

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



ACTIVIDADES DE BETA-GLUCANASAS DE MALTA
DE CEBADA EN SUSTRATO NATURAL Y EN
LAMINARINA.

248

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

LIN MORENO AÑORVE

1 9 7 5



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
ADQ. 1975
FECHA
PROC. M. C. 238



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ENRIQUE GARCIA GALEANO.

VOCAL: ANGELA SOTELO LOPEZ.

SECRETARIO: JORGE SOTO SORIA.

1er. SUPLENTE: ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN.

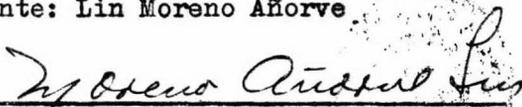
2o. SUPLENTE: RUBEN BERRA GARCIA Y COSS.

Sitio donde realizo el tema; Laboratorio de cebada,

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Chapingo Mex.

Sustentante: Lin Moreno Añorve.

Firma:



Asesor: Angela Sotelo López.

Firma:



ESTA TESIS SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO DE CEBADA
PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE CEREALES DEL INSTITUTO
NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS CHAPINGO MEX.
BAJO LA DIRECCION DEL DR. ANDRES IRUEGAS EVARISTO.

A MIS PADRES
LUCINA A. DE MORENO
RODOLFO MORENO GALVEZ
POR EL APOYO QUE SUPIERON DARME

A MIS MAESTROS
QUE ME DIERON
LOS CONOCIMIENTOS
NECESARIOS

A COMPAÑEROS Y
AMIGOS QUE SUPIERON
ALENTARME EN LOS MOMENTOS
DIFICILES.

EXPRESO MI AGRADECIMIENTO A :

DR. ANDRES IRUEGAS EVARISTO

ING. BIOQUIMICO HECTOR CEJUDO GOMEZ

A TODO EL PERSONAL DE LABORATORIOS

DE CEREALES INIA

CONTENIDO

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Historia de la cerveza
La industria cervecera en México
Beta glucanas y beta glucanasas en cerveza

MATERIAL Y METODOS

Experimento para encontrar la concentración adecuada de enzima con máxima actividad a los treinta minutos.
Determinaciones de actividades de beta glucanasas en laminarina por el método reducto métrico.
Determinaciones de calidad maltera
Análisis Estadístico.

RESULTADOS

Tablas de resultados
Correlaciones significativas de los metodos reductométrico y viscométrico con los facto res de calidad y la correlación entre ellos.
Correlaciones significativas entre los facto res de calidad.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

En el proceso de la fabricación de la cerveza se presentan problemas en su filtración implicando la pérdida de tiempo y energía, una de las causas de este problema es la presencia de un polisacarido (beta-glucan).

Para resolver este problema se han hecho pruebas para determinar la actividad de la enzima beta-glucanasa presente en la cebada, que es la que degrada dicho polisacárido. En una de estas pruebas se empleó un sustrato comercial para cuantificar la actividad de la enzima.

Este estudio se hizo con el objeto de estudiar la posibilidad de efectuar la determinación de la actividad de la enzima sobre sustrato natural (método muy laborioso, poco funcional para pruebas en gran escala) y comparar la prueba con las efectuadas por otros técnicos en sustratos comerciales.

GENERALIDADES

Historia de la Cerveza.

Casi todos los pueblos de la tierra han elaborado bebidas alcohólicas, desde los tiempos prehistóricos, unas veces han empleado para ello materias azucaradas como: miel, zumos de palmeras o pitas, frutos, leche, etc.; mientras que otros se han valido de materias feculentas obteniendo de éstas últimas la cerveza.

Los egipcios atribuyeron la invención de la cerveza a Osiris. Con los granos de cebada obtenían la malta, aromatizaban el extracto acuoso con azafrán y otras especies, después lo dejaban fermentar.

El empleo de lúpulo se inició en la edad media, probablemente para conservar la cerveza, pero el sabor amargo que le confiere, se ha convertido en el carácter esencial de la misma. Desde la edad media a la actualidad, han habido muchos adelantos técnicos en la fabricación de la cerveza y ha adquirido una calidad que antes no se le exigía, pero, básicamente sigue siendo lo mismo: una bebida fermentada efervescente de malta de cebaza aromatizada con lúpulo, y de color ámbar, que puede llegar a ser pálido (11)

La Industria Cervecera en México:

Esta industria representa un papel importante en el desarrollo económico, dentro de las industrias manufactureras -- del país ocupa el quinto lugar, por cuanto al valor de su producción y el tercero en cuanto al monto de salarios que paga -- a sus empleados y obreros (14).

La industria cervecera ha propiciado la creación y florecimiento de otras industrias, que le suministran diversos -- productos y materiales; entre las que se encuentran la industria vidriera, la de fabricación de latas, corcholatas, cartón y etiquetas.

En 1970 tributó al fisco en números redondos 319 millones de pesos, por concepto de impuestos sobre la producción y consumo de cerveza, por lo que se encuentra en el primer lugar dentro del catálogo de los impuestos federales, sin ningún problema de recolección.

Beta-glucanas y beta-glucanasas en cerveza.

La utilización de la cebada como un adjunto en cervecería, se ha estudiado por la posibilidad que ofrece de disminuir los costos de la producción de cerveza, debido a que se ahorraría el proceso de malteo. Este concepto no es nuevo ya que en los Estados Unidos y en Alemania se usó como adjunto después de

la Segunda Guerra Mundial. Eso se hizo en una proporción del 10 al 20% de cebada con 90 a 80% de malta, presentando resultados bastante satisfactorios.

Si se emplean enzimas para la degradación de carbohidratos, puede aumentarse la cantidad de cebada ya que la elevación de la viscosidad atribuible a beta-glucanas presentes en la misma, será disminuída con el uso de las enzimas apropiadas.

El beta-glucan es un polisacarido perteneciente al grupo de las hemicelulosas, que se encuentran en las paredes celulares de las células del endospermo del grano de cebada.

Este polisacarido se encuentra formado por cadenas lineales de unidades de glucopiranosas unidas en las posiciones beta 1,3 y beta 1,4; la estructura parece que no es regular en cuanto a la distribución del tipo de enlace, encontrándose pequeños grupos que varían de una a cuatro unidades de glucosa con uniones beta 1,3 ó beta 1,4; estos grupos se encontraron distribuídos al azar a través de la molécula.

El polisacarido motivo de estudio es degradado por la acción de las enzimas beta-glucanasas, las cuales aumentan su actividad durante el malteo; estas beta-glucanasas son las siguientes:

1) Endo beta-1,3 glucanasa que como su nombre lo indica, ataca unicamente los enlaces beta 1,3.

2) Endo beta-1,4 que rompe los enlaces beta 1,4.

3) Endo cebada-beta-glucanasa que solo es activa en el beta-glucan presente en la cebada.

