



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT D'ENOLOGIA

Trabajo de Fin de Máster:

Desarrollo y validación de un nuevo protocolo de evaluación de α -amilasas para cocción de mosto cervecero con sémola de maíz.

Development and validation of a new α -amylase evaluation protocol for brewing wort with corn grist.

Trabajo realizado por el alumno Miguel Puyod Sebastián
para obtener el título del Máster en Bebidas Fermentadas:

Ciencia y Tecnología de la Cerveza

Tutora académica: María Jesús Torija Martínez

Tutor en la empresa: Antonio J. Fumanal Sopena

Curso

2019-2020

Índice general

Índice general

1. Resumen	1
1.1. Abstract	1
2. Introducción	3
2.1. <i>Zea Mays</i>	4
2.2. Gelatinización y Licuefacción	5
2.2.1. Enzimas α -amilasas	6
2.3. Sacarificación	7
2.3.1. Prueba del Yodo	7
2.4. Fermentación forzada	8
2.4.1. Atenuación límite aparente	8
3. Objetivos	10
4. Metodología	11
4.1. Diseño experimental	11
4.2. Materiales y dispositivos	13
4.3. Análisis estadístico	14
4.4. Método operativo	14
4.4.1. Empastes	15
4.4.2. Mezcla de empastes	17
4.4.3. Macerado	17
4.4.4. Filtración y lavado	18

4.4.5. Esterilización y cocción	18
4.4.6. Fermentación forzada	18
5. Resultados	19
5.1. Tiempo de Sacarificación	19
5.2. Atenuación Aparente	21
6. Conclusiones	23
Bibliografía	24
7. Anexo I: Cálculos iniciales	I
8. Anexo II: Figuras de resultados	III
9. Anexo III: Análisis estadístico	XIV

1 Resumen

Los tiempos de sacarificación y las atenuaciones límites aparentes, para mostos de cerveza con un 30 % de sémola de maíz, han sido estudiados a escala de laboratorio. Como condiciones variables se han utilizado cuatro enzimas α -amilasas, tres cantidades diferentes de ellas y tres rampas de temperatura distintas en el proceso de maceración.

Se pretende diseñar un modelo experimental y analizar los resultados obtenidos para comparar las condiciones aportadas. El presente estudio es novedoso en el sector cervecero, pues no existe bibliografía sobre lo citado. Se permitirá establecer cuáles son las condiciones óptimas, a escala industrial, en función de los objetivos que una entidad cervecera establezca.

Ni las enzimas, ni las cantidades son, significativamente, influyentes en los resultados. Las rampas de temperatura son el factor crítico. Los tiempos de sacarificación más rápidos se obtienen llevando la temperatura de maceración a 72 °C directamente. Las atenuaciones más altas se producen realizando una parada de 15 minutos a 67 °C, antes de establecer los 72 °C finales de maceración.

1.1. Abstract

Time for saccharification and the apparent limit attenuations, for beer wort made with 30 % corn grist, have been studied on a laboratory scale. As variable conditions, four α -amylases enzymes, three different amounts of them and three different temperature ramps have been tested in this experimental mashing process. Its goal is to design an experimental model and discuss the results obtained to compare the conditions provided. The present study is novel in the beer sector, since there is no bibliography on the aforementioned. It will allow to establish process optimal conditions on an industrial level, speeding adjustment for beer process parameters.

For our goals, neither the enzymes nor the quantities are significantly influencing the results. The temperature ramps are the critical factor. The fastest saccharification times are obtained by bringing

the maceration temperature directly to 72 °C. The highest attenuations are reached by stopping by 15 minutes at 67 °C, before establishing the final 72 °C of maceration.

2 Introducción

La cebada malteada es la materia prima más generalizada para la elaboración de cerveza. Muchas elaboraciones incluyen también cereales sin capacidad enzimática propia a los que se denomina genéricamente como **adjuntos**.

Estos materiales pueden clasificarse en función de que su aporte de hidratos de carbono sea en forma de almidón o directamente de azúcares fermentables.

La sémola de maíz es el adjunto más utilizado en la elaboración de cerveza debido a un alto contenido en almidón y su bajo nivel de proteína, fibra y grasa. La generalización del cultivo del maíz unido a su alta productividad también lo hacen atractivo desde un punto de vista económico¹.

Para que el almidón aportado por la sémola de maíz pueda ser transformado en azúcares por las enzimas de la malta de cebada debe de ser previamente gelatinizado. Es decir, su estructura sólida semi-cristalina se convierte en amorfa posibilitando la entrada de moléculas de agua que forman nuevos enlaces de puente de hidrógeno con los grupos hidroxilos. El gel así formado permite la movilidad molecular y la actuación de las enzimas.

La composición y temperatura de gelatinización del almidón depende del cereal que lo aporte. La mayor temperatura de gelatinización del maíz frente a la cebada [1] exige de equipamiento adicional y de la adición de una fuente enzimática externa que licue el almidón para evitar el aumento en la viscosidad de la mezcla.

La utilización de enzimas exógenas permite optimizar los procesos de gelatinización y licuefacción [2]. A pesar del uso extendido de esta práctica a nivel industrial, no existen métodos de laboratorio que permitan evaluar con rapidez y precisión las condiciones ideales de proceso. En el presente estudio, se propone un nuevo protocolo para evaluar a escala de laboratorio las variables de proceso que afectan a enzimas comerciales **termoresistentes** cuando se las utiliza para procesar un mosto que contiene sémola de maíz.

¹El precio medio del maíz en España, cosechas 2018/19 y 2019/20, ha sido de 180 €/TM. Fuente: **Gobierno de España**.

2.1. *Zea Mays*

El maíz, es un cereal de la familia de las gramíneas muy rico en hidratos de carbono. Actualmente, es el cereal más cultivado a nivel mundial, con una producción total anual de aproximadamente 1100 millones de toneladas¹¹. Esto, permite que sea uno de los cereales más consumidos a nivel mundial y que se pueda encontrar en una gran cantidad de productos. Tal y como comentó Smith et al. [3]: “Este cereal se puede encontrar más allá de productos como las palomitas o cereales de desayuno. El aceite de maíz está en la margarina, el sirope dulce de maíz en mermeladas y el maíz en grano es alimento para el ganado. Además, se usa para la producción de destilados, cerveza, golosinas, etanol puro, plásticos, penicilina...”

El principal constituyente del maíz es el **almidón**. Es el componente más importante para este estudio, pues es la fuente de azúcar principal. Está compuesto por dos polímeros diferentes de glucosa: la **amilosa** y la **amilopectina**.

La amilosa es un polímero lineal constituido por la unión de moléculas de α -D-glucosas mediante enlaces α -1,4 como se puede observar en la Figura 2.1. Este polímero es primordial para obtener azúcares fermentables, ya que, por su estructura lineal facilita la actuación de las enzimas α y β amilasas, que hidrolizan los enlaces de su estructura, lo cual consigue degradarlo hasta azúcares más sencillos.

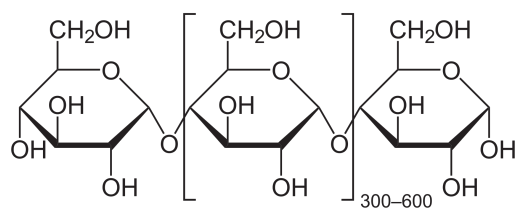


Figura 2.1: Estructura de la amilosa.

En el caso de la amilopectina, su composición química es exactamente igual que la de la amilosa, pero su conformación espacial no. Las cadenas ocupan un volumen mucho mayor, ya que se encuentra ramificada (ver Figura 2.2) por unidades o cadenas cortas de α -D-glucosas unidas a la cadena principal por enlaces α -1,6.

¹¹Fuente: Consejo Internacional de Cereales.

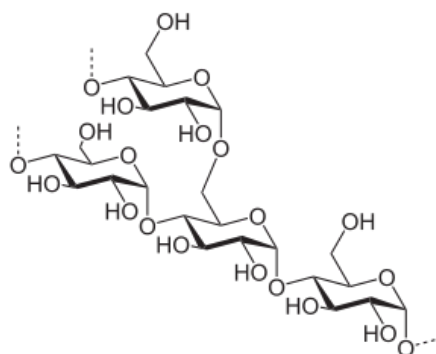


Figura 2.2: Estructura de la amilopectina.

2.2. Gelatinización y Licuefacción

La “**Gelatinización**” es el proceso por el cual, el agua penetra en los gránulos de almidón hidratándolos y generando así la pérdida de su estructura cristalina sólida. El despliegue de las moléculas de almidón, una vez están rodeadas de moléculas de agua, confiere a la fase una viscosidad elevada. La temperatura a la que la viscosidad es máxima se denomina **temperatura de gelatinización**.

Denominamos proceso de “**Licuefacción**” al proceso de reducción de viscosidad de la mezcla gelatinizada de almidón por reducción del tamaño de las estructuras moleculares del almidón. Una vez el almidón ha sido gelatinizado es accesible a la acción de las enzimas amilolíticas.

Las variaciones de la viscosidad que se acaban de comentar, pueden observarse en la Figura 2.3.

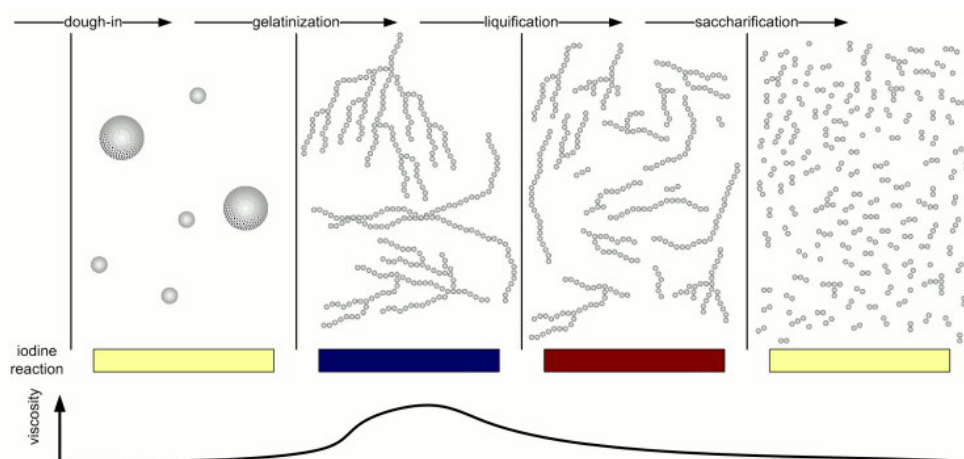


Figura 2.3: Variación de la viscosidad de un gel durante el proceso de maceración de un cereal. De izquierda a derecha: empaste, gelatinización, licuefacción y sacarificación. Fuente: *Technologie Brauer und Mälzer* [4].

