenil-alanina	1.201	1.490	1	Fenil-alanina	0.660
2	Prolina-Glutam	0.605	0.575	2	Asp. NH <sub>2</sub> -Glut. NH <sub>2</sub>	0.338
3	Asp. NH <sub>2</sub> -Glut. NH <sub>2</sub>	0.364	0.472	3	Prol. Glutam.	0.290
4	Valina	0.316	0.266	4	Valina	0.202
5	Alfa-NH <sub>2</sub> -Butir	0.295	0.263	5	Leucina	0.168
6	Tirosina	0.278	0.219	6	Alfa-NH <sub>2</sub> -Butir.	0.154
7	Leucina	0.244	0.200	7	Triptofano	0.140
8	Triptofano	0.220	0.154	8	Aspártico	0.109
9	Metionina	0.164	0.141	9	Treonina	0.068
10	Aspártico	0.122	0.134	10	Isoleucina	0.058
11	Treonina	0.111	0.132	11	Metionina	0.050
12	Glicina-Alanina	0.092	0.115	12	Glicina-Alanina	0.043
13	Isoleucina	0.080	0.033	13	Serina	0.042
14	Serina	0.050				
<i>Desconocidos:</i>		<i>Desconocidos:</i>		<i>Desconocidos:</i>		
G <sup>o</sup> .	Cisteína:	1-0.095	1-0.071	G <sup>o</sup> .	Cisteína:	1-0.039
		2-0.156	2-0.130			2-0.085
		3-0.325	3-0.297			3-0.173
Gama-amino-butírico		0.0674	Gama-NH <sub>2</sub> -butírico		Gama-NH <sub>2</sub> -butírico, salió junto con fenil-alanina.	
P-Etanol-NH <sub>2</sub>		0.156	P-Etanol-NH <sub>2</sub>		P-Etanol-NH <sub>2</sub>	0.07

CUADRO Nº 2

AMINOACIDOS EN mg. POR LITRO

147 - NORMAL

1 Fenil alanina .....	132.0
2 Prolina - Glutam .....	121.0
3 Asparagina-Glut. NH2 ..	72.8
4 Valina .....	63.2
5 Alfa-NH2 - butírico .....	59.0
6 Tirosina .....	55.6
7 Leucina .....	48.8
8 Triptofano .....	44.0
9 Metionina .....	32.8
10 Aspártico .....	24.4
11 Treonina .....	22.2
12 Glicina - alanina .....	28.4
13 Isoleucina .....	16.0
14 Serina .....	10.0

*Desconocidos:*

Gº - Cisteína .....	1-19.0
.....	2-31.2
.....	3-65.0
Gama-NH2-butírico .....	13.48
P-Etanol-NH2 .....	31.2
(x) TOTALES .....	957.08

145 - 25%

1 Fenil - alanina .....	298.0
2 Prolina - Glutam .....	115.0
3 Asparagina-Glut. NH2 ..	94.4
4 Leucina .....	53.2
5 Alfa-NH2-butírico .....	53.2
7 Triptofano .....	40.0
8 Treonina .....	30.8
9 Aspártico .....	28.2
10 Isoleucina .....	26.8
11 Metionina .....	26.4
12 Glicina - alanina .....	23.0
13 Serina .....	7.6

*Desconocidos:*

Gº - Cisteína .....	1-14.2
.....	2-26.0
.....	3-59.4
Gama-NH2-butírico .....	26.8
P-Etanol-NH2 - No determinado	
.....	966.8

146 - 50%

1 Fenil-alanina .....	432
2 Asp. NH2-Glut. NH2 ...	67.6
3 Prol. Glut. ....	53.0
4 Valina .....	40.4
5 Leucina .....	33.6
6 Alfa-NH2-butírico .....	30.8
7 Triptofano .....	28.0
8 Aspártico .....	21.8
9 Treonina .....	13.6
10 Isoleucina .....	11.2
11 Metionina .....	10.0
12 Glicina - alanina .....	9.2
13 Serina .....	8.4

*Desconocidos:*

Gº - Cisteína .....	1- 7.8
.....	2-17.0
.....	3-34.6
Gama-NH2-butírico salió junto con fenil - alanina.	
P-Etanol-NH2 .....	1.4
.....	524.0

CUADRO N° 3

## AZUCARES SEGUN SCHALES Y SCHALES

			Equiv. Gluc. g/l	Azúcar g/l
1- 7	147	Glucosa	23.8	23.8
2- 8	147	Maltosa	24.7	49.4
3- 9	147	Maltotriosa	4.57	12.8
4-10	147	Maltotetrosa	3.14	11.8
5-12	145	Glucosa	19.0	19.0
6-13	145	Maltosa	26.7	53.4
7-17	145	Maltotriosa	3.9	10.9
8-18	145	Maltotetrosa	0	0
9-19	146	Glucosa	20.6	20.6
10-20	146	Maltosa	23.3	56.6
11-21	146	Maltotriosa	6.0	16.8
12-22	146	Maltotetrosa	1.14	4.2

