



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENRIQUECIDO EN AMINOÁCIDOS
MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA PROTEÍNA GENERADA EN LA
ELABORACIÓN DE LA CERVEZA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

YOLANDA LEÓN MALAGÓN



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ARTURO NAVARRO OCAÑA

VOCAL: AGUSTIN REYO HERRERA

SECRETARIO: FRANCISCO RUIZ TERAN

1ER SUPLENTE: ESMERALDA PAZ LEMUS

2°SUPLENTE: HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGOMEZ

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, LABORATORIO 321
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA**

ASESOR DELTEMA

SUPERVISOR TECNICO

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

M.C. HILDA E. CALDERON VILLAGOMEZ

SUSTENTANTE:

YOLANDA LEÓN MALAGÓN

INDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. ANTECEDENTES.....	8
3.1 MATERIAS PRIMAS PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA	8
3.1.1 MALTA.....	9
3.1.2 AGUA	11
3.1.3 LÚPULO	12
3.1.4 LEVADURA	13
3.2 ELABORACIÓN DE CERVEZA	14
3.3 RESIDUOS GENERADOS DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA.....	16
3.4 AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS.....	18
3.5 ENZIMAS	21
3.5.1 ALCALASA	22
3.5.2 PAPAÍNA.....	22
3.5.3 NEUTRASA.....	23
3.6 HIDRÓLISIS.....	23
3.6.1 HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS VEGETALES	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 OBJETIVO GENERAL	25
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
6. METODOLOGÍA.....	26

6.1	DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	26
6.1.1	OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	27
	LIMPIEZA.....	28
	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	28
	DETERMINACIÓN DE NITROGENO TOTAL	28
6.1.2	PRUEBAS EN EL EXTRACTO.....	29
	HIDRÓLISIS	29
	PERFIL DE AMINOÁCIDOS.....	30
7.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	31
7.1	ACONDICIONAMIENTO DEL EXTRACTO PROTEICO	31
7.1.1	HUMEDAD	31
7.1.2	DETERMINACIÓN DE NITROGENO TOTAL.....	32
7.2	PRUEBAS EN EL EXTRACTO	32
7.2.1	HIDRÓLISIS ÁCIDA	32
7.2.2	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	34
7.3	CROMATOGRAFÍA DE GASES	44
8.	CONCLUSIONES	47
9.	ANEXO	48
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	72

1. RESUMEN

En gran parte del mundo se elabora cerveza a gran escala, debido a su naturaleza las fábricas cerveceras generan una serie de residuos o subproductos. Tratados adecuadamente pueden ser utilizados en la obtención de biocombustibles y de otros productos de alto valor añadido por métodos microbiológicos o enzimáticos utilizados en la industria agroalimentaria o en la elaboración de alimentos funcionales o cosméticos.

Actualmente una buena cantidad de los residuos que se generan tanto en las grandes empresas como en las cervecerías artesanales se desechan, por lo que se busca encontrar sistemas amigables con el ambiente que permitan la utilización a estos subproductos.

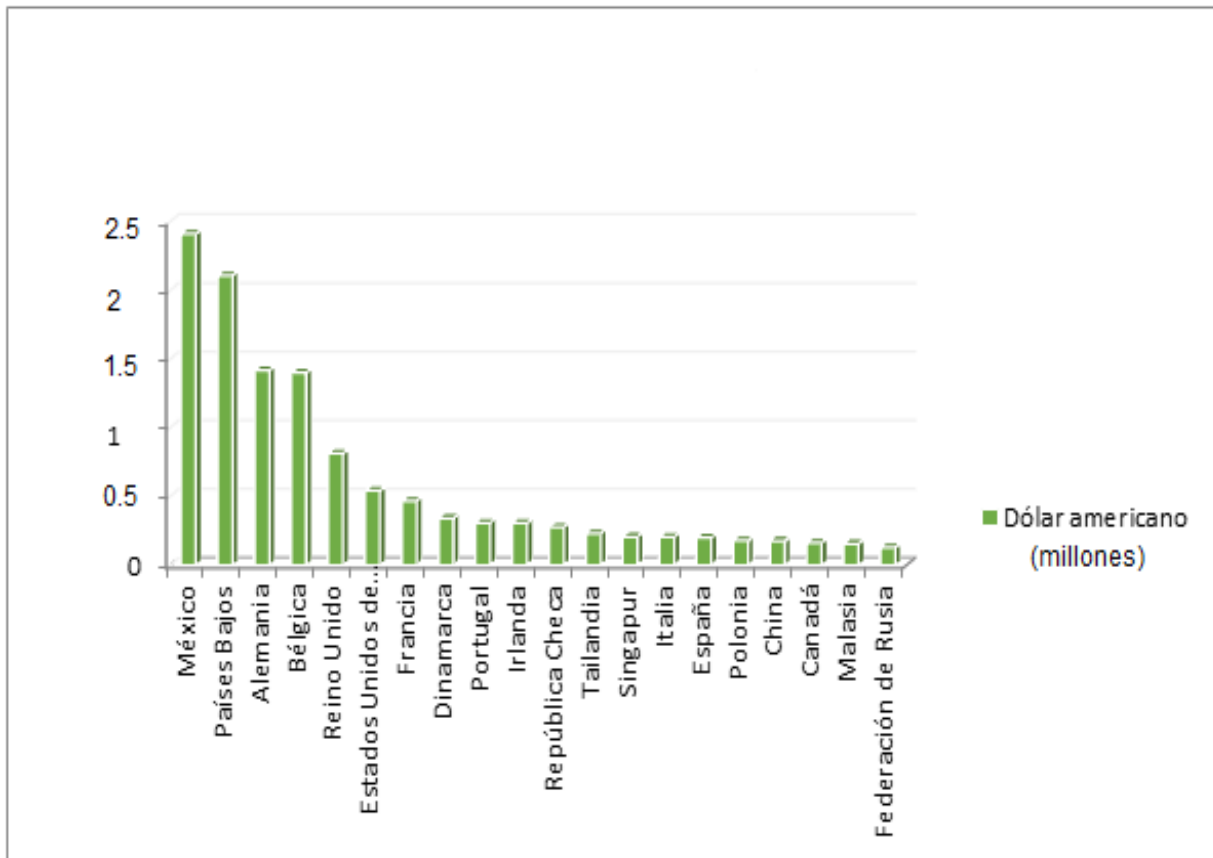
Los residuos generados contienen lípidos, carbohidratos y proteínas entre otros compuestos. En el desarrollo de este trabajo se busca aprovechar estos residuos consiguiendo una rentabilidad económica de su proceso de obtención y en la calidad de estos.

Del grupo de compuestos obtenidos en los subproductos, se trabajó con uno de los residuos ricos en proteínas. Los compuestos ricos en proteínas se obtuvieron durante la precipitación en el proceso de cocción y maduración de la cerveza.

La importancia de realizar hidrolizados de proteínas es porque se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales. En este trabajo se describen las técnicas empleadas para la obtención de estos hidrolizados y se comparan los diferentes métodos usados.