La temperatura de gelatinización es diferente y característica para cada variedad de cereal. En el caso del maíz, esta temperatura es de unos 62-72 °C, mientras que para la malta de cebada es muy inferior, de 51-60 °C [5]. Al final de este proceso de gelatinización, se genera un gel o pasta muy viscoso debido a la formación de enlaces entre las cadenas de amilosas y amilopectinas extraídas al medio acuoso. De hecho, existen estudios en los que se corrobora que el aumento de la viscosidad del medio está directamente relacionado con el incremento de la temperatura [6], [7], [8]. La presencia de α -amilasas acelera el proceso de licuefacción de manera concomitante con la gelatinización por lo que la viscosidad de la dispersión de almidón en agua caliente puede mantenerse dentro de un orden manejable para equipos de agitación y bombeo sencillos. El almidón gelatinizado y licuado será ya fácilmente transformado en azúcares sencillos.

2.2.1. Enzimas α -amilasas

Se denomina α -amilasas al grupo de enzimas capaces de **hidrolizar** los enlaces α -glucosídicos, presentes en los polímeros del almidón. Por lo general, los cereales contienen la cantidad suficiente de estas enzimas para que no se produzcan geles demasiado viscosos en el momento de la gelatinización. Este, no es el caso del maíz. Carece de la concentración de enzimas mínima necesaria para que su gelatinización genere un viscosidad manejable en una instalación de elaboración de cerveza durante el proceso de maceración. Es por eso, por lo que el uso de enzimas exógenas se hace necesario. Existen

diferentes preparados enzimáticos comerciales pero hasta ahora no se disponen de pruebas sencillas de laboratorio que permitan comparar el comportamiento de cada una bajo diferentes condiciones de uso.

2.3. Sacarificación

Es el último paso en el camino de transformar el almidón en azúcares. Requiere de la acción de enzimas en las condiciones tecnológicas adecuadas de temperatura, pH, concentración de cofactores enzimáticos y tiempo [9].

Cabe destacar que, aunque en el presente estudio se trate como objetivo el impacto de las α -amilasas, son varias las enzimas que tienen relevancia durante este proceso. Estas, son la **dextrinasa límite** y la **α -glucosidasa**. Hidrolizan, respectivamente, los enlaces α -1,6 y α -1,4 de los polímeros del almidón. La función principal de estas es llevar a cabo la desramificación del almidón y “liberar” moléculas de glucosa, respectivamente. Con esto, se consiguen cadenas más accesibles para la actuación de las α y β amialasas.

Durante la elaboración de un mosto de cerveza, la sacarificación, requiere un tiempo, conocido como tiempo de sacarificación, que oscila entre 10 y 15 minutos^{III}. La desaparición de todo el almidón y su transformación en hidratos de carbono solubles se pueden controlar mediante la “prueba del yodo”.

2.3.1. Prueba del Yodo

Esta prueba está basada en una reacción química entre una solución de yodo y el almidón presente en la muestra. El concepto es sencillo: El yodo reacciona con el almidón produciendo un complejo de tonalidad azul oscura. Químicamente, lo que se produce es que los iones de I_3^- se insertan en las hélices que forman las cadenas de amilosa^{IV} como se puede observar en la Figura 2.4. Al avanzar el proceso de sacarificación, estas hélices son cortadas impidiendo la unión de los iones I_3^- , y, por tanto, impidiendo la aparición del color azul.

Por ello, en esta prueba, valorar si la sacarificación se ha completado es sencillo, simplemente se

^{III}Aunque siempre se trata de buscar la optimización de este parámetro. Menor tiempo, mayor efectividad.

^{IV}Que los iones se inserten en la amilopectina es mucho más complicado. Por su estructura ramificada, forma hélices mucho mas cortas que impiden la unión de los I_3^- , por ello, la valoración que se realiza es sobre la amilosa.

comprueba cada cierto tiempo el color que adquiere una muestra de mosto. Si la tonalidad es de color naranja/marrón se podrá dar por terminado el proceso de sacarificación [10].

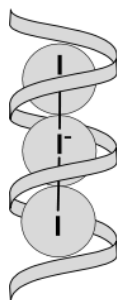


Figura 2.4: Inserción de los iones I_3^- en una hélice de amilosa o amilopectina.

2.4. Fermentación forzada

Método empleado en la práctica cervecera para conocer la cantidad máxima de hidratos de carbono que la levadura puede llegar a consumir durante el proceso de fermentación. Este método consiste, tal y como su nombre indica, en forzar al mosto en una fermentación con una inoculación de levadura muy elevada. Generalmente, esta cantidad suele ser de 15 g de levadura por cada 200 g de mosto. Con tal cantidad de levadura, se busca fermentar en el menor tiempo posible (24 h) todos los azúcares fermentables [11]. Cabe destacar que no todos los hidratos de carbono son fermentables por las levaduras, y, el porcentaje de estos viene dado por la forma en que se haya elaborado el mosto. Concretamente en el macerado y la activación de las enzimas responsables de la sacarificación. Para indicar el rendimiento de esta conversión se dispone de un parámetro conocido como atenuación límite aparente.

2.4.1. Atenuación límite aparente

Se define como el parámetro que indica el porcentaje máximo de conversión de los hidratos de carbono, presentes en el mosto de cerveza, hasta alcohol etílico. El cálculo de este parámetro consiste en relacionar el extracto seco original (EO) del mosto con el extracto aparente final (EA) que la

cerveza posee y se puede calcular mediante la ecuación

$$At.Ap. \% = \frac{EO - EA}{EO} 100. \quad (2.1)$$

Siendo el extracto aparente una medida de la materia seca total disuelta en un líquido fermentado, teniendo en cuenta la cantidad de etanol producida. Este parámetro es habitualmente usado en las industrias cerveceras para conocer el rendimiento de fermentación obtenido, así como la cantidad de alcohol producido.

3 Objetivos

Como objetivo principal se trató de llegar a la conclusión sobre qué enzima o enzimas, y en qué condiciones (temperatura y cantidad), pueden proporcionar resultados óptimos a nivel industrial sobre mostos de cerveza a base de malta de cebada y sémola de maíz. Además, interesaba fijar un modelo experimental a seguir para poder aplicarlo a situaciones y recetas similares.

Para ello se ha llevado a cabo el **diseño y realización experimental** de una prueba a nivel de laboratorio para predecir el efecto de la aplicación de diferentes enzimas α -amilasas en mostos de cerveza bajo diferentes condiciones de uso. La composición de los cereales de este modelo ha sido de 70 % malta de cebada y un 30 % de sémola de maíz utilizada como adjunto.

En el presente trabajo, se han utilizado, como parámetros de estudio, los **tiempos de sacarificación** y las **atenuaciones límites aparentes** de los mostos elaborados para cada una de las enzimas y condiciones dadas. Toda la serie de experimentos se han llevado a cabo bajo el mismo procedimiento de elaboración: empaste de crudos, empaste de maltas, maceración de la mezcla de los anteriores, esterilización por ebullición y finalmente, fermentación forzada. Durante la maceración se ha registrado el tiempo de sacarificación. La determinación de densidad del mosto inicial y al final de la fermentación forzada ha permitido obtener el valor de la atenuación aparente límite.

4 Metodología

4.1. Diseño experimental

Debido a la escasez bibliográfica sobre enzimas amilasas comerciales en el ámbito de la cerveza, ha sido necesario diseñar un procedimiento experimental, a escala de laboratorio, desde su base. Por ello, es importante mencionar que este estudio es novedoso en el sector. Se pretende así definir un método que permita evaluar el comportamiento de una determinada enzima en función de la cantidad usada y la curva de temperaturas aplicada en la caldera de maceración.

Inicialmente, se calculó el volumen de trabajo (número de experimentos y su distribución) que se iba a tener que llevar a cabo. Cada experimento cuenta con una combinación de variables diferentes, que, tal y como se ha comentado en los objetivos (3), son:

- **Enzimas:** Cuatro enzimas amilasas de casas comerciales diferentes han sido utilizadas, y son: **Alfalisin** (**Laboratorio Industrial de Bioquímica S.A.** Huarte, España.), **Beerzym** (**Erbslöh Geisenheim AG.** Geisenheim, Alemania.), **Termamyl Classic** (**Novozymes** Bagsværd, Dinamarca.) y **Termamyl SC** (**Novozymes.** Bagsværd, Dinamarca.).
- **Cantidad de enzimas:** Tres concentraciones de uso: **150 g/TM^I**, **250 g/TM** y **400 g/TM**.
- **Temperatura post-mezcla^{II}:** Se ha querido observar si el escalonado de temperaturas es influyente en el tiempo de sacarificación; desde el momento en el que se mezclan adjuntos y maltas hasta que se establece la temperatura de maceración (72 °C). Así pues, se han establecido dos temperaturas estudio intermedias de **62 °C** y **67 °C** que se mantienen durante 15 minutos. También aquí, se ha estudiado una tercera variable, y es no realizar el escalonado;

^IEntiéndase como gramos de enzima por tonelada de maíz.

^{II}Se le nombró de esta manera ya que, es la temperatura que se ha de establecer una vez se han mezclado los dos empastes.

llevando directamente el mosto a **72 °C**. De esta manera, se tienen las tres temperaturas citadas como variables a tener en cuenta, dos escalonadas y una directa como se puede observar en la Figura 4.1 .

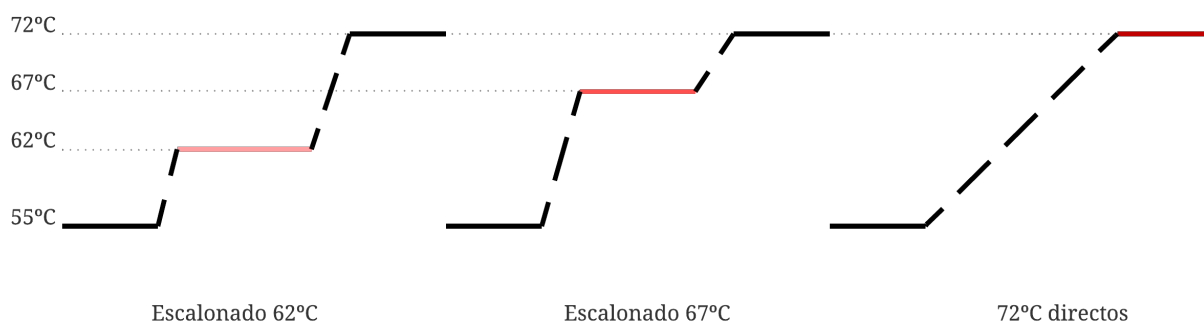


Figura 4.1: Rampas de temperaturas.

Por lo tanto, se llevarán a cabo 36 experimentos diferentes (ver Figura 4.2), resultantes de cada una de las posibles combinaciones de las variables^{III}. Para cada uno de ellos, se realizarán cuatro réplicas para estudiar la robustez estadística de los experimentos. Es decir, cada experimento dispone de unas condiciones características que son iguales para cada una de las cuatro réplicas. La Figura 4.2 recoge todas las combinaciones ensayadas.

A la hora de clasificar los experimentos, se ha optado por otorgar un nombre compuesto por una **letra** (diferente para cada enzima) seguida de un **número**. Las letras fueron elegidas por orden alfabético, y los números son correlativos. Nótese como: las letras diferencian las enzimas utilizadas, y los números subcategorizan los experimentos que usan la misma enzima; para diferentes letras (enzimas) y mismos números, las condiciones de temperatura y cantidad de la enzima utilizadas son las mismas. De esta manera, se tienen los experimentos bien definidos y clasificados, lo que facilita el trabajo y organización en el laboratorio.