Estas enzimas al actuar sobre beta glucanas y sobre laminarina (polisacarido lineal con enlaces beta 1,3 únicamente) han producido los siguientes resultados:

La endo beta 1,3 glucanasa no hidroliza estos enlaces - en glucanas, pero si solubiliza este polisacarido, es decir lo libera de las paredes de las células del endospermo.

La endo beta 1,4 glucanasa y la endo cebada glucanasa - producen mayores cantidades de glucosa en beta glucanas como sustrato que en laminarina, siendo esto lógico, ya que esta última no tiene enlace beta 1,4; aunque estas dos enzimas producen niveles moderados de oligo-sacaridos con ambos sustratos.

(26)

Durante la germinación de la cebada se encontró que la actividad de la endo-beta-1,4 glucanasa no aumenta apreciablemente, sin embargo la actividad de las endo-beta-1,3 glucanasa y endo cebada beta glucanasa aumentan sustancialmente.

También hay otro tipo de enzimas beta en la cebada, llamadas beta glucosidasas que son exoenzimas. Estas enzimas durante la germinación aumentan en su actividad.

El papel que las beta-glucanas representan es dar consistencia al mosto, pero esta consistencia está regulada por la

acción de las beta-glucanasas. Si la acción de estas enzimas no es efectiva, se tienen problemas durante la filtración por la cantidad excesiva de glucanas no degradadas.

Para resolver este problema se han hecho varios estudios uno de ellos el de Iruegas A. y colaboradores, (24) en el que se probó estas enzimas sobre la laminarina, sustrato comercial de más fácil adquisición que el sustrato natural, para medir su actividad. Los resultados de esta prueba se relacionaron a factores de calidad tales como: viscosidad del estrato, por ciento de proteína total, porcentaje de proteína soluble, - alfa amilasa, poder diastásico, etc., para ver de que forma -- son afectadas y como se puede medir a través de ellas la eficiencia de estas enzimas.

En el presente estudio, se probó la actividad de la enzima beta-glucanasa sobre sustrato comercial (laminarina) y sobre sustrato natural (glucanas); comparándose los resultados -- entre ambas pruebas para saber si la primera es extrapolable a la segunda; ya que la primera (con sustrato comercial) es mas sencilla de realizar. También en este estudio se comparan las dos pruebas antes mencionadas (actividad de la enzima sobre -- sustrato comercial y sobre sustrato natural) con los factores de calidad, para saber en que forma se relaciona la actividad de estas enzimas (beta-glucanasas) con los demás factores de -- calidad.

MATERIAL Y METODOS

La cebada usada para realizar este trabajo fue proporcionada por el Departamento de Cereales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Corresponde al material experimental procedente de Roque Edo. de Gto. del ciclo de siembra de diciembre 1973-marzo 1974. De este material se tomaron muestras de cebada de seis hileras, las cuales se maltearon según Banasik, O. J. 1971 (7,8).

Estas muestras se usaron como fuente enzimática, y como fuente de sustrato se usó cebada de la variedad Porvenir, cosechada en Roque en abril de 1974.

Este método se basa en la disminución de viscosidad durante veinticinco minutos de digestión que presenta un macerado primario de cebada debido a la actividad de un extracto enzimático de malta, estabilizado por un buffer de acetato, 1 molar y pH 4.6 descrito por Iruegas y colaboradores, (24) con excepción de la adición de Na OH 0.2 normal.

La solución enzimática usada, se preparó de acuerdo al método de extracción especificado para alfa amilasa y poder diastásico en los métodos de análisis de la A. S. B. C. (1).

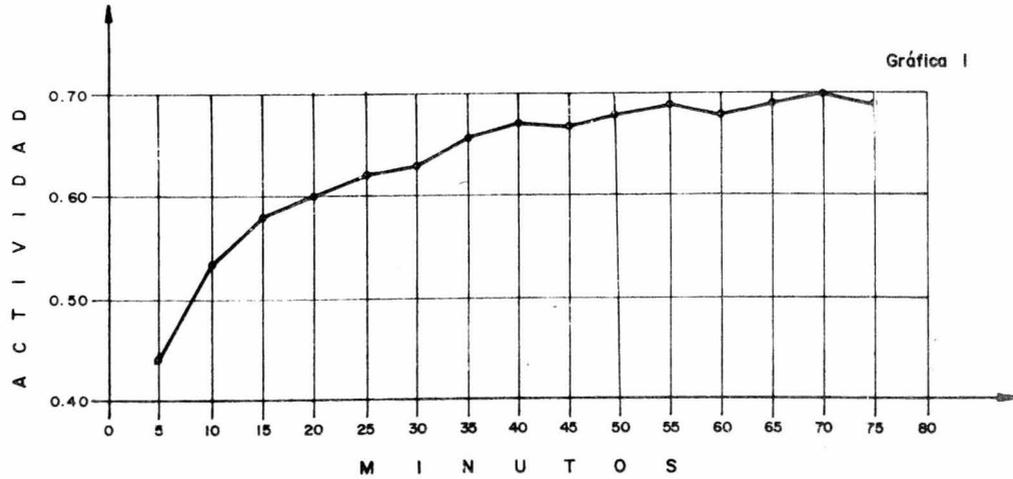
La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo con un mililitro de la solución enzimática diluída a 10 ml. con el buffer de acetato; todo lo anterior completado a un

volumen de 100 ml. con el macerado de cebada, las lecturas se efectuaron en el viscosímetro de Ostwald No. 11 a una temperatura estable de treinta grados centígrados.

→ Experimento para encontrar la concentración adecuada de enzima con máxima actividad a los treinta minutos.

En este estudio se hicieron varias gráficas (ver gráficas 1, 2, 3, 4), con los datos obtenidos en las diferentes -- pruebas que consistieron en medir la disminución de la viscosidad con respecto al tiempo, usando concentraciones diferentes del extracto enzimático para cada estudio, y un tiempo de digestión de cuarenta minutos para saber el momento de estabilización de la viscosidad con respecto al tiempo y el lapso -- de reacción lineal. Se varió la concentración del extracto enzimático en cada estudio. Se tomaron lecturas cada cinco minutos para conocer la actividad enzimática y el momento de estabilización de la viscosidad (ver gráficas 1, 2, 3 y 4). De esta manera se encontró que la concentración necesaria para -- efectuar la reacción en la fase lineal o cinética de 1er. orden y con un tiempo de reacción de treinta minutos es de 1% ó sea 0.1 ml. del extracto enzimático con 0.9 ml. del buffer -- acetato, y bajo las condiciones de pH y temperatura constantes antes mencionadas (24), ver gráfica 4.