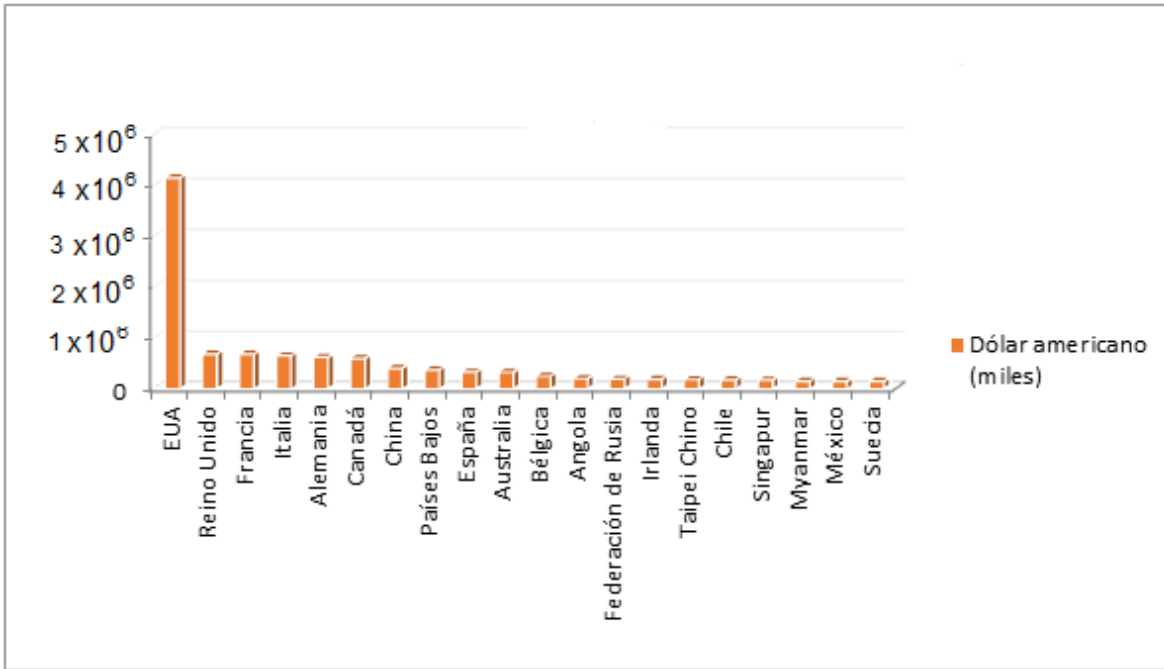
2. INTRODUCCIÓN

México es el exportador de cerveza número uno del mundo, con presencia en más de 180 países. Las marcas de cerveza mexicanas son las de mayor crecimiento en el mercado internacional.



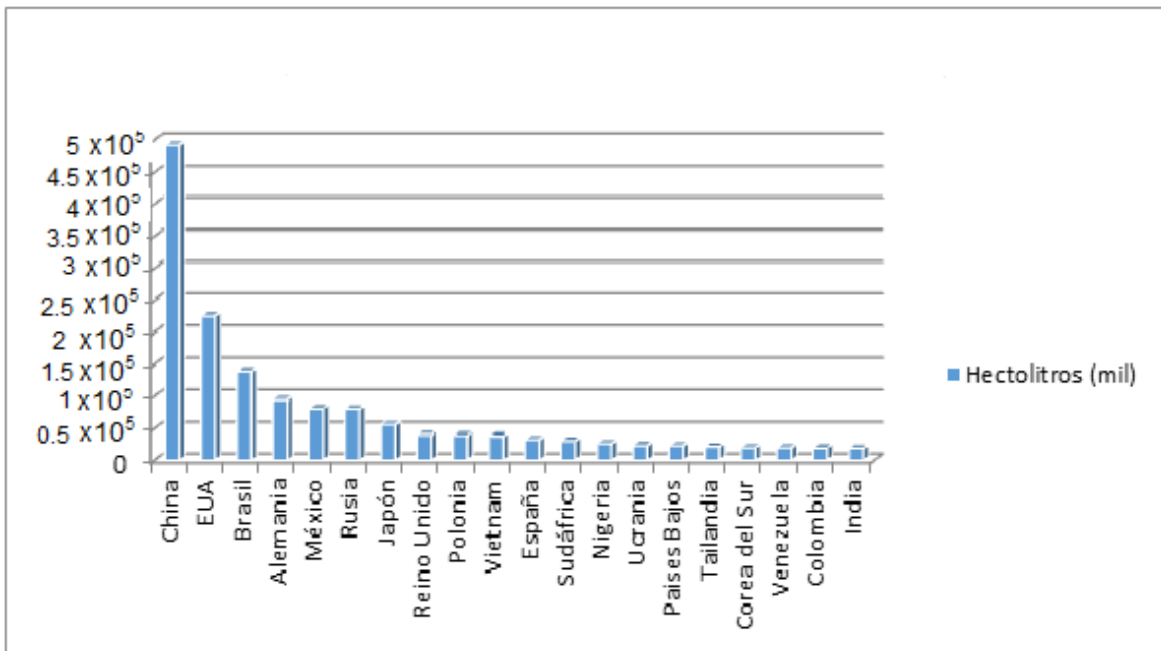
Gráfica 1. Principales países exportadores mundiales de cerveza de malta. (International Trade Centre 2014)

Estados Unidos es el principal importador de cerveza mexicana, con un consumo del 86% del total de nuestras exportaciones.



Gráfica 2. Principales países importadores mundiales de cerveza de malta. (International Trade Centre, 2014)

México es el quinto productor de cerveza en el mundo.



Gráfica 3. Producción mundial de cerveza 2014 (miles de hl). (The Barth Report, 2014)

En 2010, Heineken Internacional adquirió la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma. De igual forma, Grupo Modelo y su marca Corona, la cerveza más importada en Estados Unidos, fue comprada por AB-Inbev en junio del 2013. En conjunto estas dos empresas mexicanas, ahora parte de consorcios internacionales, controlan alrededor del 97% del mercado de cerveza en México.

El gremio artesanal estima representar alrededor del 0.5% de la producción nacional y calcula el número de productores, ventas, ganancias y empleos (Manzano Anabel 2015)

La actividad cervecera nacional impacta toda una cadena de valor, desde agricultores, transportistas e industriales, hasta puntos de venta, restaurantes y centros de recreación y esparcimiento.

El principal uso de la malta de cebada que se produce en México es consumido por la industria cervecera mexicana, lo que proporciona empleo a más de 92 mil agricultores.

Con base en datos de años anteriores, se puede decir que por cada 1.5% de crecimiento en el mercado cervecero en México (3% en sus exportaciones), se generan:

- 1 billón de pesos en inversión directa de la industria cervecera.
- Producción de un millón de hectolitros de cerveza.
- 3,500 nuevos empleos en agricultura. (Consejo de Investigación sobre Salud y Cerveza de México S.A.)

3. ANTECEDENTES

3.1 MATERIAS PRIMAS PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA

3.1.1 MALTA

La malta es el resultado de remojar, germinar y tostar la cebada (*Hordeum vulgare*). En el proceso se activan enzimas proteolíticos, amilasas y fosfatasas.



Imagen 1. Proceso de malteo de la cebada

La cebada debe reunir cualidades específicas para la obtención de una malta de buena calidad.

Se requiere de un grano entero con poca cascarilla, que le permita lograr un alto porcentaje de germinación, libre de impurezas para evitar la contaminación del germinado y el uso de una variedad que permita que la germinación del grano sea uniforme. Adicionalmente, se busca un grano con un contenido de proteína relativamente bajo, entre el 9 y el 11.5%, ya que entre menos proteína contenga el grano, mayor será su contenido de almidón. Igualmente, se busca que el grano sea pobre en taninos (polifenoles), además de que posea una cantidad suficiente de enzimas de forma tal que no se presenten problemas en la fase de extracción de las mismas. Con la finalidad de que el mosto se separe fácilmente del grano durante el proceso, se demanda un grano pobre en gomas o carbohidratos del tipo β -glucanos. Con base en las características deseables del grano, la cebada de mejor calidad para el malteado es la de 2 carreras (*Hordeum distichum*), las cuales presentan mayor tamaño, uniformidad y contienen mayor cantidad de almidón en

comparación con el otro tipo de variedades de 4 carreras (*Hordeum tetrastichum*) o 6 carreras (*Hordeum hexastichum*). La desventaja de las variedades de dos carreras es que poseen menor cantidad de enzimas en comparación con las 6 carreras, pero son suficientes para obtener mezclas a partes iguales con almidones de otros cereales. En Europa, particularmente en el Reino Unido, es muy común utilizar las variedades 6 carreras para elaborar malta que se destina para la producción de destilados, particularmente whiskey, así como para la producción de cerveza (Ale), debido a su alto contenido enzimático. En la actualidad se emplean enzimas industriales de origen microbiano (β -glucanasa y α -amilasa) para compensar la falta de enzimas que pudiera presentar una cebada durante el proceso de fermentación. (COFUPRO, 2003)

Tabla 1. Composición química media de la materia seca de la cebada.