Cada experimento conlleva la elaboración de cuatro mostos cerveceros (réplicas), preparados con las mismas cantidades, condiciones y procedimientos. Se optó por la elaboración de un mosto que se acercara a la realidad industrial de densidad inicial de 16 °P y un volumen **final** de 600 mL. Para ello, se elaboran mostos de 24 °P (1,1011 g/mL), y, posteriormente con el agua caliente del lavado del

^{III}Se dispone de 4, 3 y 3 variables. Y, $4 \times 3 \times 3 = 36$.

Nombre Experimento	Nº Experimento	Enzima	Tª post -mezcla (°C)	Cantidad de la enzima (g/TM)
A1	1			150
A2	2		62	250
A3	3			400
A4	4			150
A5	5	Alfalisin	67	250
A6	6			400
A7	7			150
A8	8		72	250
A9	9			400
B1	10			150
B2	11		62	250
B3	12			400
B4	13	Beerzym		150
B5	14		67	250
B6	15			400
B7	16			150
B8	17		72	250
B9	18			400
C1	19			150
C2	20		62	250
C3	21			400
C4	22			150
C5	23	Termamyl Classic	67	250
C6	24			400
C7	25			150
C8	26		72	250
C9	27			400
D1	28			150
D2	29		62	250
D3	30			400
D4	31			150
D5	32	Termamyl SC	67	250
D6	33			400
D7	34			150
D8	35		72	250
D9	36			400

Figura 4.2: Organización y resumen de los experimentos. Se recogen nombres, y condiciones, asignando a cada uno de ellos.

bagazo se diluye hasta la densidad deseada. Con esto, se consigue un mosto de 16 °P a partir de otro de menor volumen y, por lo tanto, más concentrado.

4.2. Materiales y dispositivos

Las materias primas han sido proporcionadas por parte de la empresa: **malta de cebada**, **sémola de maíz**, y solución de **CaCl₂**^{IV}. El **agua** utilizada es agua de la red de elaboración, la misma que se usa en la sala de cocción industrial. Las diferentes **enzimas** que se han mencionado en la sección anterior (4.1), han sido compradas en sus respectivas casas comerciales. La solución de yodo, utilizada para medir la sacarificación, se prepara en el laboratorio a una concentración de 0,02N. La **levadura**, de la especie *Saccharomyces Cerevisiae*, utilizada para la fermentación forzada procede de la práctica

^{IV}Los proveedores de las materias primas no son incluidos por la política de protección de datos de la empresa. Ídem para la levadura.

industrial de reutilización (re-pitching) que se realiza en la empresa. Para facilitar su manejo, la crema de levadura industrial se filtra en un kitasato eliminando el líquido sobrenadante. De esta manera, se obtiene una masa de levadura sólida de fácil manejo.

Para la elaboración de los mostos se ha utilizado un **baño de brassage** (Lupex - Malt Extract Bath (Alemania)). Las densidades se han medido en un densitómetro automático (DMA4500 M, Anton Paar (Austria)).

4.3. Análisis estadístico

El tratamiento de los resultados (comparación de medias, análisis de ANOVA de un factor y Test de Scheffé) se ha realizado con el programa **SPSS Statistics** (IBM, Estados Unidos). Se han llevado a cabo los cálculos de las medias para cada uno de los experimentos, junto con sus desviaciones estándar. También, se ha comprobado qué factor, de los tres empleados (enzima, cantidad de enzima y temperatura), es el más influyente en los parámetros de estudio (tiempo de sacarificación y atenuación límite aparente).

Test de Scheffé

Para determinar las diferencias significativas entre las condiciones y/o experimentos, se ha utilizado el Test de Scheffé. Este análisis, realiza todos los contrastes de igualdad de medias dos a dos y, constituye dos distintos grupos homogéneos a partir de los resultados de los contrastes por parejas. Es decir, compara las medias, por parejas, obtenidas dentro de un mismo factor, concluyendo entre cuáles de ellas se obtienen diferencias significativas. Este test permite detectar el, o los, parámetros para cada factor que proporcionen resultados diferentes entre ellos.

4.4. Método operativo

En este apartado se recoge el procedimiento experimental, esquematizado en la Figura 4.3.

Para facilitar una lectura más ágil, los cálculos iniciales, correspondientes con las cantidades de materias primas que se han usado en el presente trabajo, han sido incluidas como “Anexo I” (ver Sección 7).



Figura 4.3: Diagrama de proceso.

4.4.1. Empastes

Es la primera parte del proceso y corresponde a la mezcla de adjuntos o malta con el agua. De esta manera, se pone en contacto la materia prima sólida con el agua.

Empaste de adjuntos

Antes de comenzar, conviene destacar que se decidió elaborar este empaste con el doble de la cantidad necesaria de maíz para tener en exceso (ver composición del empaste en “Anexo I”, Sección 7).

La razón es porque el empaste de maíz se adhiere con facilidad a las paredes de los vasos del baño de brassage. Si se realizase este empaste con la cantidad de maíz justa, habría pérdidas de cantidad en esas paredes. Esto, habría producido que la cantidad de maíz, y enzima, vertida sobre la malta fuera menor de la necesaria. Por lo tanto, elaborando el doble de la cantidad de maíz se permite:

1. Añadir la cantidad realmente necesaria de crudos al empaste de maltas en la mezcla de ambos.
2. Mantener la concentración de enzima que se necesita en cada experimento, por la misma razón que la cantidad de maíz.
3. Pipetear volúmenes de enzima superiores a los 5 μL .

Esta pequeña modificación no influyó sobre el resultado final, pues a la hora de añadir este empaste al de maltas, se repartió la cantidad realmente necesaria de manera cuantitativa como se explicará en

el apartado 4.4.2 a través de la Figura 4.4.

Así pues, este empaste se acomete en primer lugar ya que lleva un tiempo de elaboración mayor. Para comenzar, se añade, a cada vaso del baño de brassage, la cantidad de agua necesaria (200,7 mL) y se pone a calentar en el baño a una temperatura de 75 °C. Mientras se va calentando, se pipetea y añade el volumen de enzima correspondiente al experimento que se vaya a realizar (ver Tabla 7.1), seguido de los 172 μ L de CaCl_2 . Una vez se alcanza la temperatura, se vierten los 80,2 g correspondientes de sémola de maíz muy poco a poco y en constante agitación. Esta mezcla se deja a una temperatura constante de 75 °C y con agitación de 200 rpm durante 10 minutos.

Pasado el tiempo, se transfiere la mezcla de los cuatro vasos del baño a un vaso de precipitados de 2 L previamente tarado, y se **pesa**. Se eleva la temperatura del empaste a 85 °C, poniendo el vaso al baño maría^v y manteniendo la agitación con ayuda de un agitador eléctrico. Al juntar la mezcla en un vaso de 2L, liberamos el baño de brassage para poder elaborar el empaste de malta al mismo tiempo que el de crudos termina.

Una vez el empaste alcanza la temperatura de 85 °C, se mantiene 45 minutos^{vi}. Durante este tiempo, se da el proceso de licuefacción y entran en acción las enzimas α -amilasas. Como la temperatura que se alcanza es elevada, se pierde agua del empaste por evaporación, por lo que, al final, se añade el agua equivalente al peso perdido (es un dato conocido ya que se pesan los adjuntos antes y después de los procesos de gelatinización y licuefacción).

Empaste de malta

La realización de este empaste es sencilla y similar a la de los adjuntos previamente explicada. Cuando restan 20 minutos para el final del empaste de adjuntos, se pone a calentar el agua correspondiente (229,5 mL) en el baño de brassage junto con el CaCl_2 hasta alcanzar una temperatura de 55 °C. Después, se añaden 93,7 g de malta de cebada, previamente molida y se dejan en agitación de 200 rpm durante 10 minutos.

^vCompuesto por 3 L de agua con glicol al 30 %. Con esto, se consigue aumentar el punto de ebullición del baño.

^{vi}La temperatura es controlada mediante un termómetro en continuo.

4.4.2. Mezcla de empastes

Transcurrido el tiempo del empaste de malta, se ha de añadir el de adjuntos correspondiente. Simplemente se vierten los crudos sobre la malta en una balanza, para controlar la cantidad añadida.

Como se elaboró el empaste de crudos con el doble de la cantidad necesaria por réplica (40,1 g), se repartió de manera cuantitativa la octava parte del total del empaste elaborado. Observando la Figura 4.4, se puede observar que, al final se añade la cantidad correcta de crudos sobre la malta (ídem para la enzima).

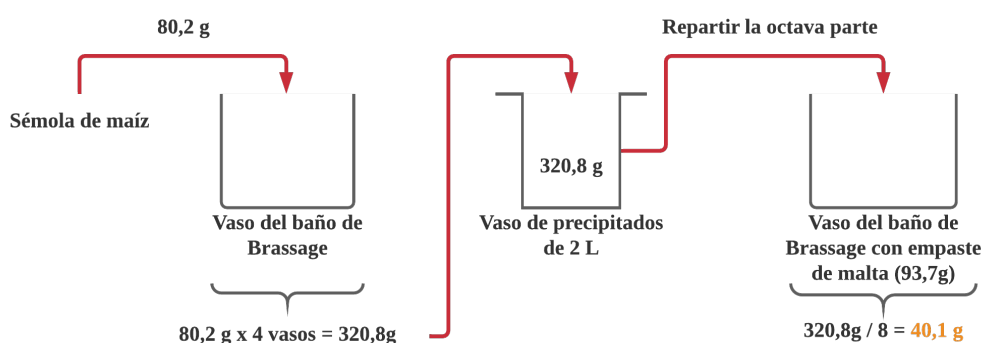


Figura 4.4: Diagrama del empaste de crudos.

4.4.3. Macerado

Los vasos, ya con malta y maíz, son introducidos en el baño de brassage, se activa la agitación de 200 rpm y se establece la temperatura correspondiente con el experimento que se esté llevando a cabo:

- Si se establece escalonado, la temperatura deseada (62 o 67 °C) será mantenida durante 15 minutos, una vez se alcanza. Posteriormente, se llevará a 72 °C.
- Si no hay escalonado, directamente se elevará la temperatura a 72 °C.

Como uno de los parámetros a estudiar es el tiempo de sacarificación, se mide en intervalos de 5 minutos mediante la prueba del yodo. Para ello, se pipetea 0,5 mL de muestra, se vierten sobre una placa de porcelana y se añade una gota de una solución de yodo 0,02N. En el presente estudio, se ha establecido como tiempo 0 el momento en el que se alcanzan los 72 °C de maceración.

4.4.4. Filtración y lavado

Una vez la sacarificación está completa, se procede con la filtración del mosto y el lavado del bagazo. Para ello, se vierte cada mosto sobre un kitasato con filtro buchner y se lava con el agua correspondiente, previamente calentada en un microondas. El mosto filtrado, es vertido sobre un vaso Erlenmeyer de 1 L, del cual, retiraremos una pequeña parte (unos 100 mL aproximadamente) para poder analizar el grado Plato del mosto elaborado en el densitómetro, obteniendo de esta manera el extracto original (*EO*).