25 % de Extracto Enzimático



DATOS DE LA GRAFICA 1

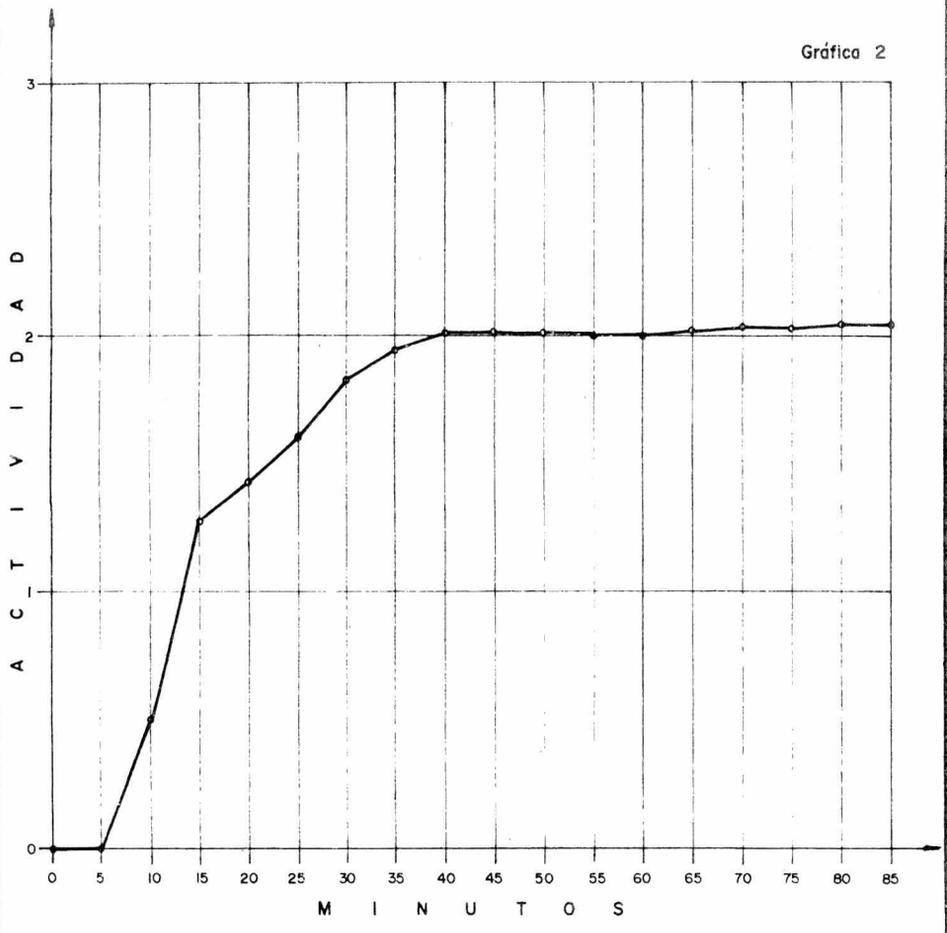
| No. de Observación | Minutos | Viscosidad cp ⁺ | Actividad cp ⁺ (1) |
|--------------------|---------|----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 0 | 1.98 | 0 |
| 2 | 5 | 1.54 | 0.44 |
| 3 | 10 | 1.45 | 0.53 |
| 4 | 15 | 1.40 | 0.58 |
| 5 | 20 | 1.38 | 0.60 |
| 6 | 25 | 1.36 | 0.62 |
| 7 | 30 | 1.35 | 0.63 |
| 8 | 35 | 1.32 | 0.66 |
| 9 | 40 | 1.31 | 0.67 |
| 10 | 45 | 1.31 | 0.67 |
| 11 | 50 | 1.30 | 0.68 |
| 12 | 55 | 1.21 | 0.69 |
| 13 | 60 | 1.30 | 0.68 |
| 14 | 65 | 1.29 | 0.69 |
| 15 | 70 | 1.28 | 0.70 |
| 16 | 75 | 1.29 | 0.69 |

+ centi poise.

(1) La viscosidad se calculó restando a la lectura de viscosidad para cada observación a la lectura del blanco.

2.5 % de Extracto Enzimático

Gráfica 2



Datos Gráfica 2.

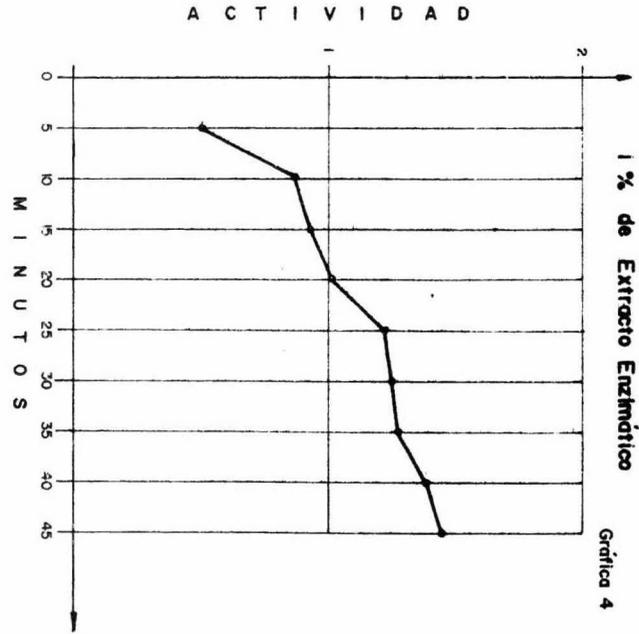
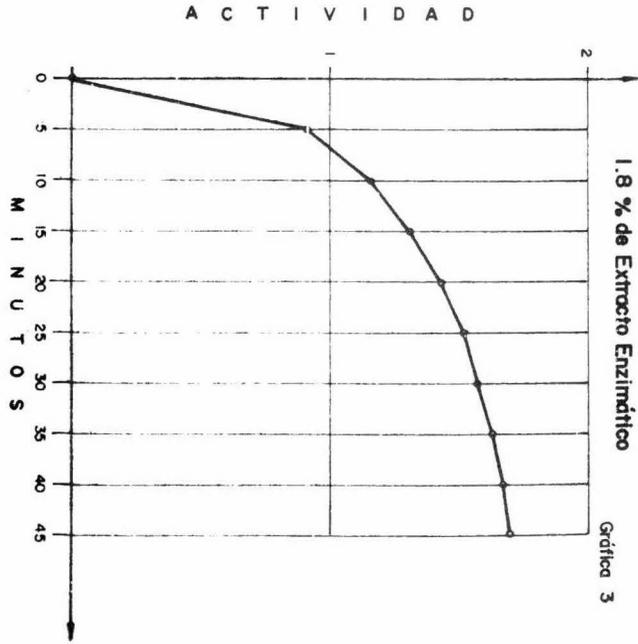
S= Extracto de cebada con solución salina 0.5 %

1 ml 1/4 extracto enzimático + 9 ml de S
 3/4 de buffer

| No. de Observación | Minutos | Viscosidad (cp) ⁺ | Actividad (cp) ⁺ |
|--------------------|---------|------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 5 | 2.73 | 0.98 |
| 2 | 10 | 2.46 | 1.25 |
| 3 | 15 | 2.07 | 1.64 |
| 4 | 20 | 2.00 | 1.71 |
| 5 | 25 | 1.91 | 1.80 |
| 6 | 30 | 1.80 | 1.91 |
| 7 | 35 | 1.74 | 1.94 |
| 8 | 40 | 1.69 | 2.02 |
| 9 | 45 | 1.68 | 2.03 |

cp⁺ = centi-poise

Nota: La actividad de estos datos se calculó igual que para -- los datos de la gráfica 1.