Hidratos de carbono	70,0-85,0%
Almidón	50-63%
Azúcares	1,8-2,0%
Celulosa	5-6%
Hemicelulosas	Resto
Proteína	10,5-11,5%
Albúmina	5%
Globulina	31%
Prolamina	3.5%
Glutelina	29%
Materia inorgánica	2,0-4,0%
Lípidos	1,5-2,0%
Otras sustancias	1,0-2,0%

Solamente alrededor de la tercera parte de la proteína de la cebada pasa a la cerveza acabada y, aunque la suma de la proteína en la cerveza es relativamente pequeña, puede tener un efecto importante sobre su calidad.

Las proteínas pueden tener una influencia importante en el aporte de turbidez. En cualquier caso, el extracto potencial a obtener de la malta disminuye con el aumento en proteína de la cebada, por lo que los requerimientos comerciales normales estipulan un máximo de 11,5% de proteína en materia cepa en cebadas para cervecería.

Debido a su relación con la formación de turbidez en la cerveza, las sustancias nitrogenadas de la cebada se dividen en 2 grupos:

- ✓ Proteínas: compuestos nitrogenados de elevado peso molecular. Insolubles en soluciones acuosas, precipitan durante la cocción. La suma de proteína disminuye durante el proceso de malteo y en la elaboración de la cerveza porque es descompuesta.
- ✓ Productos de degradación de la proteína: se caracterizan por su solubilidad en agua, no precipitan durante la cocción. La cerveza acabada contiene casi exclusivamente productos de ruptura de la proteína: los de mayor peso molecular, mejoran la estabilidad de la espuma pero pueden estar relacionados con la formación de turbidez. Los de bajo peso molecular, péptidos y aminoácidos, son nutrientes esenciales para las células de levaduras. (Callejo, 2002)

3.1.2 AGUA

El consumo de agua en malterías y cervecerías varía según el tipo de instalaciones, los procesos, los métodos de limpieza, el coste y los tratamientos dados al agua. La cervecería utiliza, en función de los parámetros antes

señalados, de 3,7 a 10,9 HL de agua por HL de cerveza producida, con un promedio de 6 HI/HL. Debido al importante costo que esto representa, el cervecero hace intentos para limitar el consumo de agua en la mayor medida posible y reusar el agua sin mermar la calidad.

La composición del agua de cervecería es un factor determinante para caracterizar diferentes tipos de cerveza.

Hoy el cervecero es capaz de desmineralizar total o parcialmente el agua y reajustar su mineralización para ajustar la composición química de su agua en función del protocolo que se vaya a seguir. (Callejo, 2002)

3.1.3 LÚPULO

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta aromática, perteneciente a la familia de las Cannabináceas, que se cultiva con fines industriales. Es una planta doica, en cervecería se usa solo la flor femenina.



Imagen 2. Lúpulo (flor y pellets)

Los conos femeninos del lúpulo constan de una vértebra o soporte leñoso, las brácteas o bracteolos (pétalos), semillas y las glándulas de lupulina, en la base de los pétalos; constituidas por un polvo amarillo y aromático resinoso, compuesto por ácidos amargos y aceites esenciales.

Tabla 2. Composición química de los conos de lúpulo

Agua	6-13%
Celulosa y ligninas	40,4%
Resinas totales	15,0%
Proteínas (Nx6.25)	15%
Sales minerales	8,0%
Taninos	4,0%
Lípidos	3,0%
Monosacáridos	2,0%
Pectinas	2%
Aceites esenciales	0,5%
Aminoácidos	0,1%

3.1.4 LEVADURA

Durante el proceso de elaboración de cerveza, el azúcar del mosto es fermentado a alcohol por la levadura. Para este propósito se usan levaduras con ascosporas *Saccharomyces cereviseae* y *Saccharomyces uvarum*



Imagen 3. Levadura

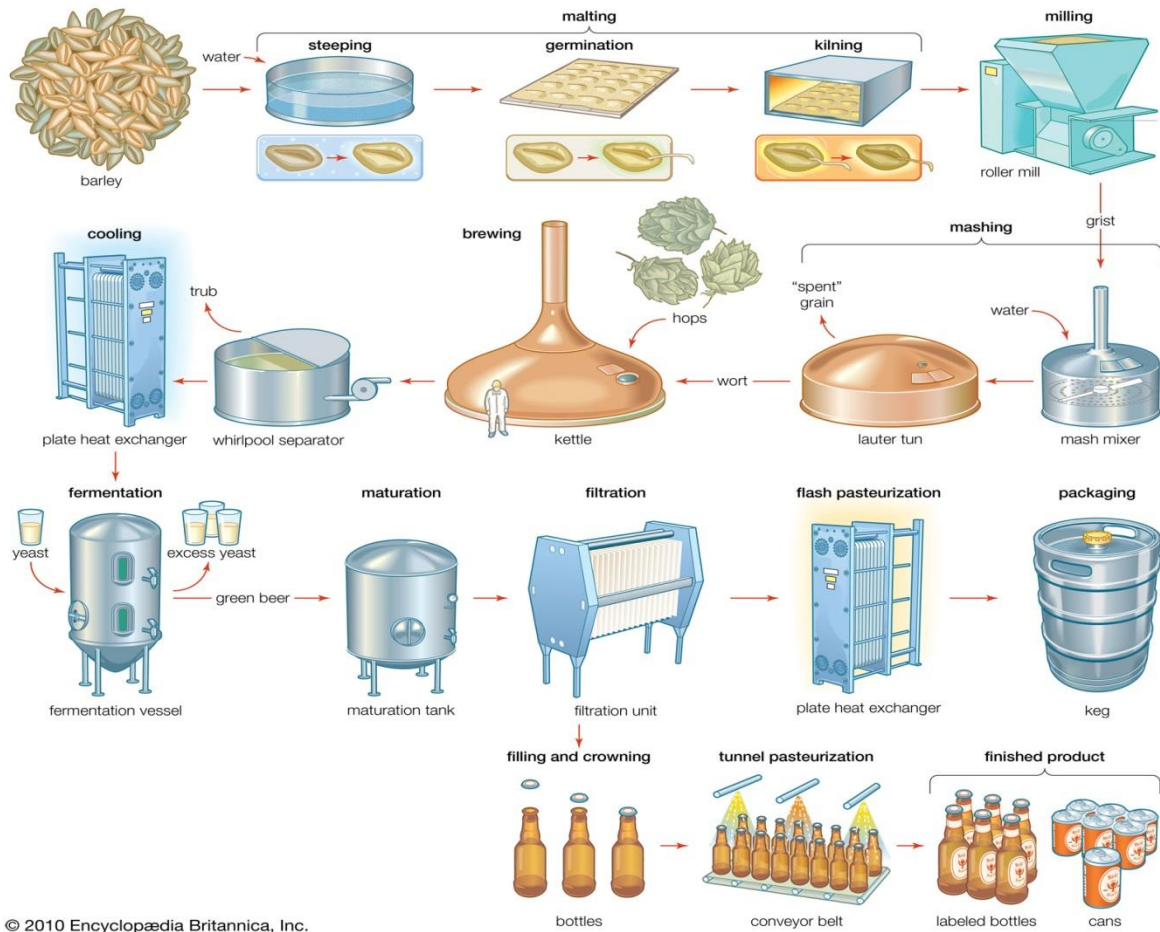
Las cepas empleadas se dividen en 2 grupos: levaduras de fermentación alta (se elevan a la superficie durante la fermentación (entre 14 y 25°C)) y levaduras de fermentación baja (se depositan en el fondo al finalizar la fermentación (entre 4 y 12°C))

3.2 ELABORACIÓN DE CERVEZA

El objetivo es la producción de una bebida fermentada que cumpla con las prescripciones de calidad marcadas. Los procesos implicados son:

- 1) Desintegración mecánica de la malta.
- 2) Formación del extracto soluble (caldo de malta macerada).
- 3) Clarificación.
- 4) Cocción del mosto.
- 5) Enfriamiento y extracción de turbios.
- 6) Fermentación y maduración.
- 7) Carbonatación
- 8) Llenado.