4.4.5. Esterilización y cocción

Se traspasan 300 g del mosto a una botella de vidrio. La botella llena se esteriliza a 121 °C en un autoclave durante 15 minutos. Con esto, se consigue evitar cualquier contaminante microbiológico. Además, el mosto es sometido a una simulación de ebullición, lo que ayuda a que los valores de atenuación límite sean más ajustados a la realidad industrial.

4.4.6. Fermentación forzada

Los mostos, ya estériles y enfriados hasta temperatura ambiente, son sometidos a una fermentación forzada añadiendo 22,5 g de la pasta de levadura comentada en el apartado 4.2. Durante esta prueba, se aplicó una agitación de 500 rpm mediante un agitador y placa magnética. La temperatura de fermentación es de unos 22°C, la ambiente del laboratorio. Pasadas las 24 horas necesarias, las cervezas obtenidas son filtradas en un embudo con papel de filtro y tierras de diatomeas para poder llevar a cabo el análisis de las mismas en el densitómetro automático. Así pues, se obtendrá el extracto aparente (*EA*).

5 Resultados

En esta sección se van a presentar los resultados y análisis de los mismos, obtenidos para cada uno de los experimentos. Por cuestiones de espacio, las gráficas de los resultados que en esta sección se muestran, han sido insertadas como “Anexo II” (ver sección 8). De la misma manera, todos los resultados estadísticos, han sido incluidos en “Anexo III” (ver sección 9).

5.1. Tiempo de Sacarificación

Los tiempos de sacarificación para los 36 experimentos realizados se muestran en la Tabla 5.1. Asimismo, la representación gráfica de estos resultados se adjunta en el Anexo II (Sección 8, Figuras 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4.)

Observando los resultados, se puede concluir que independientemente del enzima utilizado, así como de la cantidad de dicho enzima, la temperatura de 72°C es la que produce unos tiempos de sacarificación menores. Aunque en algunos casos pueda parecer que el enzima o la cantidad puede resultar en diferencias en el tiempo de sacarificación, estas no se reflejan en los análisis estadísticos. Para el tiempo de sacarificación (ver Figura 9.2), se puede concluir que la temperatura es el factor que produce resultados significativamente diferentes¹ entre ellos ($0.000 < \alpha$).

Si se observa el análisis de Scheffé (ver Figura 9.3), la comparación de las medias de los experimentos realizados con 62 °C y 67 °C no presentan diferencias significativas. Sin embargo, la comparación de 72 °C con las otras temperaturas sí que presenta diferencias significativas.

Quizá, se podría pensar que las cantidades de enzima sí son influyentes y presentan resultados diferentes para una misma, o diferente, temperatura. Aunque no era necesario, se realizó el Test de Scheffé para evitar las posibles dudas. Si se observa la Figura 9.4, se puede comprobar cómo, las significaciones obtenidas confirman que las medias obtenidas para diferentes cantidades de enzima

¹Se ha utilizado un nivel de significación (α) del 5 %.

Cuadro 5.1: Cada resultado es la media de las cuatro réplicas que componen cada experimento. Las desviaciones estándar no se incluyen, pues fueron de 0,00 para cada réplica. (ver Figura 9.1).

Promedio de Tiempo Sacarificación (min)					
Enzima y temperatura (°C)		150 g/TM	250 g/TM	400 g/TM	Media (min)
Alfalisin	62	20,0	15,0	20,0	18,3 ± 2,5
	67	20,0	15,0	25,0	20,0 ± 4,3
	72	15,0	15,0	15,0	15,0 ± 2,5
Beerzym	62	15,0	15,0	20,0	16,7 ± 2,5
	67	20,0	15,0	15,0	16,7 ± 2,5
	72	10,0	15,0	15,0	13,3 ± 2,5
Termamyl Classic	62	20,0	20,0	20,0	20,0 ± 0,0
	67	15,0	15,0	20,0	16,7 ± 2,5
	72	15,0	10,0	10,0	11,7 ± 2,5
Termamyl SC	62	15,0	25,0	15,0	18,6 ± 5,0
	67	25,0	20,0	20,0	21,7 ± 2,5
	72	10,0	10,0	10,0	10,0 ± 0,0
Media (min)		16,7 ± 4,3	15,8 ± 4,0	17,1 ± 4,4	16,5 ± 4,3

son significativamente iguales.

Cabe destacar que:

- Con cualquier enzima se consiguen tiempos mínimos de 10 minutos sin escalonado , excepto con Alfalisin.
- La cantidad de 250 g/TM: mantiene tiempos constantes, independientemente de la temperatura para Alfalisin y Beerzyme. En Termamyl Classic y SC, disminuye el tiempo a medida que aumenta la temperatura.
- A la temperatura de 72 °C, Termamyl SC presenta una clara robustez. Sin importar que cantidad se utilice, los tiempos son los mínimos.

5.2. Atenuación Aparente

Los resultados obtenidos para el porcentaje de atenuación aparente, han sido recogidos mediante la Tabla 5.2 y representados gráficamente en la Figuras: 8.5, 8.6, 8.7 y 8.8. Asimismo, las desviaciones estándar de cada experimento se encuentran en la Figura 9.1.

Observando los resultados de la Tabla 5.2, las diferencias que se dan se hacen muy intuitivas. Parece ser que la temperatura es el factor más influyente sobre este parámetro también. Concretamente, para el proceso con escalonado en 67 °C se obtienen las atenuaciones más altas, independientemente de la enzima y cantidad de ella (ver Figura 8.10). Para 62 °C y 72 °C, se dan las atenuaciones más bajas. Esta tendencia se puede comprobar claramente con las Figuras 8.9 y 8.11.

Cuadro 5.2: Resultados obtenidos para las atenuaciones aparentes en función de temperaturas, enzimas y cantidad de las mismas.

Promedio de % Atenuación Aparente					
Enzima y temperatura (°C)	150 g/TM	250 g/TM	400 g/TM	Media (min)	
Alfalisin	62	77,6	74,9	79,0	77,2 ± 1,8
	67	81,8	82,6	82,1	82,2 ± 0,5
	72	77,6	77,4	77,7	77,6 ± 0,5
Beerzym	62	77,7	77,9	78,7	78,1 ± 0,6
	67	81,6	82,5	82,8	82,3 ± 0,7
	72	77,4	77,5	76,7	77,2 ± 0,5
Termamyl Classic	62	76,8	78,2	78,2	77,7 ± 0,8
	67	80,7	81,4	82,7	81,6 ± 0,9
	72	78,0	78,0	77,9	77,9 ± 0,3
Termamyl SC	62	77,5	79,3	78,0	78,3 ± 1,0
	67	80,2	81,8	82,8	81,6 ± 1,1
	72	78,7	78,1	78,2	78,3 ± 0,4
Media (min)	78,8 ± 1,8	79,1 ± 2,4	79,6 ± 2,3	79,2 ± 2,2	

Con el análisis estadístico de ANOVA (ver Figura 9.5) se confirma lo citado. La atenuación apa-

rente depende, significativamente, de la temperatura post-mezcla fijada. Además, mediante el Test de Scheffé (ver Figura 9.6) se comprueba como, efectivamente, la temperatura de 67 °C proporciona resultados significativamente diferentes. Las medias de las atenuaciones correspondientes con 62 °C y 72 °C, respectivamente, son significativamente iguales.

Los resultados son más constantes a 72 °C, en función de enzima y cantidad, que en cualquiera de las otras enzimas. Esto, parece indicar que si se establece una temperatura post-mezcla de 72 °C, las atenuaciones serán prácticamente iguales independientemente de la enzima y cantidad que se use.

A pesar de que la temperatura de 67 °C no es la mejor opción para optimizar los tiempos de sacarificación, si que lo es a nivel de atenuación. Proporciona las atenuaciones más elevadas. Esto, podría ser interesante para aquella persona o empresa que busque este objetivo, aunque, tendría que valorar si compensa tener atenuaciones más elevadas con tiempos más duraderos.

Todos los resultados se encuentran en niveles aceptables de atenuación, pues ninguno de ellos tiene niveles de atenuación muy bajos ($\%At.Ap > 70\%$). Cualquier condición testada podría ser válida, aunque, algunas son mejores, con niveles de atenuación más altos.

6 Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten optimizar el protocolo de elaboración según los objetivos marcados para cada cerveza:

1. Para el objetivo de este estudio, la enzima utilizada, así como la cantidad de la misma añadida no tienen efectos significativos, ni sobre el tiempo de sacarificación ni la atenuación. Esto apunta a una gestión simplemente económica para conseguir un ahorro de coste razonable.
2. Si el objetivo es reducir el tiempo de sacarificación, el proceso más rápido se obtiene con la temperatura post-mezcla de 72 °C directos.
3. Si el objetivo es aumentar la atenuación, una parada en la maceración a 67 °C durante 15 minutos es la mejor solución.

Estos resultados han sido aplicados en **La Zaragozana (Ambar)**, empresa en la que este trabajo se ha podido llevar a cabo, para ajustar el suministro de enzimas en cuanto a cantidad y enzima utilizada reduciendo el coste en receta de las mismas. También, se han rediseñado las curvas de cocción ajustándolas a los niveles de atenuación requeridos.

Bibliografía

- [1] M. Gupta, A. S. Bawa, and A. D. Semwal. Morphological, thermal, pasting, and rheological properties of barley starch and their blends. *International Journal of Food Properties*, 12(3):587–604, 2009.
- [2] Sp. Tiwari, R. Srivastava, Cs. Singh, K. Shukla, Rk. Singh, P. Singh, R. Singh, Nl. Singh, and R. Sharma. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, 4:1886–1901, 01 2015.
- [3] C. W. Smith, J. Betrán, and E. C.A. Runge. *Corn: origin, history, technology, and production*, volume 4. John Wiley & Sons, 2004.
- [4] W. Kunze and HJ. Manger. *Technologie brauer und mälzer*. 1994.
- [5] R. C. Hoseney and J. A. Delcour. *Principles of cereal science and technology*. American Association of Cereal Chemists, Inc., 2010.
- [6] J. L. Jane, Y. Y. Chen, L. F. Lee, A. E. McPherson, K. S. Wong, M. Radosavljevic, and T. Kasemsuwan. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal chemistry*, 76(5):629–637, 1999.
- [7] T. Sasaki, T. Yasui, and J. Matsuki. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starches from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. *Cereal chemistry*, 77(1):58–63, 2000.
- [8] K. S. Sandhu and N. Singh. Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. *Food Chemistry*, 101(4):1499–1507, 2007.
- [9] J. S. Hough, D. E. Briggs, R. Stevens, and T. W. Young. *Malting and Brewing Science: volume II hopped wort and beer*. Springer, 2012.

[10] R. T. Morrison and R. N. Boyd. *Química orgánica*. Pearson educación, 1998.

[11] J. De Clerck. *A textbook of brewing*, volume 2. Chapman, 1958.

7 Anexo I: Cálculos iniciales

Previo elaboración de los mostos, se realizaron cálculos para cuantificar las cantidades de materias primas, enzimas y agua que se necesitan.

Se quiere elaborar un primer mosto de **24 °P** y cuyo volumen sea 400 mL, que después será diluido a 16 °P (concentración a la que se fermenta) con agua hasta 600 mL, aproximadamente. Se fijan las relaciones de empaste de 2,45 partes de agua por cada una de malta y, 2,5 para el caso del maíz.