Gráfica No. 3

| No. de Observación | Tiempo en Minutos | Viscosidad cp ⁽⁺⁾ | Actividad ^(') cp ⁽⁺⁾ |
|--------------------|-------------------|------------------------------|--|
| | | 3.43 | --- |
| 1 | 5 | 2.52 | 0.91 |
| 2 | 10 | 2.27 | 1.16 |
| 3 | 15 | 2.11 | 1.32 |
| 4 | 20 | 1.99 | 1.44 |
| 5 | 25 | 1.91 | 1.52 |
| 6 | 30 | 1.86 | 1.57 |
| 7 | 35 | 1.80 | 1.63 |
| 8 | 40 | 1.76 | 1.67 |
| 9 | 45 | 1.73 | 1.70 |

(+) cp = centi-poise.

(') La actividad se calculó restando la lectura obtenida de -- viscosidad en cp a la lectura obtenida en el blanco correspondiente.

Gráfica N^o. 4

Valores de actividad enzimática a diferentes tiempos.

| No. de Observación | Tiempo en Minutos | Viscosidad cp | Actividad ⁽⁺⁾ cp |
|--------------------|-------------------|---------------|-----------------------------|
| 1 | 5 | 2.84 | 0.50 |
| 2 | 10 | 2.47 | 0.87 |
| 3 | 15 | 2.41 | 0.93 |
| 4 | 20 | 2.26 | 1.08 |
| 5 | 25 | 2.12 | 1.22 |
| 6 | 30 | 2.09 | 1.25 |
| 7 | 35 | 2.07 | 1.27 |
| 8 | 40 | 1.96 | 1.38 |
| 9 | 45 | 1.90 | 1.40 |

(+) Actividad enzimática en cp (centi-poise).

Se usó como base un blanco con viscosidad 3.34 cp en el -- que se empleó enzima inactivada e ebullición durante cinco minutos.

Determinación de actividades de beta-glucanasas en laminarina por el método reductométrico.

Esta determinación se hizo de acuerdo a Iruegas (24) con algunas modificaciones en el proceso de la diálisis que fueron:

a) El extracto enzimático se dializó a cuatro grados centígrados por 24 horas sin agitación, en lugar de dos grados centígrados con agitación.

b) Con cambio de la solución salina a las ocho horas de diálisis, en lugar de a las doce horas como se hizo en el mencionado estudio.

Las actividades se determinaron según el método descrito por Witt y Banasik (43), midiendo el aumento del poder reductor de una solución de laminarina por la acción de beta-glucanasas y se reportaron como micro-moles de glucosa en $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de peso seco de la muestra original.

La concentración de sustrato, el tiempo de reacción, temperatura y pH fueron tomados del mismo estudio. (42) La laminarina usada como sustrato fue obtenida de K and K Laboratories, Inc. 121 Express Street, Plainview, New York.

Determinaciones de Calidad Maltera.

Para la determinación de los factores de calidad maltera se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

Peso de mil granos:

Peso en gramos de 200 granos x 5 = peso en gramos de

1000 granos en BH

Peso en gramos de 1000 granos (BS) = Peso en gramos de

1000 granos BH-

$$-\frac{\text{Peso en gramos de 1000 granos} - \% H}{100};$$

Donde:

BH = base húmeda

BS = base seca

% H = por ciento de humedad

Clasificación del grano:

Usando la criba con perforaciones de 6/64 x 3/4" (T6)-

para cuantificar grano lleno, se clasifican como tales los re

tenidos en la criba mencionada; y los granos que atraviesan -

la malla de 5/64 x 3/4" (T5) se clasifican como grano fino; in

de de llenado (ILL) que se calcula según la fórmula:

$$A + 5 (B) + 4 (C) = ILL$$

Donde:

A = % de grano retenido en la malla 6/64.

B = % de grano retenido en la malla 5/64.

C = % de grano que pasa la malla 5/64.

sugerida por Banasik (3).

Por ciento de proteína total (PT):

Se llevó a cabo por el método Kjeldahl y el resultado - se calculó según la siguiente fórmula

$$\%N = \frac{(\text{ml. de H}_2\text{SO}_4 \text{ para M} - \text{ml. de H}_2\text{SO}_4 \text{ para T}) \times N \times \text{meq N} \times 100}{\text{peso de muestra}}$$

$$\% \text{ de proteína} = \% N \times 6.25$$

$$BS = \frac{\% \text{ de proteína} \times 100}{100-H}$$

ml. de H₂SO₄ para M = ml de H₂SO₄ necesarios para titular la -
muestra.

ml. de H₂SO₄ para T = ml. de H₂SO₄ necesarios para titular el -
testigo.

% N = % de nitrógeno

N = normalidad

meq N = miliequivalente de nitrógeno

BS = base seca

M = muestra

T = testigo

Porcentaje de proteína soluble (PS):

Se hizo por el mismo método que la proteína total, sólo que en lugar de emplear 1 g. de muestra se usan 25 ml. del extracto de malta, preparada según el método ASBC (1) y la fórmula empleada fue:

$$\% \text{ proteína soluble} = \frac{(\text{ml. de H}_2\text{SO}_4 \text{ para M.} - \text{ml. de H}_2\text{SO}_4 \text{ para testigo}) \times N \times 4 \times \% \text{ E (BS)} \times 6.25}{\text{gravedad específica del mosto} \times \text{plato}}$$

N = normalidad del ácido sulfúrico.

% E (BS) = por ciento de extracto en base seca.

relación de proteína soluble sobre total (ST) donde:

$$ST = \frac{PS \times 100}{PT}$$

PS = proteína soluble

PT = proteína total;

Porcentaje de extracto (E), en este parámetro primero se calcula la la gravedad específica:

$$\text{gravedad específica} = \frac{PM - PV}{PA - PV} \quad \text{donde:}$$

PM = picnómetro con muestra

PV = picnómetro vacío

PA = picnómetro con agua

con el valor obtenido de gravedad específica se busca en tablas los grados plato, los cuales son usados en la fórmula para obtener por ciento de extracto en base seca.

$$\% \text{ de E en BS} = \frac{\text{grados plato} (H + 800) 100}{100 - \text{grados plato}} \quad \text{donde:}$$

% de E en BS = por ciento de extracto en base seca.