CUADRO N° 4

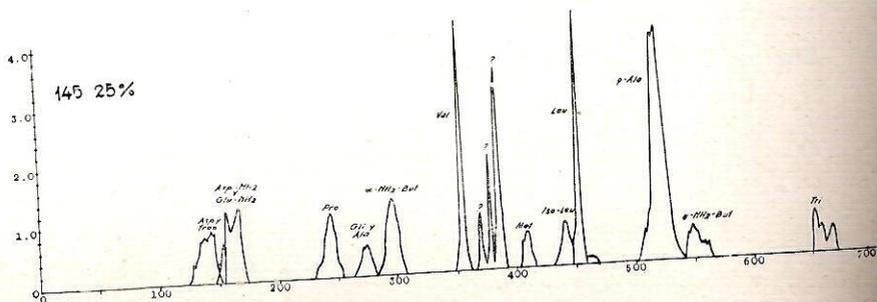
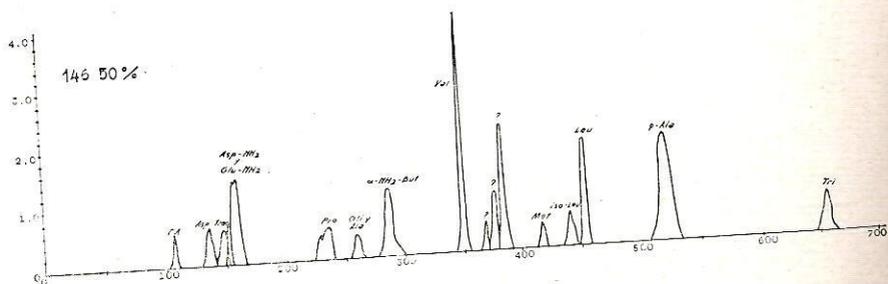
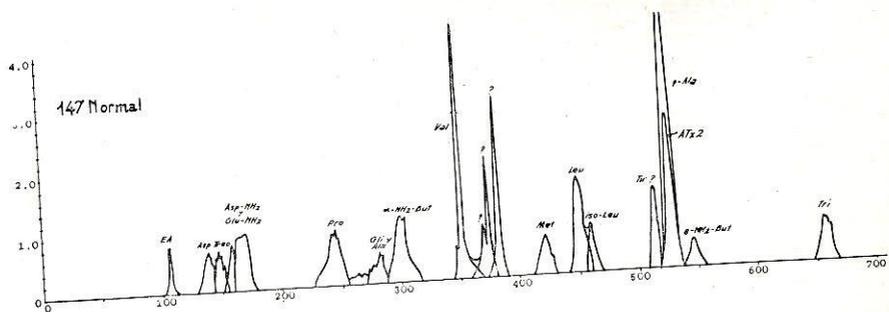
## AZUCARES sg. SCHALES Y SCHALES en g. l.

	Glucosa	Maltosa	Maltotriosa	Maltotetrosa	Totales
Cocimiento 147	23.8	49.4	12.8	11.8	97.8
Cocimiento 145	19.0	53.4	10.9	0	83.3
Cocimiento 146	20.6	56.6	16.8	4.2	98.2

CUADRO Nº 5

% DE N (de alfa - aminoácidos) DE LOS:

COCIMIENTOS	Normal 147	25% 145	50% 146
1 - Fenil-alanina	20.4	25.3	11.2
2 - Asp. NH <sub>2</sub> - Glut. NH <sub>2</sub>	14.15	18.9	13.5
3 - Prolina-Glutam.	13.40	12.6	6.35
4 - Valina	7.55	5.25	4.84
5 - Leucina	5.2	5.68	3.58
6 - Alfa - NH <sub>2</sub> - But.	8.0	7.25	4.2
7 - Triptofano	6.04	5.5	3.84
8 - Aspartico	2.57	2.97	2.0
9 - Treonina	2.65	3.62	1.6
10 - Isoleucina	1.71	2.75	1.19
11 - Metionina	3.40	2.48	0.94
12 - Glic. Alan	3.19	4.0	1.6
13 - Serina	1.33	1.01	1.12
<i>Desconocidos:</i>			
Gº Cisteina 1	}	}	}
2			
3			
Gama NH <sub>2</sub> Butir.			
TOTALES	106,97	114.40	64.2



## RESUMEN

Se hace un estudio comparativo entre el procedimiento tradicional de elaboración de cerveza y otros con remplazo de la malta por cebada (parcialmente), en este último caso se agrega un complejo enzimático denominado CONVERSE. Este complejo es rico en proteasas y carbohidrasas. De allí que su eficacia, como reemplazante de las enzimas naturales de la malta, se establece, a través del análisis de los productos originados por su acción hidrolítica. Se analizaron, en consecuencia, azúcares y amino-ácidos por métodos de cromatografía de papel cuali y cuantitativa los primeros y por resina de intercambio iónico, seguida de reacción colorimétrica y lectura en espectrofotómetro a 570 milimicrones, para todos los amino-ácidos, excepto prolina que se leyó a 440 milimicrones para los segundos.