Realizando los cálculos necesarios¹, para cada mosto (o réplica) elaborado, se necesitan **93,7 g de malta** con 229,5 mL de agua, y, **40,1 g de sémola de maíz** junto 100,3 mL de agua. Para ajustar la cantidad de agua adicional para lavar el bagazo se hicieron pruebas iniciales de tanteo empírico, ya que los 300 mL de agua adicional teóricos resultaron una dilución excesiva. Comprobamos que 270 mL era la cantidad correcta.

Tal y como se explica en el apartado de “**Empaste de adjuntos**”, se decidió elaborar el empaste de crudos con el doble de las cantidades realmente necesarias. Esto, se tuvo en cuenta para los cálculos que aquí continúan, y no influyó en el resultado final.

Las preparaciones enzimáticas, se encuentran en estado líquido. Como las especificaciones de las cantidades que se han de estudiar, están indicadas en gramos por tonelada de maíz, es necesario calcular el volumen correspondiente que se ha de añadir a cada empaste. En la Tabla 7.1, se muestran los datos utilizados para el cálculo del mismo, así como el volumen que se ha de pipetear y añadir a cada réplica.

La cantidad de CaCl_2 se ajustó a una concentración de 150 ppm. Teniendo en cuenta el volumen de agua que se utiliza en cada empaste, se obtiene una cantidad de 86 μL para los adjuntos y de 197 μL para la malta de cebada. Al igual que con el cálculo de las enzimas, el volumen que se añadió a cada empaste de los adjuntos fue el doble: 172 μL .

¹Se han tenido en cuenta los porcentajes fijados como objetivo, rendimientos de extracción y de equipos. También, las pérdidas por evaporación y absorción de agua en el bagazo.

Cuadro 7.1: Volumen de enzima que se ha de utilizar según especificación.

Enzimas y cantidades			
Enzima	Densidad (g/mL)	Especificación (g/TM)	Volumen (μ L)
Alfalisin	1,26	150	9,6
		250	15,9
		400	25,5
Beerzyme	1,15	150	10,5
		250	17,5
		400	27,9
Termamyl Classic	1,26	150	9,6
		250	15,9
		400	25,5
Termamyl SC	1,25	150	9,6
		250	16,1
		400	25,7

8 Anexo II: Figuras de resultados

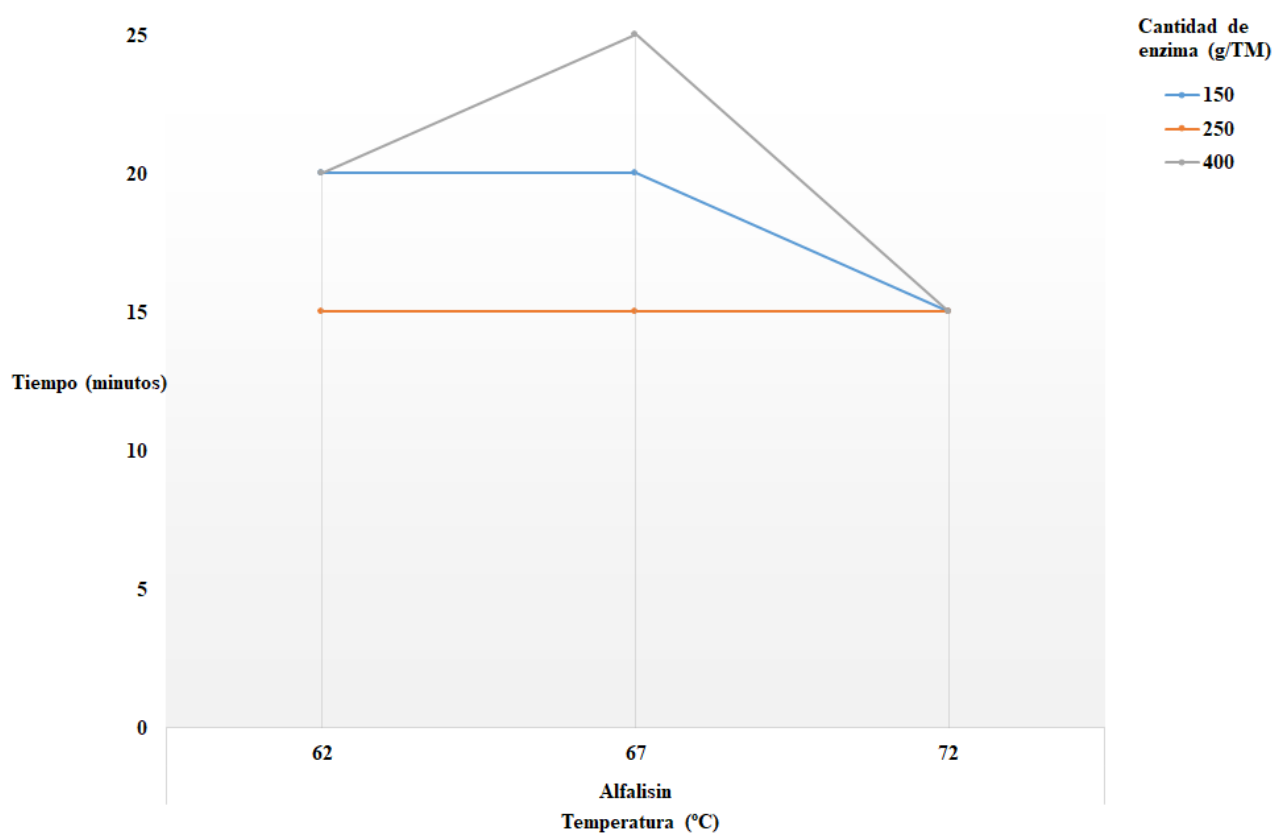


Figura 8.1: Variación del tiempo de sacarificación en función del escalonado de temperaturas en la enzima Alfalisin.

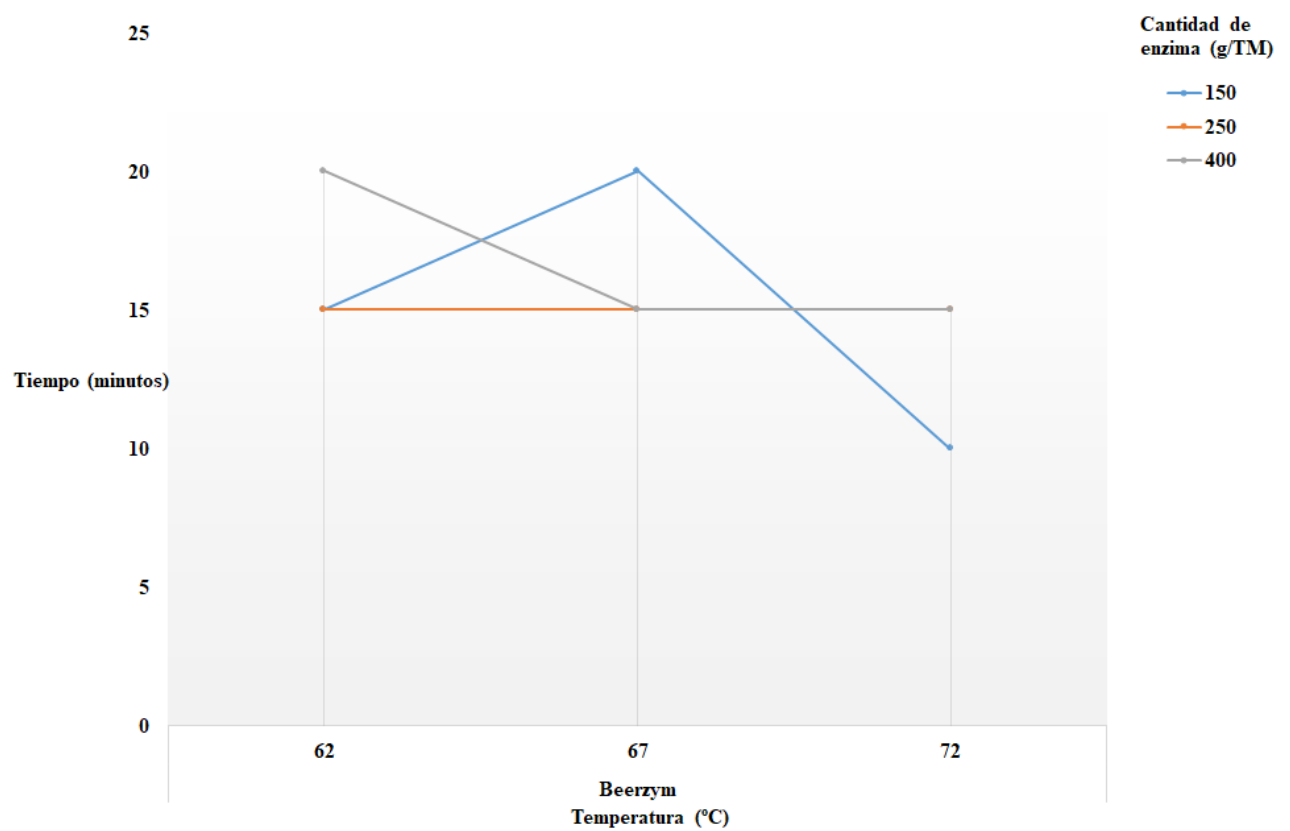


Figura 8.2: Variación del tiempo de sacarificación en función del escalonado de temperaturas en la enzima Beerzym.