Grados plato = gramos de extracto en 100 ml de mosto de malta

H = humedad; diferencia de molienda fina gruesa; poder diastásico, expresado en grados Lintner que se calcula en la siguiente forma:

$$(+)\text{ Grados Lintner} = \frac{(\text{testigo} - \text{muestra}) 24 \times 100}{100 - H}$$

H = humedad

y alfa amilasa (AM) calculada según fórmula:

$$\text{UD en BS a } 20^{\circ}\text{C.} = \frac{25 \times 100}{0.05 \times t (100 - H)}$$

UD en BS = unidades de dextrinificación en base seca.

0.05 = Peso de malta equivalente a 10 ml de su extracto en 1 -
lt de Ca Cl_2 de los cuales se tomaron 10 ml para inocular el sustrato.

(+) Grados Lintner corresponden a un cc de infusión de malta -
al 5 % que actúen en 100 centímetros cúbicos de una solución -
de almidón al 2 % a $20^{\circ}\text{C}/1$ hr.

t = tiempo de dextrinificación de la muestra

H = humedad

Hay un total de once factores, de los cuales el poder -
diastásico y alfa amilasa fueron determinados por el proceso -
descrito por Banasik (2). El resto de los factores de calidad -
se determinaron de acuerdo a los métodos de análisis de ASBC -

(1). Sociedad Americana de Químicos Cerveceros.

Análisis Estadístico.

Este análisis se hizo por medio de correlaciones:

1o.- Entre las determinaciones viscométrica y reductométrica de actividad de beta-glucanasa y de estos con cada uno de los factores de calidad.

2o.- Cada uno de los factores de calidad se correlacionó a las demás separadamente.

Las correlaciones se hicieron con los datos obtenidos para cada prueba de un total de treinta muestras usando la fórmula: (41)

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}}$$

Donde:

r = coeficiente de correlación

x = dato obtenido por el método reductométrico.

y = dato obtenido por el método viscométrico

n = número de observaciones

Este tipo de correlaciones nos sirvió para dar el grado de asociación que existe entre las determinaciones de actividad de beta-glucanasas y de estas con los factores de calidad, así como entre los factores de calidad.

RESULTADOS

En este capítulo se dan los resultados obtenidos en las pruebas explicadas en el capítulo anterior (material y métodos).

En la tabla 1, se muestran los valores de la disminución de la viscosidad ocurrida durante el tiempo de reacción (media hora), ó sea la actividad de la enzima en ese tiempo; - también se muestran los valores de viscosidad en las muestras (Cebadas de 6 hileras procedentes de Roque, Gto.)

Datos de correlación entre los valores obtenidos para -- viscosidad, actividad, y tiempo; en el experimento para encon-- trar la concentración adecuada de enzima con máxima actividad - a los 30 minutos.

| Viscosidad / tiempo | Actividad / tiempo |
|---------------------|--------------------|
| LR = - 0.946191 | LR = 0.938693 |
| m = - 0.020466 | m = 0.019933 |
| b = 2.747222 | b = 0.601666 |

Donde:

LR = línea de correlación

m = pendiente

b = distancia que existe, entre el punto en que cruza - la recta el eje de las ordenadas, y el origen.

Nota : Entre más cercano a 1.000 sea el valor de LR, indicara mayor relación entre los factores. Si el dato obtenido para LR fuera 1.000 nos indicaría que los factores tomados en cuenta son uno solo.

TABLA 1

Datos de viscosidades específicas a los tiempos del experimento con las 30 muestras de maltas usadas.

| No. de Muestra | tiempo 5' cp | tiempo 30' cp | Disminución de viscosidad debida a beta-glucanasas cp |
|----------------|-----------------|------------------|--|
| 1 | 2.55 | 1.81 | 0.74 |
| 2 | 3.39 | 2.28 | 1.11 |
| 3 | 2.56 | 1.93 | 0.63 |
| 4 | 2.72 | 1.81 | 0.91 |
| 5 | 2.78 | 1.93 | 0.85 |
| 6 | 2.98 | 2.01 | 0.97 |
| 7 | 3.25 | 2.19 | 1.06 |
| 8 | 2.66 | 1.83 | 0.83 |
| 9 | 2.64 | 1.61 | 1.03 |
| 10 | 2.66 | 1.85 | 0.81 |
| 11 | 2.55 | 1.97 | 0.58 |
| 12 | 2.24 | 1.78 | 0.46 |
| 13 | 2.84 | 1.92 | 0.92 |
| 14 | 2.66 | 1.98 | 0.68 |
| 15 | 2.63 | 1.74 | 0.89 |
| 16 | 2.27 | 1.64 | 0.63 |
| 17 | 2.35 | 1.69 | 0.66 |
| 18 | 2.29 | 1.64 | 0.65 |
| 19 | 2.39 | 1.68 | 0.71 |
| 20 | 2.27 | 1.91 | 0.36 |
| 21 | 2.36 | 1.65 | 0.71 |
| 22 | 2.36 | 1.75 | 0.61 |
| 23 | 2.31 | 1.73 | 0.58 |
| 24 | 2.43 | 1.74 | 0.69 |
| 25 | 2.09 | 1.56 | 0.53 |
| 26 | 2.01 | 0.82 | 1.19 |
| 27 | 2.25 | 1.64 | 0.61 |
| 28 | 2.10 | 1.56 | 0.54 |
| 29 | 2.02 | 1.26 | 0.76 |
| 30 | 2.36 | 1.48 | 0.88 |

cp = centi-poise.

TABLA 2

Resultados del Analisis Químico de las maltas usadas.
Factores de Calidad.