También para amino-ácidos, se usó la cromatografía de papel que resultó aplicable a las cervezas y no a los mostos, por excesivo tenor azucarino de estos últimos.

Los datos analíticos permiten deducir que el uso de enzimas o complejos enzimáticos, en la industria, es perfectamente viable. En el caso de la cerveza, el buen resultado parece depender del porcentaje de reemplazo, que puede ser mayor de un 25% y menor del 50%. Para dar cifras más aproximadas, se hubieran necesitado más cocimientos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 PASTEUR, L. (1876): Etudes sur la biere. Gauthier. París.
- 2 WHITE, A. (1946): La industria cervecera por dentro. 204 p. Ed. Bs. As.
- 3 SWANSON, A. F. (1955): Cebada y Malta en el Perú. Prog. Coop. Exp. Agrop. Inf. 2 La Molina - Lima. Perú.
- 4 ALBIZZATI, M. J. y A. M. SERVICI (1948): El fraccionamiento del complejo proteico de las cebadas cerveceras cultivadas en la Rca. Arg. Granos XII-4, 5 y 6 p. 3-9.
- 5 MARINO, A.; M. NAVARRO E I. NARVÁEZ (1965): Cómo producir cebada maltera. Agric. de las Américas. Año 14, 3 p. 50-55.
- 6 BESNIER ROMERO, F. (1965): La cebada cervecera. Hojas divulgadoras N° 17-18, 65 H. Min. Agric. Madrid. España.
- 7 GAJÓN SÁNCHEZ, C. (1943): El lúpulo y la cebada de malta. Ed. Trucco, 85 p. Méjico.
- 8 INTA (1967): Programa de trigo y cebada cervecera. IDIA 223-35. Bs. As.
- 9 FRECHA, J. (1936): Dos nuevas variedades comerciales de cebada cervecera IDIA 264, 54-56. Bs. As.
- 10 La industria holandesa de la cerveza (1971): Crónica de Holanda XXVIII 171-30-34.
- 11 PETIT, P. (1926): Brasserie et malterie. Gauthiers-Villars. París.
- 12 — WUHRER, P. (1948): Preparazione del malto e fabbricazione della birra ed U. Hoepli, Milano. Italia.
- 13 — DE CLERCK, J. (1965): Lehrbuck der brauerei. Band I Versuchs- und Lehraustalt fur Brauerei in Berlin. Alemania.

- 14 BENDELOW V. M. AND W. O. S. MEREDITH (1955): Reliability of prediction tests for malting quality of barley. *Can. J. of Agric. Sc.* 35-3 p. 252 - 58.
- 15 BASS, E. J. AND W. O. S. MEREDITH (1959): Enzymes that degrades barley gums. *Proc. Amer. Soc. Brewing Chem.* 1959: 129-132.
- 16 GILLES, K. A.; W. F. GEDDES AND F. SMITH (1961): The carbohydrate of the gramineae. *Cereal Chem.* 38 (3) : 229 - 240.
- 17 COATES, J. H. (1961): Chromatography of the buffer soluble protein *Cereal Chem.* 38 (3) : 256 - 272.
- 18 DE CLERCK, J.; P. FABRY AND J. JERUMANIS (1961): Etude sur la activité proteolitique du malt a la germination et au brassage. *Bull. Assoc. Anciens. Etud. Brasserie. Univ. Louvain* 54 (3) 161 - 175.
- 19 TAIRA, H. (1960): Studies on amino-acids contents in plant seeds. *The botanical magazine - Tokio* 75, 888, 242 - 244.
- 20 LAUTENBACH, A. F. AND DWIGHT B. WEST (1959): Extract determination of cereal adjuncts. *Proc. Amer. Soc. Brewing Chem.* 148 - 153, 1959.
- 21 WIEG, A. J. (1969): Brewenzime, un nuevo método para la fabricación de la cerveza. *Noticias de Naarden* 20 Año, nº 204 Holanda.
- 22 — MC FARREN, EARL, F. (1951): Buffered filter paper chromatography of the aminoacids. *Analytical Chemistry* 23, nº 1, p. 168 - 174.
- 23 MERCK, E-AG DARMSTAD (3era. ed.) *Chromatography with particular consideration of paper chromatography* 185 p. 62 - 65.
- 24 BLOCK, R.; DURRUM, E. L. AND ZWEIG, G. (1958): *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis* Acad. Press 189 y 110 - 163.
- 25 MOORE AND STEIN (1948): *J. Biol. Chem.* 176, 367.
- 26 DUGGAN, E. (1957): Measurement of amino-acids by colum chromatography. *Methods in Enzimology* III. 492 - 504.
- 27 SCHIALES, O. Y SCHIALES, S. S. (1945): *Arch. Bioch.* 8, 285.
- 28 NELSON, N. (1944): *J. Biol. Chem.* 153, 375.