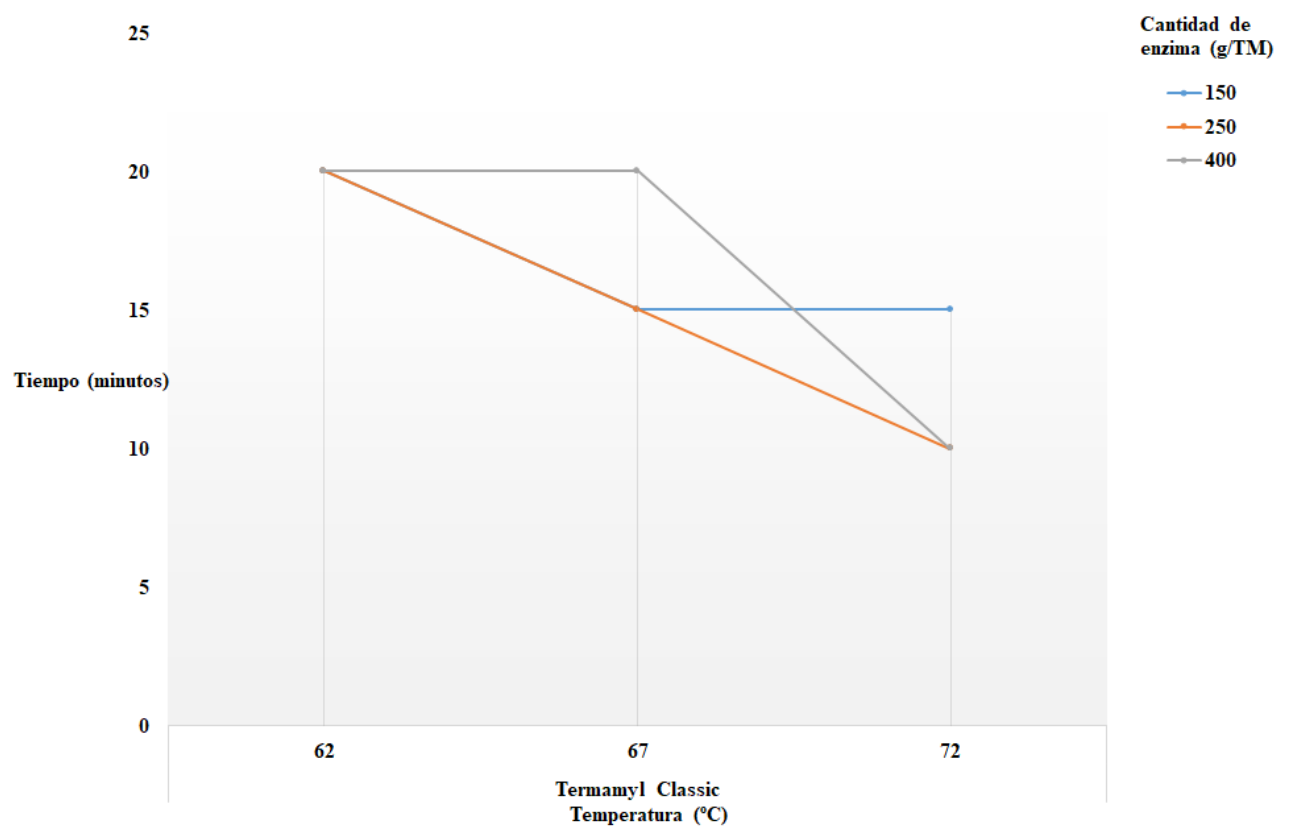


Figura 8.3: Variación del tiempo de sacarificación en función del escalonado de temperaturas en la enzima Termamyl Classic.

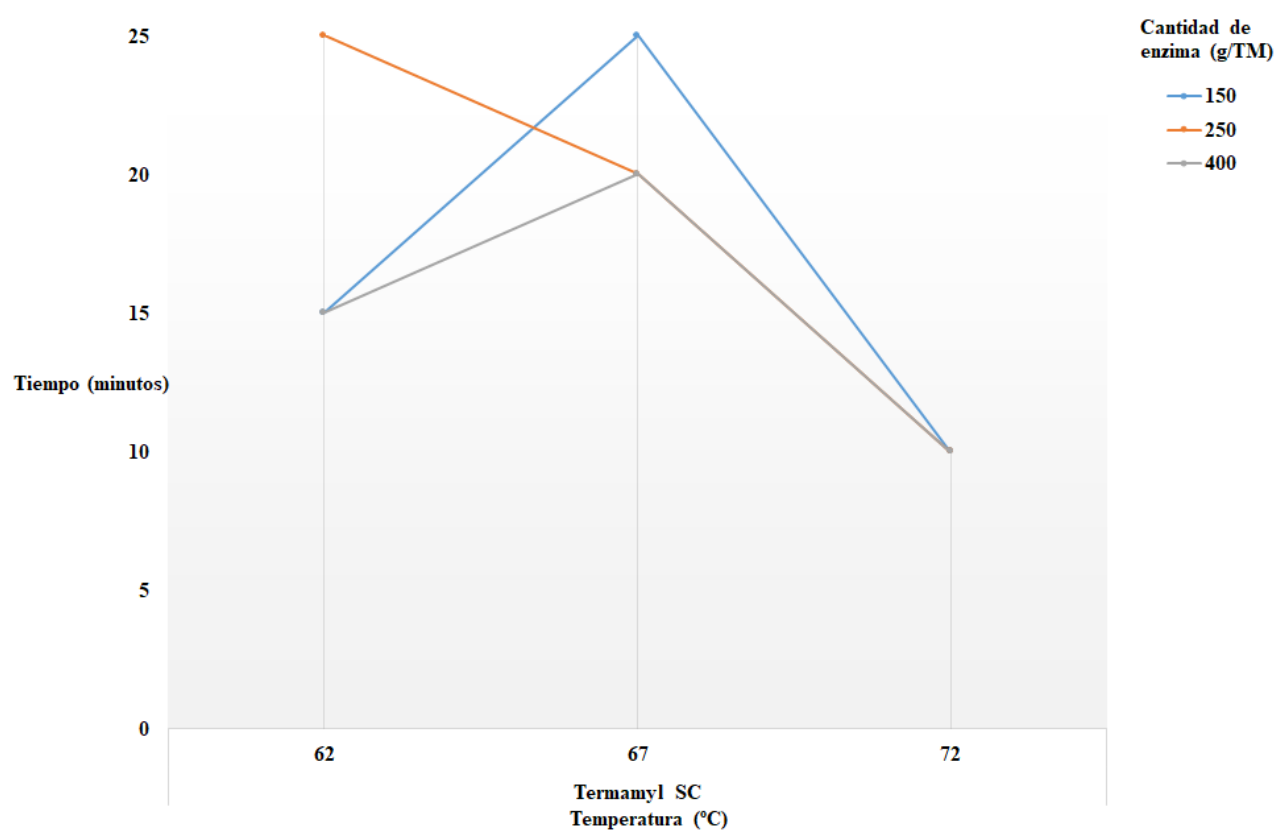


Figura 8.4: Variación del tiempo de sacarificación en función del escalonado de temperaturas en la enzima Termamyl SC.

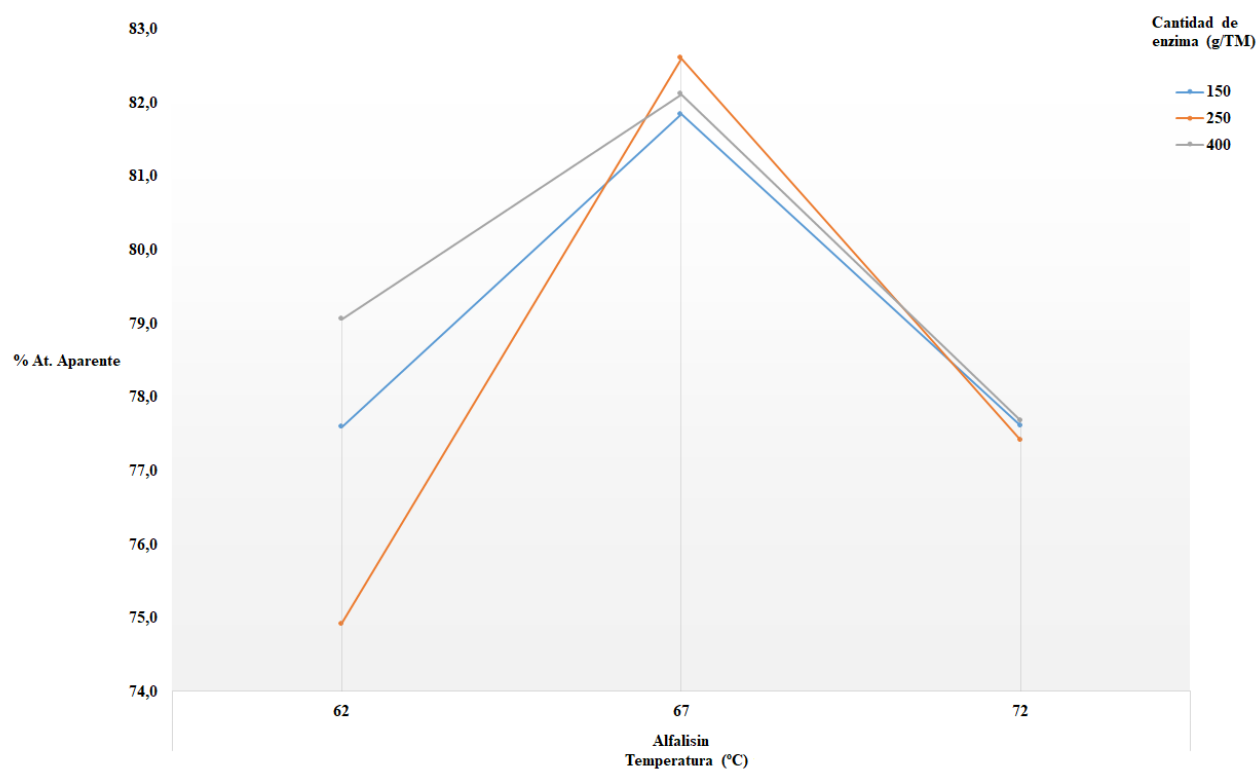


Figura 8.5: Variación de la atenuación aparente en función del escalonado de temperaturas en la enzima Alfalisin.

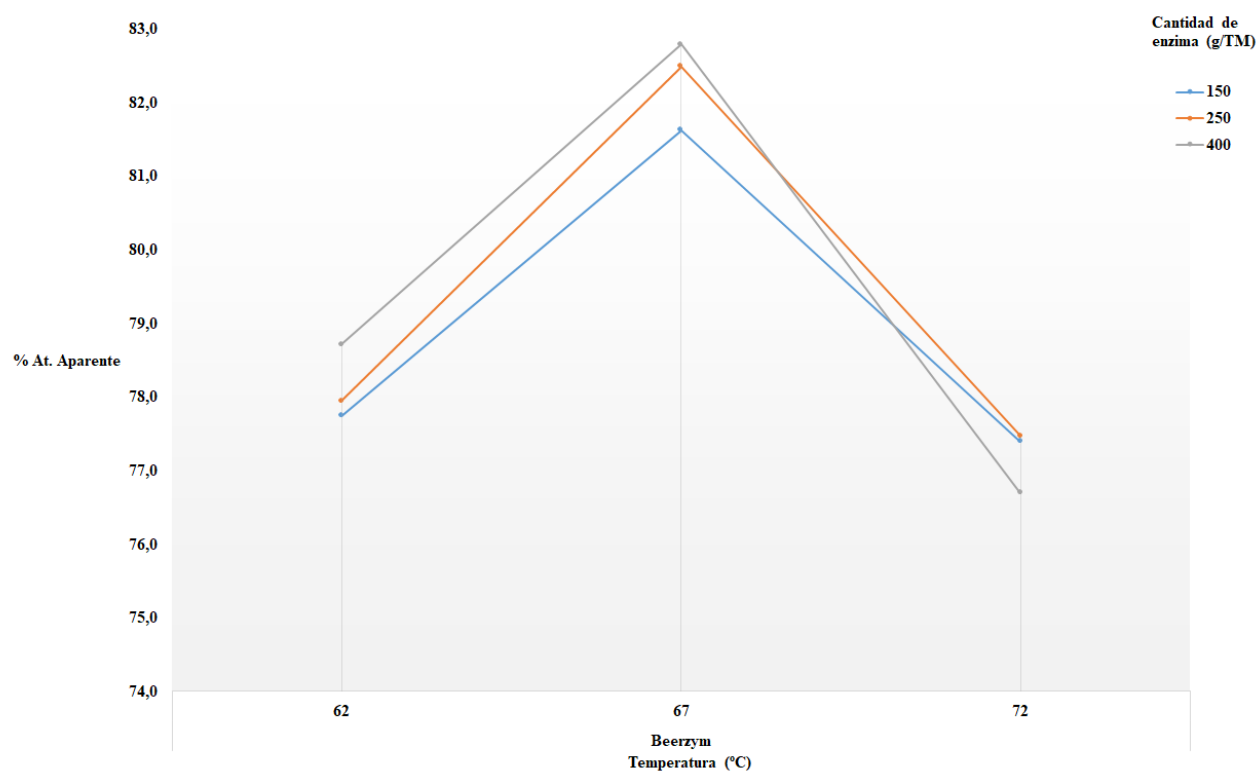


Figura 8.6: Variación de la atenuación aparente en función del escalonado de temperaturas en la enzima Beerzym.