Diagrama 1. Elaboración general para la elaboración de cerveza.



El desarrollo tecnológico de la producción de cerveza, se caracteriza por los procesos de maceración, fermentación y maduración durante los cuales tiene lugar transformaciones químicas, físico-químicas y enzimáticas con velocidades relativamente bajas que exigen una forma de trabajo discontinuo con tiempos de procesado prolongados.

La fase de interés para la investigación son los residuos generados en el separador Whirlpool, los cuales se caracterizan por la precipitación y sedimentación del "lodos" (extracto proteico). Se estima que se generan residuos alrededor del 2 al 4% en total a la cantidad de producto terminado.

En la siguiente tabla se muestra la cantidad de componentes por los que está conformado el residuo generado en el separador Whirlpool.

Tabla 3. Composición de subproductos generados en separador Whirpool.

Parámetro	Precipitados bastos o calientes
Producto de precipitación	
Formación	Durante el proceso de cocción.
Estructura	Coagulado en flóculos gruesos
Componentes principales	Proteínas (40-65%)
	Principios amargos (4-8%)
	Polifenoles (4-8%)
	Hidratos de carbono (4-10%)

(Horst-Dieter, 2001)

3.3 RESIDUOS GENERADOS DURANTE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA.

Se entiende como residuo industrial a todos los líquidos y sólidos, que se originan de la actividad humana e industrial, cuyo principal componente es el agua y que generalmente son vertidos a cursos de agua, masas de aguas continentales y/o marinas. Su origen puede ser muy diverso, como por ejemplo: mecánico, físico, inorgánico y mineral, orgánico, urbano y colectivo. (Metcalf y Eddy, 2003)

La mayor parte de los residuos generados en las cervecerías son sólidos de carácter orgánico (bagazos, levaduras y “lodos” de precipitados). Son considerados como subproductos ya que pueden ser valorizados por otras industrias (alimentación humana, alimentación animal, farmacia) o para utilización agrícola como abono orgánico.

Tabla 4. Origen y composición de los efluentes en la producción de la cerveza.

Fase de producción	Origen del residuo	Composición
	Residuos del mosto y	Solución acuosa de azúcares, dextrina, proteínas,

Cocción	lavado de equipos	taninos y resinas.
Fermentación	Lavado de estanques	Alcohol etílico, ácidos, aldehídos, cetonas, ésteres, bacterias.
Maduración	Fondo de los estanques	Líquido enriquecido de proteínas y productos derivados de su degradación.

(Castro, 2003)

Tabla 5. Cantidad de residuos generados en la elaboración de cerveza (industrial)

GRUPO	RESIDUO	OPERACIÓN DONDE SE GENERA	CANTIDAD APROXIMADA GENERADA
Residuos orgánicos	Bagazo	Filtración tras la maceración	20Kg/Hl cerveza (con un 80% de humedad)
	Levaduras	Fermentación y guarda	0.64Kg/Hl cerveza (con un 79% de humedad)
	Fangos de depuradora	Tratamiento de aguas residuales	Variable en función de la carga contaminante y el tratamiento de depuración.

Fuente: AINIA.

3.4 AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes encontradas en las células vivas, constituyendo el 30-70% del peso seco celular. Todas las proteínas son heteropolímeros de aminoácidos de alto peso molecular unidos por enlaces peptídicos, oscilando desde 10^4 hasta 10^6 . Las proteínas o polipéptidos (por encima de 70 aminoácidos) son moléculas esenciales en todas las formas de vida.

Las proteínas tienen diversas funciones biológicas y pueden servir como componentes de las membranas celulares, catalizadores celulares (enzimas), moléculas de defensa (anticuerpos), toxinas bacterianas, venenos de serpientes, proteínas contráctiles de los músculos (miosina y actina) y proteínas de reserva (caseína). Las proteínas asociadas a la membrana llamadas permeasas ayudan en el transporte de nutrientes específicos hacia el interior de la célula. Otras proteínas constituyen apéndices celulares, llamados flagelos cilios o pili.

Las proteínas simples están constituidas exclusivamente por aminoácidos, pero algunas se asocian a otras moléculas distintas de los aminoácidos, y se les denomina proteínas conjugadas.

Dentro de las proteínas que componen la cebada se constituyen con los siguientes aminoácidos:

- Albumina: Arginina, Fenilalanina, Histidina, Isoleucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptófano y Valina.
- Globulina: Ácido aspártico, Alanina, Glicina, Leucina, Metionina, Valina,
- Prolamina: Ácido aspártico, Ácido glutámico, Fenilalanina, Glicina y Prolina. (Hernández, 2015)
- Glutenina: Alanina, Arginina, Cisteína, Fenilalanina, Glicina, Histidina, Isoleucina, Lisina, Metionina, Prolina, Serina, Tirosina, Treonina y Valina. (Wieser, 2016)

Los aminoácidos hallados más comúnmente en las proteínas poseen los grupos amino ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$) unidos a un mismo átomo de carbono, y se

conocen como α -aminoácidos. Los aminoácidos se clasifican de acuerdo a la naturaleza del radical R unido al carbono α (el más cercano al grupo $-\text{COOH}$). Hay 20 posibles R determinan las propiedades catalíticas de las enzimas.

Del gran número de aminoácidos existentes, 20 son comunes a plantas y animales. De ellos, se ha demostrado que ocho son esenciales para el adulto humano y tienen, por lo tanto, la denominación de «aminoácidos esenciales» o «aminoácidos indispensables». A saber: fenilalanina, triptófano, metionina, lisina, leucina, isoleucina, valina y treonina. Un noveno aminoácido, la histidina, se requiere para el crecimiento y es esencial para bebés y niños; quizás también se necesita para la reparación tisular. Otros aminoácidos incluyen, glicina, alanina, serina, cistina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, hidroxiprolina, citrullina y arginina. Cada proteína en un alimento está compuesta de una mezcla particular de aminoácidos y puede o no contener la totalidad de los ocho aminoácidos esenciales. (FAO, 2015)

Tabla 6. Propiedades de los grupos de los aminoácidos.

Aminoácido	Abreviatura	pI
No polar		
Alanina	Ala	6,0
Valina	Val	6,0
Isoleucina	Ile	6,1
Leucina	Leu	6,0
Metionina	Met	5,8
Fenilalanina	Phe	5,5
Prolina	Pro	6,3
Neutros		
Glicina	Gly	6,0
Serina	Ser	5,7

Treonina	Thr	6,5
Cisteína	Cys	5,0
Asparagina	Asn	5,4
Glutamina	Gln	5,7
Tirosina	Tyr	5,7
Triptófano	Typ	5,9
Polares		
Ácido aspártico	Asp	3,0
Ácido glutámico	Glu	3,2
Histidina	His	7,6
Lisina	Lys	9,8
Arginina	Arg	10,8

Los aminoácidos sufren reacciones que son importantes en relación con los estudios cuantitativos y cualitativos de proteínas, y también respecto a los ensayos de las reacciones de los residuos de aminoácidos que contienen. (Lee, 2000)

Los aminoácidos tienen una amplia gama de aplicaciones industriales. Tradicionalmente desde su descubrimiento químico y del conocimiento de los innumerables beneficios que estas moléculas aportan al hombre, su uso ha sido ampliamente difundido en:

- La industria alimenticia: como complementos nutricionales, alimentos entéricos, aditivos y saborizantes.
- La industria agropecuaria: complementos, mezclas y acondicionadores de nutrición animal.
- La industria farmacéutica: en medicina nutricional, fármacos antifatiga y de recuperación hepática.
- Otras industrias: inhibidores de corrosión, biopolímeros, antioxidantes y agentes quelantes.