| No. de Observación | PGRA | T6 | T5 | ILL | PT | PS | ST | E | D | PD | AM |
|--------------------|------|------|-----|-----|------|-----|------|------|-----|-----|----|
| 1 | 31.3 | 86.2 | 1.0 | 585 | 11.5 | 6.0 | 52.2 | 78.1 | 1.3 | 178 | 52 |
| 2 | 40.5 | 93.7 | 0.7 | 593 | 13.4 | 6.1 | 45.5 | 79.4 | 1.0 | 135 | 52 |
| 3 | 31.8 | 90.0 | 0.7 | 589 | 14.2 | 4.8 | 33.8 | 77.9 | 2.5 | 137 | 32 |
| 4 | 32.2 | 85.9 | 1.2 | 585 | 14.1 | 5.6 | 39.7 | 77.2 | 2.1 | 130 | 37 |
| 5 | 32.3 | 88.7 | 2.2 | 586 | 14.4 | 6.5 | 43.9 | 78.4 | 4.0 | 225 | 52 |
| 6 | 39.5 | 89.9 | 1.1 | 589 | 14.7 | 6.6 | 44.9 | 78.4 | 5.0 | 158 | 26 |
| 7 | 55.2 | 99.0 | 0.1 | 599 | 15.3 | 4.9 | 32.0 | 73.0 | 4.5 | 109 | 24 |
| 8 | 41.0 | 82.6 | 1.4 | 585 | 12.4 | 4.9 | 39.5 | 78.3 | 1.3 | 67 | 35 |
| 9 | 32.5 | 95.9 | 0.5 | 595 | 15.3 | 6.8 | 44.4 | 78.1 | 4.9 | 165 | 35 |
| 10 | 35.9 | 90.5 | 0.4 | 580 | 14.1 | 5.9 | 41.8 | 75.7 | 1.4 | 137 | 35 |
| 11 | 39.4 | 89.1 | 1.4 | 587 | 14.4 | 5.3 | 36.8 | 78.0 | 2.7 | 110 | 29 |
| 12 | 48.2 | 93.6 | 0.6 | 592 | 13.1 | 5.9 | 45.0 | 77.5 | 4.2 | 105 | 26 |
| 13 | 32.4 | 93.0 | 0.4 | 592 | 14.6 | 6.1 | 41.8 | 76.9 | 3.4 | 160 | 26 |
| 14 | 37.9 | 88.0 | 0.9 | 586 | 12.8 | 5.4 | 42.2 | 75.6 | 5.2 | 109 | 25 |
| 15 | 35.4 | 95.9 | 0.3 | 595 | 15.0 | 6.2 | 41.3 | 78.3 | 3.1 | 180 | 29 |
| 16 | 35.8 | 86.0 | 1.0 | 585 | 11.8 | 5.0 | 42.4 | 77.8 | 0.1 | 138 | 37 |
| 17 | 38.7 | 93.6 | 0.6 | 593 | 14.7 | 6.6 | 44.9 | 79.1 | 0.9 | 193 | 37 |
| 18 | 35.0 | 83.3 | 0.7 | 582 | 13.7 | 5.6 | 40.9 | 77.8 | 1.7 | 140 | 24 |
| 19 | 39.9 | 86.1 | 1.0 | 585 | 14.4 | 5.6 | 38.9 | 75.4 | 0.3 | 145 | 37 |
| 20 | 34.4 | 86.6 | 1.0 | 585 | 11.9 | 4.6 | 38.6 | 78.6 | 2.0 | 143 | 26 |
| 21 | 45.9 | 85.9 | 1.3 | 584 | 13.0 | 5.2 | 40.0 | 71.6 | 0.1 | 110 | 26 |
| 22 | 38.9 | 95.8 | 0.2 | 595 | 12.1 | 4.7 | 38.8 | 78.4 | 1.7 | 146 | 26 |
| 23 | 36.6 | 92.6 | 0.4 | 591 | 13.2 | 4.9 | 37.1 | 73.6 | 2.0 | 156 | 35 |
| 24 | 42.0 | 91.9 | 0.3 | 591 | 13.7 | 4.4 | 32.1 | 76.4 | 5.4 | 121 | 26 |
| 25 | 35.8 | 78.1 | 1.6 | 576 | 13.8 | 4.6 | 33.3 | 74.8 | 2.6 | 93 | 26 |
| 26 | 46.7 | 98.8 | 0.1 | 598 | 14.1 | 5.7 | 40.4 | 77.7 | 1.8 | 129 | 43 |
| 27 | 44.3 | 90.2 | 1.1 | 588 | 14.5 | 6.0 | 41.1 | 75.7 | 0.8 | 194 | 47 |
| 28 | 44.5 | 95.4 | 0.2 | 594 | 14.6 | 5.7 | 39.0 | 76.6 | 2.5 | 215 | 43 |
| 29 | 36.2 | 82.9 | 1.0 | 581 | 15.9 | 7.0 | 44.0 | 76.5 | 1.2 | 215 | 64 |
| 30 | 47.1 | 95.0 | 2.3 | 592 | 15.4 | 6.0 | 39.1 | 76.9 | 2.5 | 141 | 34 |

natural para determinar la actividad de beta-glucanasas en malta. (ver tabla 3).

Las correlaciones positivas significativas de los dos métodos (viscométrico y reductométrico) con los factores de calidad fueron: grano lleno e índice de llenado; esta significancia no es esperada en comparaciones intravarietales dado que la mayor cantidad de carbohidratos en grano lleno disminuirían los contenidos proteico y en consecuencia las actividades enzimáticas. Sin embargo estas comparaciones son intervarietales y la amplia diversidad genética entre ellas permite la presencia de cantidades variables de esta enzima sin que dependa esto del contenido de proteína. Es posible seleccionar líneas con altas actividades de beta-glucanasa en forma indirecta seleccionando líneas por grano lleno que también es una característica deseable.

Con grano delgado la correlación es significativa pero negativa y esto se puede explicar con razonamientos semejantes a los usados para grano lleno e índice de llenado del grano.

TABLA 3

Datos de correlaciones entre las actividades de beta-glucanasa obtenidas por los dos métodos usados y de estos con cada uno de los factores de calidad.

| Método | Método Viscométrico | Método Reductométrico |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Enzimático | 1.0000 | 0.764365 |
| | 0.0000 | 0.0001 |
| Factores de calidad | | |
| PGRA | 0.068779 0.7185 | 0.764365 0.2461 |
| T6 | 0.312972 (+) 0.0887 | 0.3929622 (*) 0.0271 |
| T5 | -0.266159 (+) 0.01518 | -0.340940 (*) 0.0622 |
| ILL | 0.320454 (+) 0.0809 | 0.434188 (*) 0.0157 |
| PT | 0.295507 0.1093 | 0.288290 0.1188 |
| PS | 0.347048 0.0573 | 0.182595 0.6644 |
| ST | 0.184442 0.6697 | -0.012013 0.9484 |
| E | 0.082786 0.6673 | 0.066385 0.7273 |
| D | 0.134666 0.5153 | 0.133366 0.5110 |
| PD | 0.103986 0.5908 | 0.181148 0.06603 |
| AM | 0.227486 0.2247 | 0.136513 0.5215 |

El número superior indica el coeficiente de correlación; y el inferior, la probabilidad de que la correlación sea debida a causas no controladas.

Indicaciones de la tabla 3

- (+) Correlaciones significativas entre los datos obtenidos por el método viscométrico y los obtenidos para cada uno de los factores de calidad.

- (* Correlaciones altamente significativas entre el método reductométrico y los factores de calidad con una probabilidad mayor de 0.01 en T6 e ILL y mayor de 0.05 en T5 (grano fino)

Significado de las abreviaturas usadas anteriormente:

PGRA = Peso en gramos de mil granos.

T6 = Grano lleno retenido en la criba 6/64"

T5 = Grano fino atraviesa la criba 5/64"

ILL = Índice de llenado.