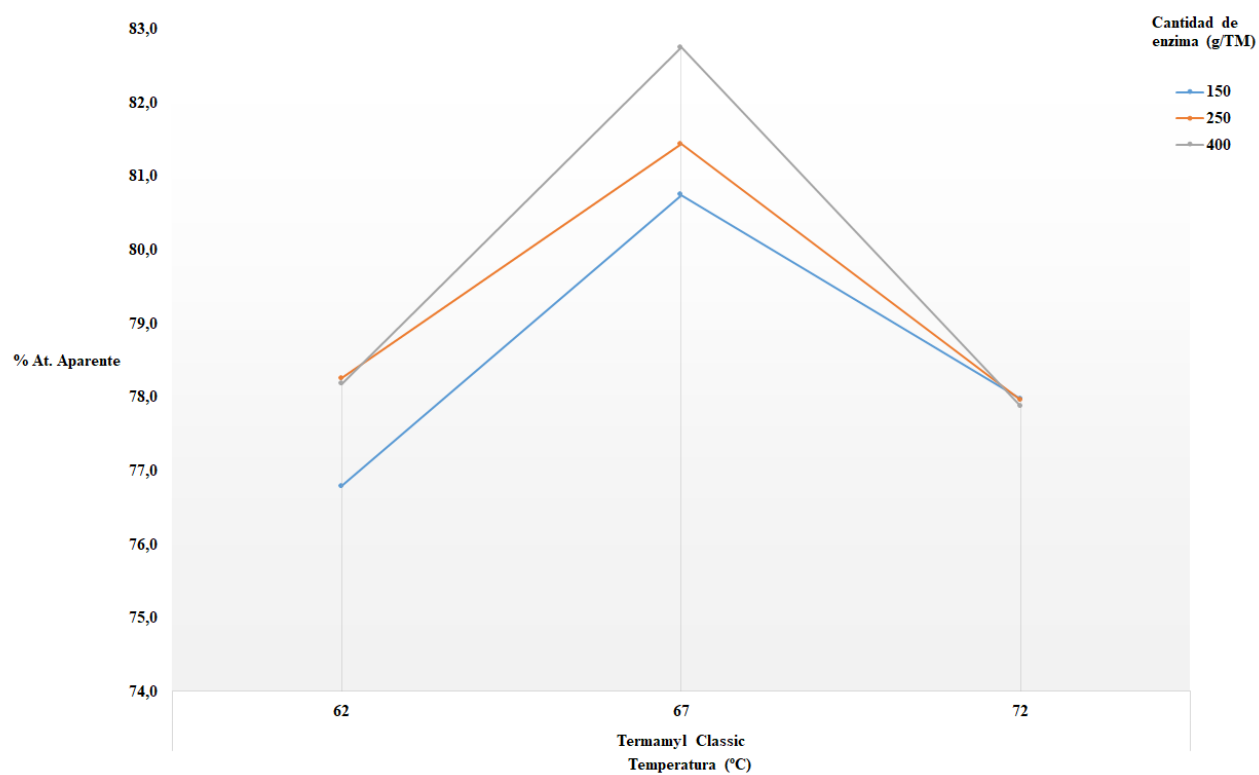


Figura 8.7: Variación de la atenuación aparente en función del escalonado de temperaturas en la enzima Termamyl Classic.

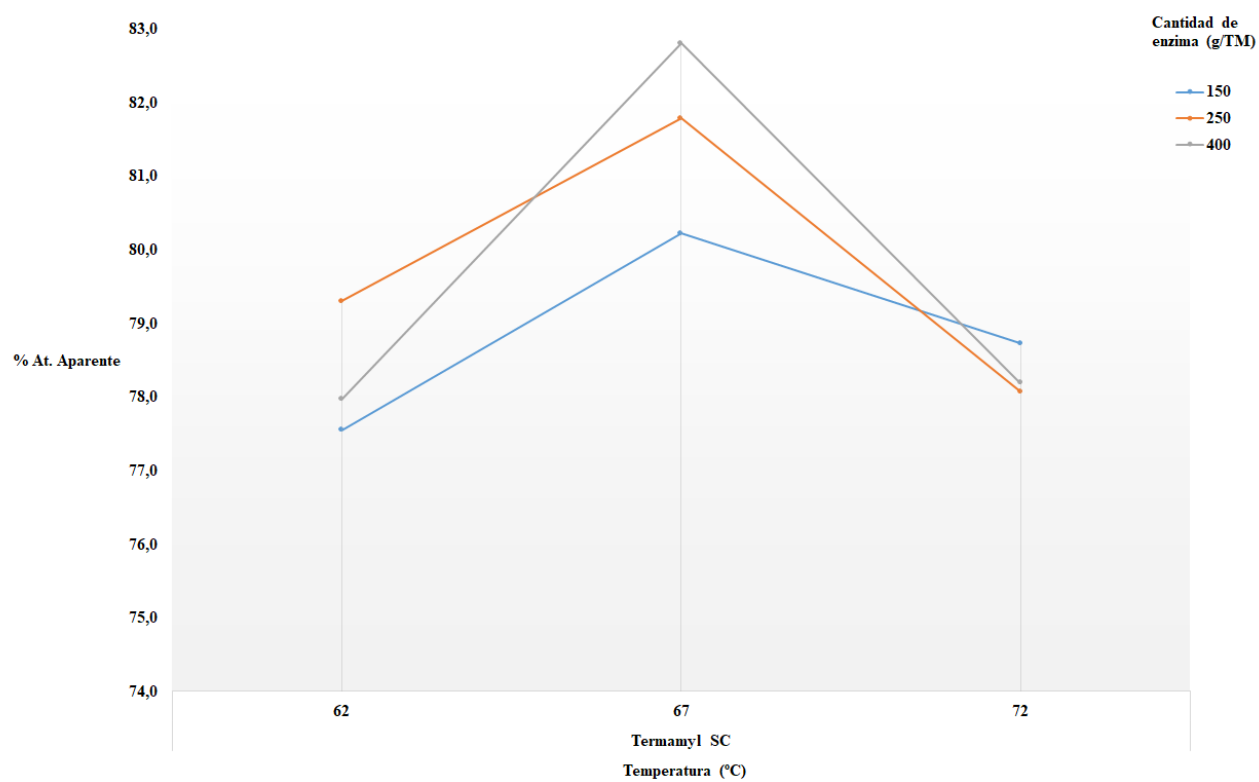


Figura 8.8: Variación de la atenuación aparente en función del escalonado de temperaturas en la enzima Termamyl SC.

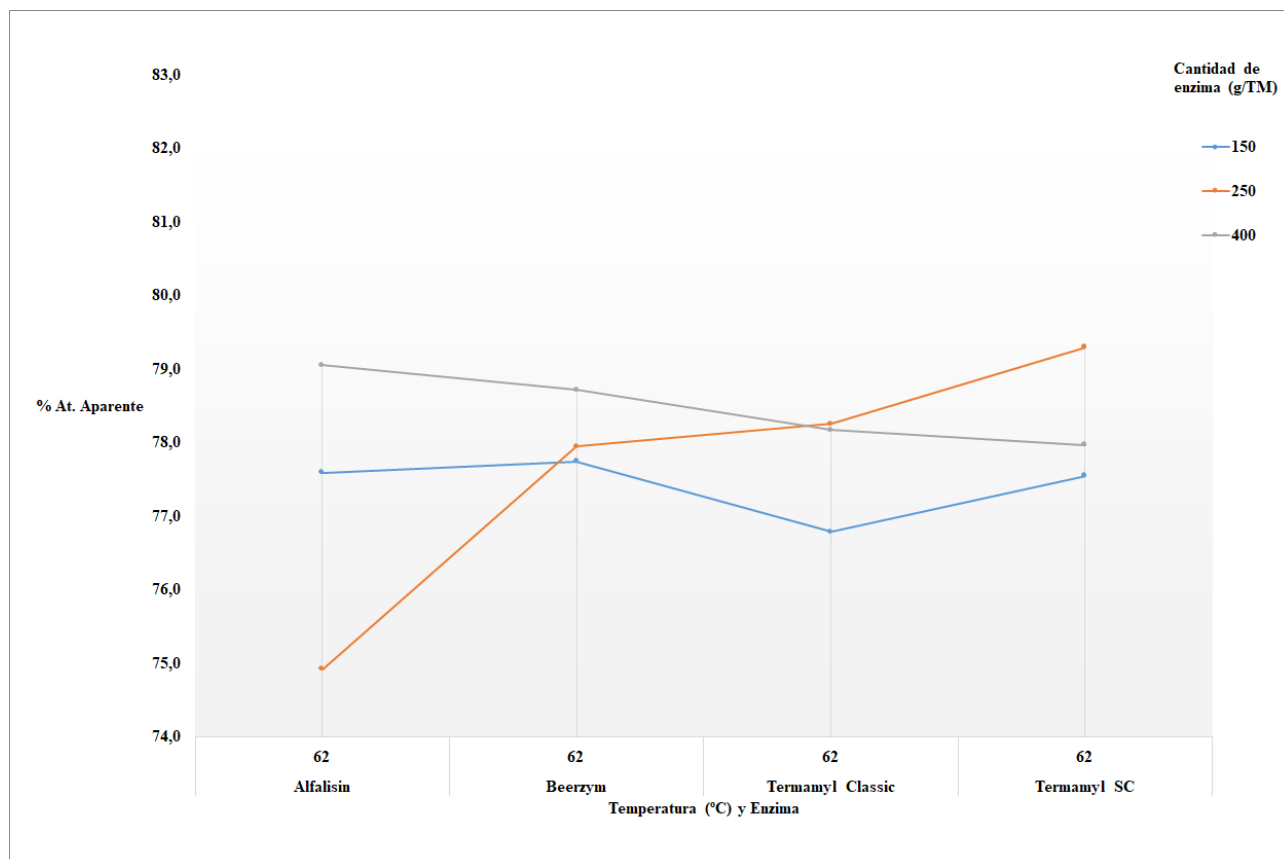


Figura 8.9: Variación de la atenuación aparente con escalonado a 62 °C en función de la enzima utilizada.