- Industria cosmética: como agentes acondicionadores, hidratantes, neutralizantes, para permanentes capilares, agentes surfactantes y como precursores biológicos. (Quiminet, 2015)

3.5 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores; es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas de los seres vivos. (García, 2004)

Las enzimas no solo realizan una contribución esencial en las actividades celulares, sino que además encuentran una extensa aplicación en biotecnología, especialmente en la industria alimentaria. Por ejemplo en la elaboración de queso, cerveza, edulcorantes, o en la industria química y farmacéutica en la síntesis de aminoácidos y antibióticos. (Lee, 2000)

Desde el punto de vista fisicoquímico, y como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción, característica que resulta de fundamental importancia en una aplicación. (García, 2004)

Comparadas con las reacciones químicas que requieren condiciones extremas como por ejemplo valores extremos de pH y temperatura, las enzimas funcionan en condiciones suaves, lo que las hace atractivas con el ahorro de energía y la conservación del entorno. Sin embargo, la catálisis enzimática presenta un inconveniente; que estos catalizadores a menudo se desnaturalizan al entrar en contacto con varios agentes (el calor, los ácidos o bases, los solventes orgánicos, etc.) y de este modo pierden su actividad, a diferencia de la mayoría de los catalizadores inorgánicos.

El control de la regulación enzimática está asociado con varios factores reguladores. En algunos casos, se trata una vez más de la interacción entre

enzima y sustrato. Sin embargo, con mayor frecuencia son otros factores externos tales como los activadores, los inhibidores, la temperatura y el pH los implicados en la regulación de la actividad enzimática. (Lee, 2000)

Las enzimas se clasifican en seis grandes grupos:

- ❖ Oxidorreductasas
- ❖ Transferasas
- ❖ Hidrolasas
- ❖ Liasas
- ❖ Isomerasas
- ❖ Ligasas

Dentro del grupo de las hidrolasas se encuentran las enzimas cuyos nombres se forman añadiendo el sufijo –asa al sustrato tales como la alcalasa, neutrasa y también algunos que no presentan el sufijo pero tienen la función de las hidrolasas como son la papaína entre otros.

3.5.1 ALCALASA

Esta enzima obtenida de *Bacillus licheniformis*, es conocida también como subtilisina A, subtilopeptidasa A, o Alcalasa Novo.

Hidroliza enlaces peptídicos donde se encuentren aminoácidos grandes sin carga. Es activa a temperaturas cercanas a 60°C y en pH neutros y ligeramente alcalinos (pH 7 a 10), con algunas que resisten mayor alcalinidad; su pl varía de 7.8 a 11. (De la Fuente, 2004)

3.5.2 PAPAÍNA

Es una enzima proteolítica que se encuentra en el látex y el fruto de *Carica papaya*. El látex crudo que contiene también peptidasa A y quimopapaína, se

emplea para combatir los “turbios fríos” de la cerveza y como ablandador de carne. (Wong, 1995)

Las propiedades peptolíticas de la papaína provocan la ruptura de múltiples enlaces en las proteínas animales, lo que tiene por consecuencia que se pueda utilizar para ablandar la carne destinada al consumo humano. La papaína también hidroliza proteínas vegetales, y es útil para evitar la formación de los sedimentos protéicos que produce la proteína de la cebada en el proceso de fabricación de cerveza.

Su centro activo es el grupo tiol de la cisteína; catalizan la hidrólisis de diversos enlaces peptídicos de distintos aminoácidos. (Robinson, 1991)

3.5.3 NEUTRASA

Es una proteasa bacteriana producida por una cepa seleccionada de *Bacillus amyloliquefaciens*. Se utiliza en proteínas de origen animal y vegetal para degradar las proteínas.

Como su nombre lo implica, neutrasa es una proteasa neutra con una actividad óptima alrededor de pH 5.5 a 7.5 y 45-55 ° C. Es clasificada dentro de las metaloproteasas, las cuales contienen un átomo metálico, usualmente Zn. Es estabilizada con Ca²⁺ y por lo tanto es inhibida por agentes quelantes fuertes como EDTA. (Adler-Nissen, 1993).

3.6 HIDRÓLISIS

La esencia de la hidrólisis proteica es la ruptura del enlace peptídico y, en consecuencia, la generación de péptidos de menor tamaño o, incluso, de aminoácidos libres.

Los enlaces peptídicos entre los aminoácidos pueden romperse por hidrólisis con ácidos, álcalis o enzimas. En el sistema digestivo humano la hidrólisis es realizada

por diversas enzimas proteolíticas. Sea cual sea el mecanismo de la hidrolisis las cadenas polipeptídicas son fragmentadas a polipéptidos más pequeños y luego progresivamente a oligopeptidos cada vez menores como los tetra, tri y dipeptidos que contienen, respectivamente, cuatro, tres y dos aminoácidos y, finalmente a aminoácidos. En diversas fases intermediarias de la hidrolisis el producto será una mezcla de polipéptidos menores, péptidos y aminoácidos. (Muller, 1998)

3.6.1 HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS VEGETALES

Las "Proteínas Vegetales Hidrolizadas" se encuentran separadas en sus partes constituyentes (aminoácidos) y se obtienen de materias proteínicas vegetales seleccionadas de alta calidad, como la soya, gluten de cereales u otras, íntegramente solubilizadas por procesos donde se conserva sin alterar su sabor y aroma.

Se emplean en la Industria Alimentaria pues permite a los fabricantes conseguir un sabor más fuerte con menos ingredientes como saborizantes o sazoadores.

Existen diversas formas de realizar esta operación ya sea con el uso de ácidos o bases fuertes o enzimas. El producto soluble extraído de las materias proteínicas vegetales seleccionadas, por un proceso de solubilización bajo condiciones controladas para obtener alta pureza y la calidad deseada. (NMX-F-096-1970)

Para este trabajo la fuente proteínica se obtuvo del subproducto generado durante la etapa de cocción y maduración en la elaboración de cerveza, con el fin de conocer su composición en aminoácidos libres y poder encontrar un uso a este residuo ya que actualmente gran parte de estos residuos se desechan.

La hidrolisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso El sustrato se disuelve o re suspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan; a continuación se agrega la proteína dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En

los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima empleada. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirada del medio por filtración y la proteína finalmente precipitada. (Benitez, 2008)

La utilización de hidrolizados de proteínas como fuente de aminoácidos es amplio pues se encuentra que desde el año 1968 en la agricultura Europea se utiliza en el campo de la fertilización foliar (nutrición a través de las hojas, se utiliza como un complemento a la fertilización al suelo). Los aminoácidos libres y por tanto los hidrolizados de proteína no solo constituyen un nutriente, sino que son un factor regulador del crecimiento. (Espasa, 2015)

4. HIPÓTESIS

Si el precipitado obtenido en la elaboración de cerveza durante la etapa de maduración es rica en proteínas, debe encontrarse un perfil de composición en aminoácidos y péptidos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

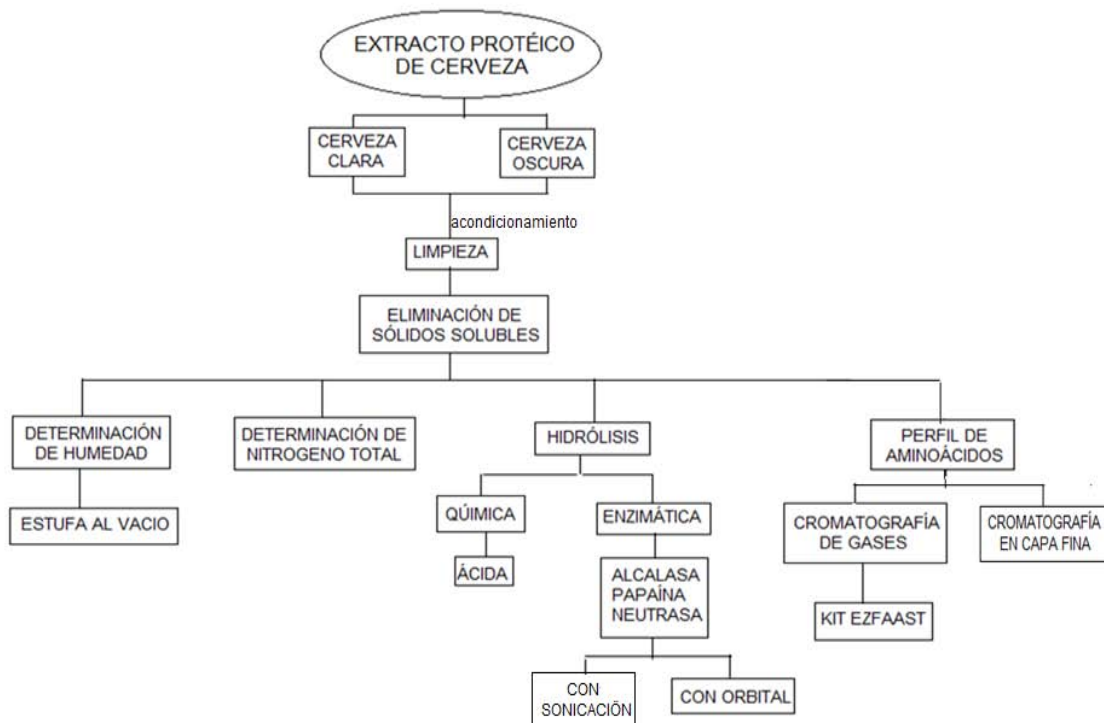
Conocer los aminoácidos libres presentes en los extractos proteicos (cerveza clara y oscura) así como su posible uso.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de hidrólisis empleados.
- ✓ Determinar las condiciones óptimas (temperatura, pH y E/S) de las proteasas comerciales para realizar las hidrolisis enzimáticas del extracto proteico.

6. METODOLOGÍA

6.1 DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN



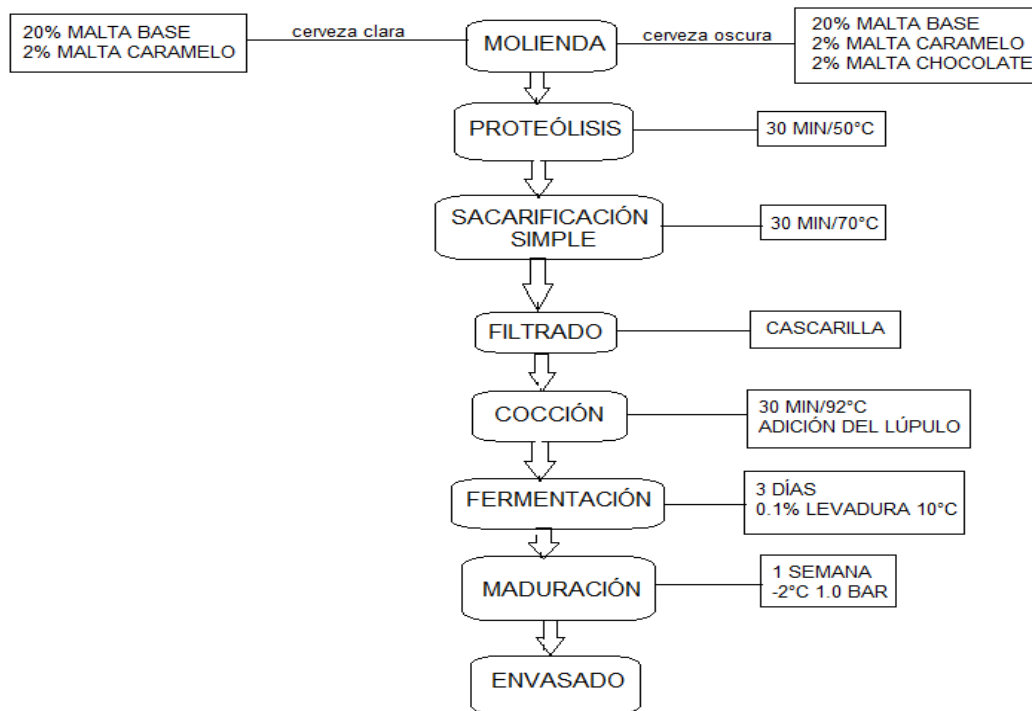
6.1.1 OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

La muestra se obtuvo del precipitado generado durante la etapa de maduración de la cerveza (oscura y clara), la cual fue elaborada en la Planta Piloto Educativa para Producir Cerveza Didáctica TA263D ubicada en los laboratorios de Ingeniería Química.



Foto 1. Planta piloto educativa para producir cerveza didáctica TA263D.

Diagrama 2. Elaboración de cerveza Planta Piloto



LIMPIEZA

Al extracto se le realizaron lavados con agua destilada y se centrifugó a 4000 rpm (Thermo Scientific CL10) hasta la eliminación de sólidos solubles, midiéndolos con ayuda del refractómetro (Atago Dgb).

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

El extracto enjuagado se dividió en dos partes: una parte se secó con estufa de vacío (Marca: SL Modelo: SH) durante 24 horas a 60°C hasta peso constate, se enfrió en desecador y posteriormente se pulverizó en mortero; la otra parte se utilizó húmeda.

El porcentaje de humedad se pudo calcular con el peso de la muestra húmeda la cual fue de 19.6g y el peso de la muestra seca que fue de 2.72g por lo que el porcentaje de humedad se cuantificó con la ecuación:

$$\%H = \frac{Mh - Ms}{Mh} \times 100$$

Dónde:

Mh= muestra húmeda

Ms= muestra seca

$$\%H = \frac{19.6g - 2.72g}{19.6g} \times 100 = 86.12\%$$

DETERMINACIÓN DE NITROGENO TOTAL

Se realizó por el método de Kjendahl.

Se pesó 0.1g de muestra y se introdujo en un tubo de Kjendahl, se agregaron 0.15g de sulfato de cobre pentahidratado (J.T. Baker), 2.5g de sulfato de potasio (J.T. Baker) y 10ml de ácido sulfúrico concentrado (J.T. Baker).

El tubo de digestión se colocó en el bloque de calentamiento (Buchi K-437) y se accionó la trampa de succión de gases; se calentó hasta la destrucción total de la materia orgánica (liquido transparente con una coloración azul verdosa) y una vez terminada la digestión se dejó enfriar.

En un matraz Erlenmeyer de 250ml se adicionó 50ml de HCl 0.1N y una gotas de indicador rojo de metilo 0.1%, se colocó el tubo de digestión (Buchi K-314) con la muestra diluida y las sales disueltas en un volumen menor a 10ml de agua destilada, se adicionó hidróxido de sodio al 36%, se recogió el destilado (100-150ml) en el matraz Erlenmeyer de 250ml, por último se tituló el exceso de ácido con una solución NaOH 0.1N (J.T. Baker). (Iturbide-Sandoval, 2013)

Se realizó el método en la muestra seca y húmeda del extracto proteico de cerveza (clara) utilizándose el factor 6.25, que se refiere al factor de conversión utilizado por defecto para obtener el contenido de proteínas.