PT = % de proteína total (*)

PS = % de proteína soluble (*)

ST = % de proteína soluble % proteína total (*)

E = % de extracto.

D = Diferencia de extractos de molienda fina y gruesa.

PD = Poder diastásico (grados Lintner)

AM = Alfa amilasa (+) (DU 20°C)

(*) porcentaje de nitrógeno x 6.25

(+) Unidades de dextrinificación a 20°C.

Correlaciones significativas de los métodos reductométricos y viscométricos (+) con los factores de calidad y la correlación entre ellos.

(*) Método reductométrico se hizo usando laminarina -- (sustrato comercial); (+) método viscométrico con sustrato natural.

La correlación entre los dos métodos para estimar la actividad de beta-glucanasa fue altamente significativa, esto sugiere que se puede usar la laminarina en lugar del sustrato-

Correlaciones significativas entre los factores de calidad.

Los valores de las correlaciones mencionadas se muestran en la tabla 4.

Peso de mil granos (PGRA). La correlación de este parámetro con grano lleno resulta positiva y significativa al igual que con el índice de llenado, ya que de ellos depende directamente este factor. Entre el extracto y el peso de mil granos existe una correlación significativa negativa, resultado no esperado pero posiblemente debido a diversidad genética. Con poder diastásico la correlación también es negativa y esto es porque dicho factor mide la actividad de enzimas amilolíticas alfa y beta, o sea entre mayor cantidad de enzima menor cantidad de sustrato y viceversa, cuando la cantidad de sustrato es grande la cantidad de proteínas en general y de estas enzimas es pequeña.

Grano lleno (T6) e índice de llenado da una correlación significativa porque uno depende directamente del otro.

Grano delgado (T5) con grano lleno se correlacionan en forma significativa pero negativa debido a que al aumentar la cantidad de grano lleno disminuye la cantidad de grano delgado y a la inversa; también nos da una correlación significativa negativa con el índice de llenado ya que existe una relación inversa de este factor con grano fino.

Entre proteína total (PT) y proteína soluble existe una correlación altamente significativa ya que la proteína soluble forma parte de la proteína total sin que esto quiera decir que al aumentar la proteína total necesariamente tenga que aumentar la proteína soluble, dado que la actividad proteolítica es otro factor involucrado en la solubilización. El poder diastásico -- da la medida de la actividad enzimática amilolítica que también está incluida dentro de la proteína total por lo que en este -- caso también resulta positiva y significativa la correlación. - Lo anterior coincide con lo reportado por varios autores (13, - 18, 23, 34) al igual que la relación negativa entre proteína to tal y porcentaje de extracto también reportado por los mismos.

La proteína soluble sobre la proteína total nos da el -- grado de modificación maltera desde el punto de vista protéico, es decir actividad enzimática proteolítica o sea la producción de nitrógeno orgánico en forma de oligopeptidos, amino ácidos - etc. estos productos, son los que constituyen la proteína soluble por lo que existe una alta significancia en esta correlación. El poder diastásico mide la actividad de las enzimas amilolíticas alfa y beta, esto hace que el nivel de significancia de la correlación con proteína soluble sea alto, ya que las enzimas - alfa amilasas y proteolíticas son formadas durante el proceso - maltero, además tanto estas como las beta-amilasas se encuentran en forma soluble.

TABLA 4

CORRELACIONES ENTRE LOS FACTORES DE CALIDAD

| Factor | T6 | T5 | ILL | PT | PS | ST | Ex | D | PD | AM |
|--|--------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Peso de 1000 granos (PGRA) | 0.425460 0.0181 | -0.136432 <u>0.5212</u> | 0.453230 0.0115 | 0.161991 <u>0.6034</u> | -0.154499 0.5800 | -0.296913 0.1075 | -0.409786 <u>0.0235</u> | -0.066896 0.7254 | 0.407333 0.0241 | 0.165602 0.6145 |
| Grano lleno (T6) | | -0.569278 <u>0.0013</u> | 0.920530 <u>0.0001</u> | 0.307605 0.0947 | 0.157024 0.5880 | -0.05263 0.7805 | 0.037672 0.6647 | 0.322249 0.0791 | 0.043771 0.8131 | -0.108033 0.5764 |
| Grano fino (T5) | | | -0.520235 <u>0.0030</u> | 0.033403 0.8551 | 0.106379 0.5823 | 0.100971 0.6016 | 0.037672 0.8375 | -0.120243 0.5335 | 0.135382 0.5177 | 0.185160 0.6717 |
| Indice de llenado (ILL) | | | | 0.251664 0.1768 | 0.107000 0.5801 | -0.069402 0.7159 | 0.157074 0.5881 | 0.341850 <u>0.0614</u> | 0.032136 0.8603 | -0.113113 0.5584 |
| Proteína total (PT) | | | | | 0.562012 <u>0.0015</u> | -0.150773 0.5681 | -0.091273 0.6365 | 0.292606 0.1130 | 0.357877 <u>0.0495</u> | 0.178972 0.6541 |
| Proteína soluble (PS) | | | | | | 0.727662 <u>0.0001</u> | 0.322851 <u>0.0785</u> | 0.051711 0.7823 | 0.652440 0.0002 | 0.520774 0.0029 |
| P. soluble/P. total (ST) | | | | | | | 0.440500 <u>0.0142</u> | -0.173397 0.6378 | 0.477360 <u>0.0076</u> | 0.497678 <u>0.0053</u> |
| Porcentaje de extracto (E) | | | | | | | | 0.042229 0.8192 | 0.273406 0.1403 | 0.221555 0.2377 |
| Diferencia de molienda fina gruesa (D) | | | | | | | | | -0.055148 0.7692 | -0.392278 <u>0.0302</u> |
| Poder diastásico (PD) | | | | | | | | | | 0.573086 <u>0.0012</u> |

Correlaciones significativas con niveles de probabilidad desde 0.09.

Porcentaje de proteína soluble porcentaje de proteína total (ST). Este factor se correlaciono significativamente con otros tres que son: porcentaje de extracto, poder diastásico y alfa amilasa; con el primero de ellos la correlación es significativa y positiva por que mide la cantidad de solidos solubles; la mayor disponibilidad de estos indica un mayor grado de modificación que es lo medido por la relación proteína soluble sobre proteína total. Si el grado de modificación es alto hay mayor actividad amilolítica ya que la alfa amilasa es formada durante el proceso de germinación, lo cuál explica la correlación significativa con poder diastásico y alfa amilasa.

La diferencia entre extractos de molienda fina y gruesa (D) estima el grado de modificación desde el punto de vista de los carbohidratos y depende de la germinación al igual que la alfa amilasa por lo que la correlación entre estos factores resulta significativa.