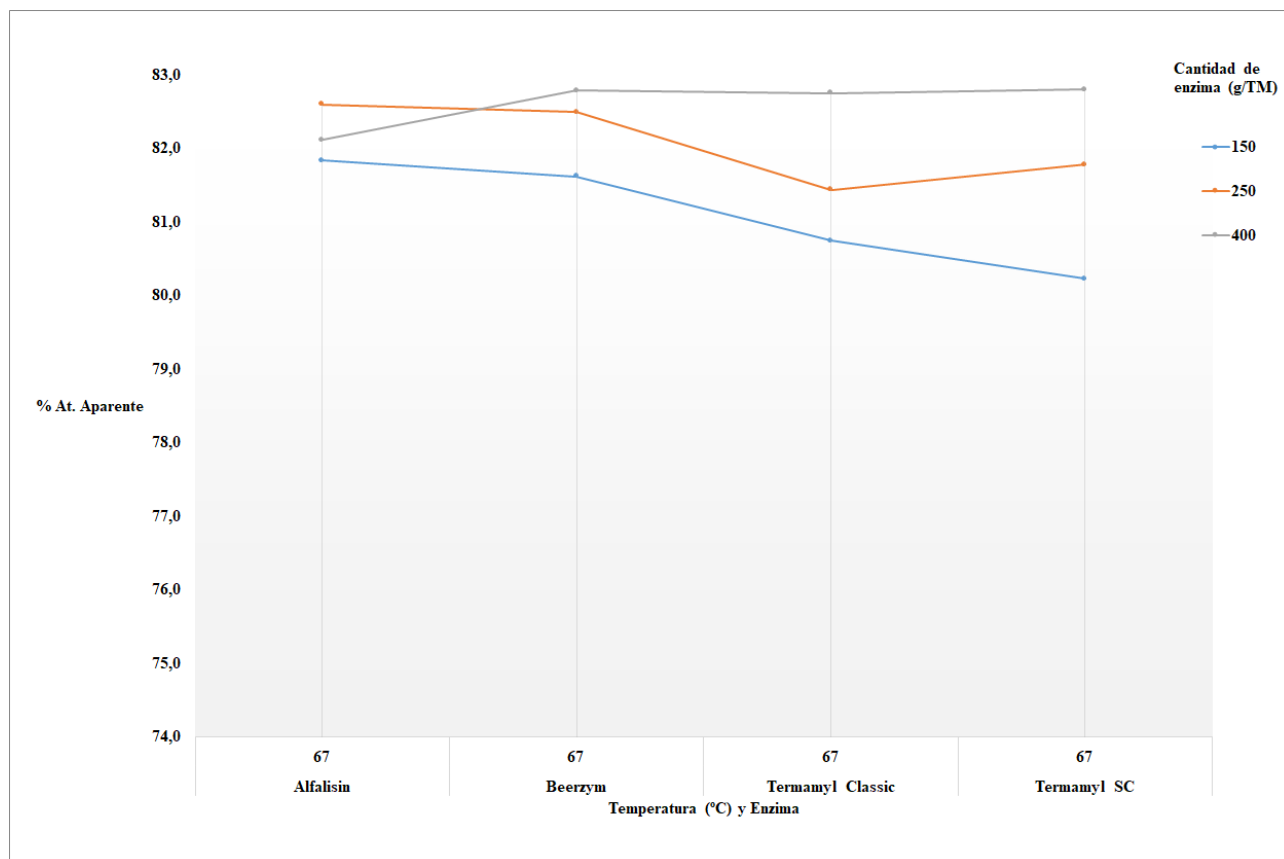


Figura 8.10: Variación de la atenuación aparente con escalonado a 67 °C en función de la enzima utilizada.

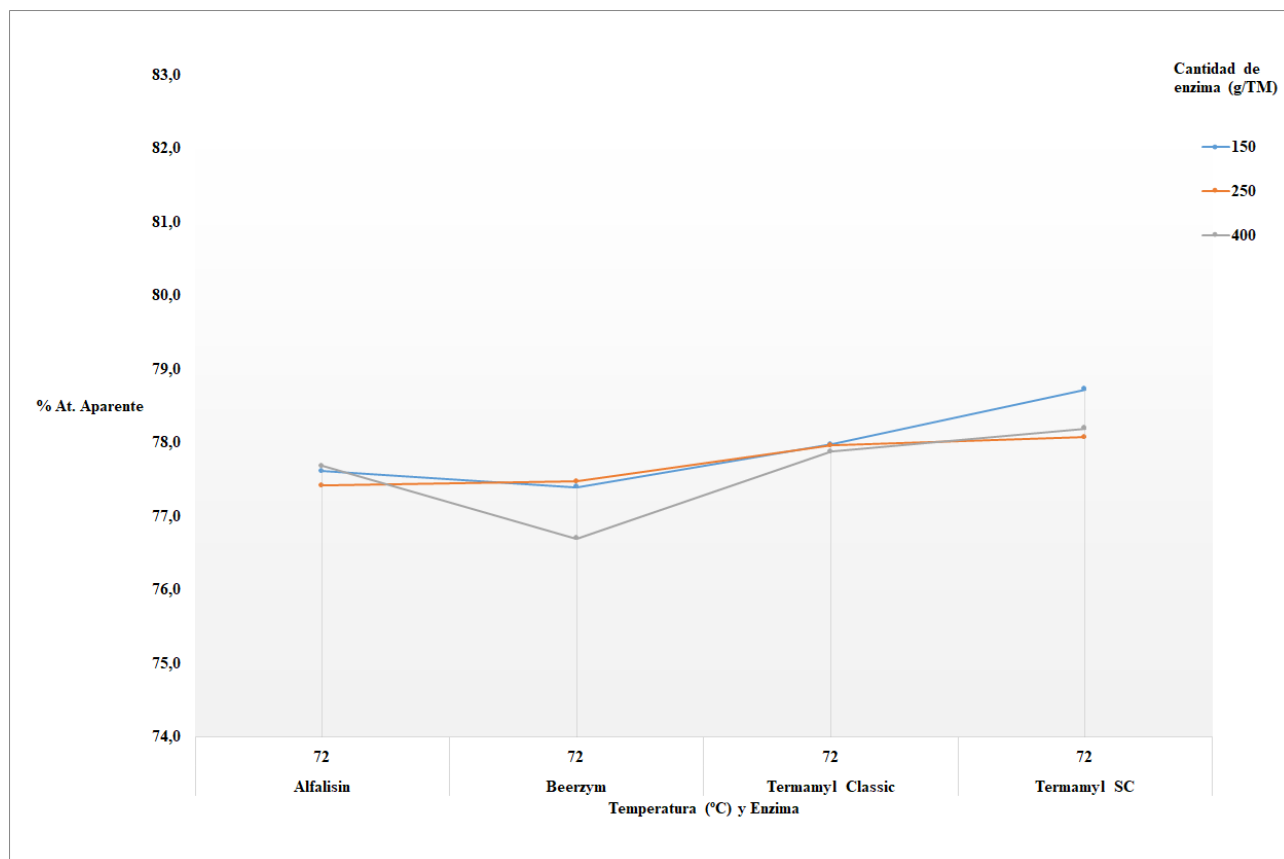


Figura 8.11: Variación de la atenuación aparente sin escalonado, 72 °C directos, en función de la enzima utilizada.

9 Anexo III: Análisis estadístico

Las tablas que en este Anexo se presentan, son capturas de pantalla, e imágenes por lo tanto, de los resultados ofrecidos por el programa SPSS. Así pues, se incluyen como Figuras.

Desviación Estándar - Experimentos

Desv. Desviación					
EXPERIMENTO	T_SACARIF	AT_AP			
A1	,000	,31763	C1	,000	,52608
A2	,000	,68070	C2	,000	,24254
A3	,000	,40211	C3	,000	,48829
A4	,000	,19511	C4	,000	,23670
A5	,000	,62109	C5	,000	,32004
A6	,000	,31458	C6	,000	,56145
A7	,000	,28123	C7	,000	,49719
A8	,000	,67510	C8	,000	,32088
A9	,000	,37430	C9	,000	,07394
B1	,000	,48066	D1	,000	,89705
B2	,000	,56258	D2	,000	,62102
B3	,000	,41339	D3	,000	,49820
B4	,000	,21626	D4	,000	,41524
B5	,000	,71630	D5	,000	,25736
B6	,000	,31805	D6	,000	,25487
B7	,000	,11177	D7	,000	,45144
B8	,000	,48726	D8	,000	,31807
B9	,000	,26133	D9	,000	,18980
			Total	4,247	2,16481

Figura 9.1: Comparación de las medias correspondientes a cada experiemnto realizado.

ANOVA (Enzima - T. Sacarificación)

T_SACARIF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	97,729	3	32,576	1,838	,143
Dentro de grupos	2463,810	139	17,725		
Total	2561,538	142			

ANOVA (Cantidad de Enzima - T. Sacarificación)

T_SACARIF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	39,375	2	19,688	1,093	,338
Dentro de grupos	2522,163	140	18,015		
Total	2561,538	142			

ANOVA (Temperatura - T. Sacarificación)

T_SACARIF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1181,219	2	590,610	59,903	,000
Dentro de grupos	1380,319	140	9,859		
Total	2561,538	142			

Figura 9.2: ANOVA de los tres factores más influyentes sobre el Tiempo de Sacarificación.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: T_SACARIF

Scheffé

(I) TEMPERATURA	(J) TEMPERATURA	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
62	67	-,346	,644	,866	-1,94	1,25
	72	5,904*	,644	,000	4,31	7,50
67	62	,346	,644	,866	-1,25	1,94
	72	6,250*	,641	,000	4,66	7,84
72	62	-5,904*	,644	,000	-7,50	-4,31
	67	-6,250*	,641	,000	-7,84	-4,66

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 9.3: Análisis de Scheffé sobre las Temperaturas y el Tiempo de Sacarificación.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: T_SACARIF

Scheffé

(I) CANTIDAD_ENZ	(J) CANTIDAD_ENZ	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
150	250	,869	,871	,609	-1,29	3,02
	400	-,381	,871	,909	-2,54	1,77
250	150	-,869	,871	,609	-3,02	1,29
	400	-1,250	,866	,356	-3,39	,89
400	150	,381	,871	,909	-1,77	2,54
	250	1,250	,866	,356	-,89	3,39

Figura 9.4: Análisis de Scheffé sobre la Cantidad de Enzima y el Tiempo de Sacarificación.

ANOVA (Enzima - Atenuación Aparente)

AT_AP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,487	3	1,162	,244	,865
Dentro de grupos	661,983	139	4,762		
Total	665,470	142			

ANOVA (Cantidad de Enzima - Atenuación Aparente)

AT_AP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12,591	2	6,295	1,350	,263
Dentro de grupos	652,880	140	4,663		
Total	665,470	142			

ANOVA (Temperatura - Atenuación Aparente)

AT_AP

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	545,363	2	272,681	317,843	,000
Dentro de grupos	120,108	140	,858		
Total	665,470	142			

Figura 9.5: ANOVA de los tres factores más influyentes sobre la Atenuación Aparente.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: AT_AP
Scheffe

(I) TEMPERATURA	(J) TEMPERATURA	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
62	67	-4,09329 *	,19007	,000	-4,5636	-3,6230
	72	,08233	,19007	,911	-,3879	,5526
67	62	4,09329 *	,19007	,000	3,6230	4,5636
	72	4,17563 *	,18907	,000	3,7078	4,6434
72	62	-,08233	,19007	,911	-,5526	,3879
	67	-4,17563 *	,18907	,000	-4,6434	-3,7078

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 9.6: Análisis de Scheffé sobre las Temperaturas y la Atenuación Aparente.