CONCLUSIONES

10.- De acuerdo a la alta correlación obetnida entre los dos métodos (viscométrico y reductométrico) podemos concluir que se puede usar el método reductométrico con el empleo de laminarina (sustrato comercial para determinar la actividad de las enzimas beta glucanasas, en lugar del método viscométrico obteniéndose con esto un ahorro de tiempo grandísimo debido a, que el método viscométrico es muy laborioso y poco funcional para pruebas en gran escala.

Conforme a las correlaciones significativas de los dos métodos con los factores de calidad se vió que en forma indirecta se pueden seleccionar por grano lleno altas actividades de beta glucanasa. Esta conclusión aunque no pueda generalizarse en el total del cultivo de cebada, si puede aplicarse a la gama de materiales estudiados, que son una muestra representativa de los materiales genéticos utilizados en la producción de variedades mexicanas.

20.- Tomando como factores principales de calidad el --porcentaje de extracto y el poder diastásico.

Se puede decir que la selección de líneas de grano grande y con relación de proteína soluble a total alto produce una selección indirecta de líneas de alto porcentaje de extracto.

Por otra parte la selección de líneas de alto contenido protéico, alta relación de proteína soluble a total debe producir líneas de alto poder diastásico.

La selección por estos factores no se contraponen ó sea que es posible tener línea de alto porcentaje de extracto y alto poder diastásico. Dado que altos contenidos de proteína pueden ser indeseables, se sugiere seleccionar por altos valores de relación de proteína soluble a proteína total.

BIBLIOGRAFIA

1. American Society of Brewing Chemist. Methods of analysis. Sixth rev. ed. Madison, Wisconsin. (1962)
2. Banasik, O.J. An automated analysis of malt diastasic power and alpha anylase activity. Wallerstein Lab. Comm. 34:45-52 (1971).
3. Banasik, O.J.; K.A. Gilles; M.O. Holoien and D. E. Peterson. Computer evaluation of barley and malt quality Am. Soc. Brew. Chem., Proc. 192-198. (1966).
4. Banasik, O.J.; D. Myre, and R.H. Harris, A micro malting method for nursery samples. I. Apparatus and development of the methods. Brew. Dig. 31:50-55 (1956).
5. Banasik, O. J.; D. Myre and R. H. A. Harris, A micro malting method for nursery samples. II. Method and comparison with macro malting and prediction methods. Brew Dig. 31:56-60 (1956)
6. Bass, E. J. and W. O. J. Meredith, Enzymes that degrade barley gums. III Studies of beta-polyglucosidase of --- green malt. Cereal Chem. 32:374-381. (1955).
7. Bass, E. J. and W. O. J. Meredith. Enzimes that degrade barley gum. IV Studies of varietal differences in endo beta-polyglucosidase activity. Cereal Chem. 33:129-135 (1956).
8. Bass, E. J.; W. O. Meredith. Enzymes that degrade barley gums. VI Relation between barley gum composition, cytolitic activity and malting quality. Am. Soc. Brew. Chemist, Proc. 122 (1959).
9. Bendelow, V.M. Measurement of malting modification; viscosity of 70°C. Extracts of green malt. Am. Soc. Brew. Chem. p.122-124. (1959).
10. Bourne, D. T. and J, S, Pirce, Beta-glucan and beta-glu canase in brewing. J. Inst. Brew. 76:328-332 (1970)
11. Cerveza y su fabricación. Enciclopedia de Tecnología -- Química, tomo 4 UTEHA. 365-367 (1962).

12. Cerveza. Enciclopedia Universal Ilustrada Europeo Americana ed. Espasa-Calpe S. A. Madrid Barcelona tomo - 12 1398-1453. Suplemento anual 1967-1968.
13. Den Hartof, G. T. and J. W. Lambert. The relationships between certain agronomic and malting quality characters of barley. Agron. J. 45:208-212 (1953).
14. Escobar, A. Panorama de la Industria Cervecera en México. Asociación Nac. de Fabricantes de Cerveza, IMIT, - Sección Química Aplicada 18 (1971).
15. Enebo, L.E. Sandgren and Ljungdahl. Cell Wall decomposing enzymes of barley and malt. II Cellulase increase during germination and influence of sugar on cellulase activity J. Inst. Brew. 59:205-211 (1953).
16. Erdal, K. and P. Gjertsen. Beta Glucans in malting and brewing. III The action of endo beta glucanases. Eur. Brew. Conv. Estoril 49-57 (1971).
17. Ferran, Lamich J. Cebada, Variedades cerveceras y cerveza. la. Ed. Edit. Aedos, España (1959).
18. Foster, A. E., G. A. Peterson and O. J. Banasik. Heritability of factors affecting malting quality of barley. Crop. Sci. 7:611-613 (1967).
19. Gjertsen, P., Beta glucans in malting and brewing. I. - Influence of beta-glucans on the filtration of strong beers. Am. Soc. Brewing Chem. Proc. 113-120 (1966).
20. Graesser. F. R. and K. D. Thopson. Methodos for the determination of malt modification. Am. Soc. Brewing - Chem. Proc. 113-118 (1964).
21. Greenberg, D.C., and E. T. Witmore. A rapid method -- for estimating the viscosity of barley extracts. J. -- Inst. Brew. 30:10.73
22. Hough, J. J., D. E. Briggs and Stevens. Malting and -- brewing sciense. la. ed. p. 55-107, 196-235 Chapman and Hall London (1971).
23. Hsi, C.H. and J. W. Lambert. Inter and intra annual -- relationships of some agronomic and malting quality -- characters of barley. Agron. J. 46:470-474 (1954).

35. Rasmusson, D. C. and R. L. Glass. Effectiveness of --- early generation selection for four quality characters in barley. *Crop. Sci.* 5:389-391 (1965).
36. Sandegren, E. and L. Enebo. Cell wall decomposing enzymes of barley and malt. I. Determination and stability investigations. *J. Inst. Brew.* 58:198-203 (1952).
37. Scott, R. W. The viscosity of worts in relations to -- their content of beta-glucan. *J. Inst. Brew.* 78:179-189 (1972).
38. Scott, R. W. Solubilization of beta-glucan during mash ing *J. Inst. Brew.* 78:411-412 (1972)
39. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-25 (1952).
40. Sparrow, D.H.B. and W. O. S. Meredith; Malt Citolytic activity of barleys of diverse origins and its relation to maltability. *J. Inst. Brew.* T5:237.242 (1969)
41. Steel, G. D. and J. D. Torrie. Principles and Procedures of Statistics. Mc. Graw Hill. Book Company. (1960).
42. Velasco, F.G. Fabricación de la cerveza. *Tecnología de Alimentos.* Mayo-Junio 1973. 133-145.
43. Witt, P.R. and O.J. Banasik. The effect of optimum operating conditions on the use for enzymes and barley in brewing. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* 134-144. (1970).