6.1.2 PRUEBAS EN EL EXTRACTO

HIDRÓLISIS

Se realizaron dos tipos de hidrólisis: una hidrólisis química (ácida) y una hidrólisis enzimática.

La hidrolisis ácida se realizó tomando en cuenta una relación peso de pasta/volumen de HCl 6N 1:5. El extracto proteico se agregó en un matraz bola a reflujo por 4 horas a 92°C. Finalizada la hidrolisis, se procedió a la neutralización con carbonato sódico y filtración para obtener un líquido transparente color

amarillo ámbar que constituye el hidrolizado ácido de proteína. La hidrólisis se monitoreó cada hora hasta observar que ésta fuera constante.

Posteriormente se realizó un método de cromatografía en capa fina utilizando placas de sílice y como fase móvil se utilizó n-butanol, ácido acético y agua en proporción 4:1:1. El revelado de las placas se realizó con ninidrina al 1%. (Ramesh, 1979)

Para conocer el perfil de aminoácidos presentes en los hidrolizados ácidos se realizó una cromatoplaqueta eluyendo las muestras junto con estándares de aminoácidos.

Para la hidrólisis enzimática se homogeneizó el extracto proteico y la enzima con buffer de fosfatos 0.1M. (Benitez, 2008) Se realizaron las hidrólisis utilizando dos métodos físicos (ultrasonido y orbital) para determinar si existían diferencias, también se compararon tres tipos de enzimas: alcalasa, neutrasa y papaína.

Las enzimas se empezaron trabajando en las mismas condiciones “estándar” (pH=7, temperatura a 45°C y 0.5% m/m enzima/sustrato). Utilizando orbital (Julabo SW22) la hidrólisis se monitoreó cada 10 minutos durante 1 hora y utilizando sonicación (Branson 3210) la hidrólisis se monitoreó cada 5 minutos durante 30 minutos hasta observar que la hidrólisis fuera constante.

Posteriormente se realizó un método de cromatografía en capa fina utilizando placas de sílice y como fase móvil se utilizó n-butanol, ácido acético y agua en proporción 4:1:1. El revelado de las placas se realizó con ninidrina al 1%. (Ramesh, 1979)

PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Las muestras hidrolizadas se filtraron (utilizando filtros de jeringa y membranas de nylon 0.45µm), posteriormente se inyectaron al cromatógrafo de gases (Agilent 7820A) y se determinó el perfil de aminoácidos de las muestras hidrolizadas.

Tabla 8. Condiciones del cromatógrafo de gases.

Condiciones	Cantidades
Temperatura del inyector	250°C
Volumen de inyección	2µl
Rampa	110°C-320°C
Temperatura del detector	320°C
Características de la columna	Modelo No. JW 122-5532 325°C max.
	db- 5ms
	capilar: 30.0m x 250µm x 0.25 µm

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 ACONDICIONAMIENTO DEL EXTRACTO PROTEICO

7.1.1 HUMEDAD

El porcentaje de humedad que se encontró fue de 86.12%

La determinación de humedad es un paso obligado en el análisis de alimentos. Es la base de referencia que permite: comparar valores; convertir a valores de humedad tipo; expresar en base seca y expresar en base tal como se recibió. (FAO, 2015)

7.1.2 DETERMINACIÓN DE NITROGENO TOTAL

Tabla 9. Resultados de nitrógeno total en el extracto proteico de cerveza clara con el Método de Kjendahl.

Muestra	\bar{x} [g proteína/ 100ml]	δ
Extracto proteico húmeda	4.76	0.06
Extracto proteico seca	20.08	1.28

La cantidad de proteína encontrada en la muestra húmeda es baja debido a la cantidad de agua que se encuentra en la muestra; en la muestra seca se pudo observar que hay una considerable cantidad de proteína, la cual puede ser aprovechada para conseguir un uso de este subproducto.

7.2 PRUEBAS EN EL EXTRACTO

7.2.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se observó que después de dos horas de realizarse el hidrolizado esta se encuentra constante.

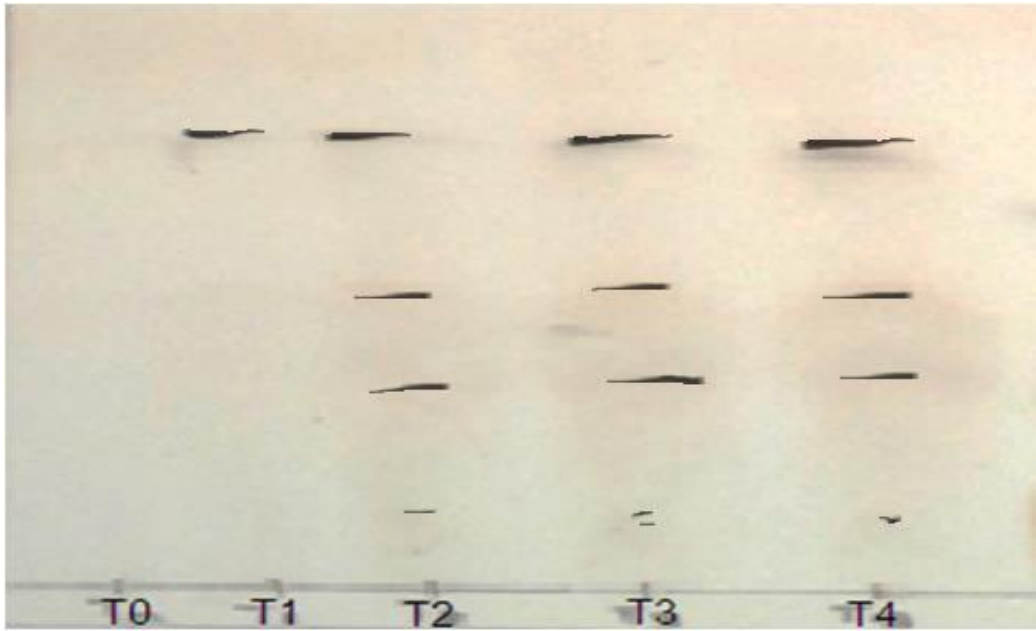


Figura 1. Monitoreo de hidrólisis ácida (T₀=0 min, T₁=60min, T₂=120min, T₃=180min, T₄=240min).

Para el perfil de aminoácidos se pudo observar lo siguiente:

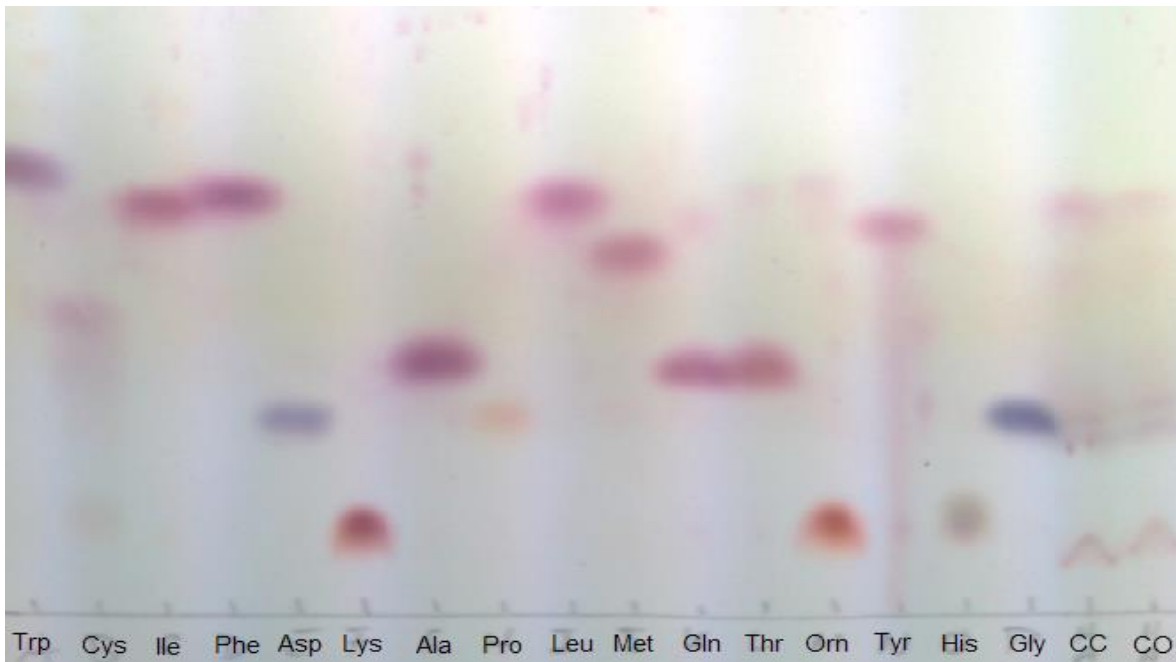


Figura 2. Perfil de aminoácidos obtenidos por medio de hidrólisis ácida del extracto de cerveza clara húmeda (CC) y el extracto de cerveza oscura húmeda (CO).

Tabla 10. Perfil de aminoácidos en hidrolisis ácida.

Muestra	Aminoácidos
Extracto cerveza clara húmeda	Asp, Leu, Lys, Met y Pro
Extracto cerveza clara deshidratada	Asp, Lys, Met y Pro
Extracto cerveza oscura húmeda	Asp, Leu, Lys y Pro

Se pudo observar diferencias en el perfil de aminoácidos entre los extractos de cerveza clara y cerveza oscura, siendo constantes Asp, Lys y Pro. La diferencia de la pérdida de un aminoácido entre extractos se debe a los diferentes procesos de elaboración; por ejemplo, en el caso de la cerveza clara y oscura los diferentes tipos de malta utilizados en la elaboración de cerveza, pues en la cerveza oscura se requiere de maltas con mayor grado de tostado lo cual puede ocasionar pérdidas en los componentes de la cebada por el tratamiento térmico. En el caso del extracto de la cerveza clara deshidratada y húmeda la diferencia del aminoácido se debe de igual manera al tratamiento térmico utilizado, el cual a pesar de haberse usado un método apropiado para alimentos ricos en proteínas (estufa al vacío) se observa que algunos aminoácidos no se encuentran.

7.2.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se pudo observar que a partir de los 30 minutos la hidrólisis es constante utilizando orbital.

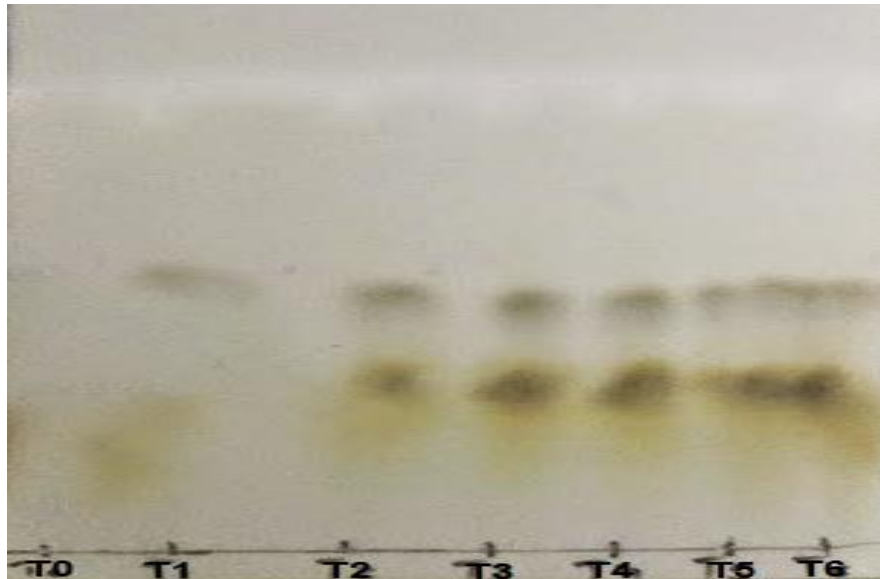


Figura 3. Monitoreo de hidrólisis enzimática con alcalasa utilizando orbital (T0=0min, T1=10min, T2=20min, T3=30min, T4=40min, T5=50min, T6=60min)

Al utilizar sonicación se encontró que a partir de los 15 minutos la hidrolisis es constante.

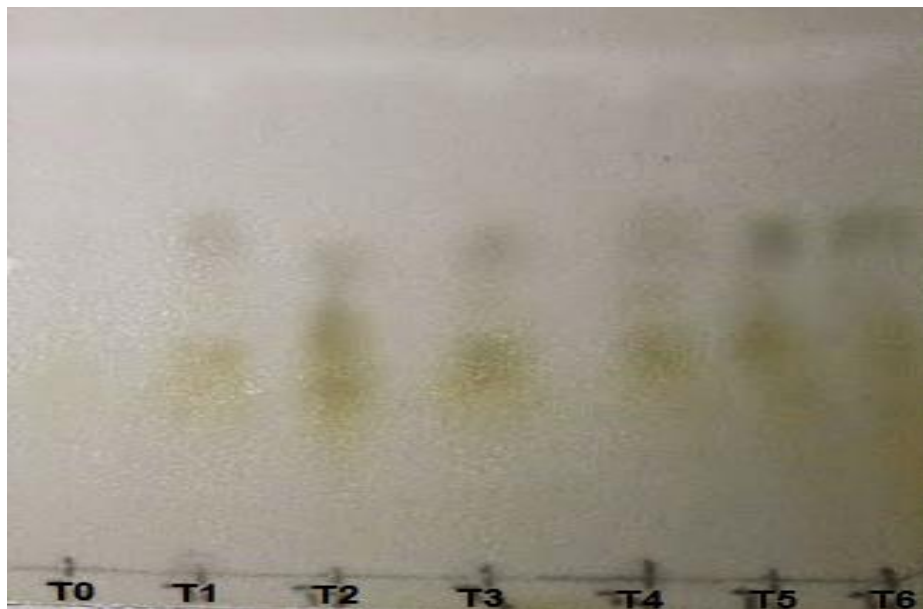


Figura 4. Monitoreo de hidrolisis enzimática con alcalasa utilizando ultrasonido (T0=0min, T1=5min, T2=10min, T3=15min, T4=20min, T5=25min, T6=30min)

Los mismos monitoreos (orbital y sonicación) se realizaron con las enzimas papaína y neutrasa. Posteriormente se buscó optimizar el proceso evaluando el pH, temperatura y %E/S para las diferentes enzimas utilizadas ya que a pesar de existir un rango de condiciones óptimas estas varían dependiendo de la matriz a hidrolizar.

Tabla 11. Condiciones óptimas de las enzimas para hidrólisis de extractos de cerveza.

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Tiempo sin US* (min)	Tiempo con US* (min)	Enzima/sustrato (% m/m)
Papaína	8	37	30 min	15 min	0.5
Alcalasa	8	50	30 min	15 min	0.5
Neutrasa	6	45	30 min	15 min	0.5

Nota: US*= ultrasonido

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 11 se encontró que al utilizar ultrasonido el tiempo de hidrólisis se redujo a la mitad, lo cual hace el proceso más eficiente.

La optimización del proceso nos ayudó a observar la formación de péptidos y aminoácidos libres que podrían ser un aporte importante para el desarrollo de productos con valor nutricional apreciable y un valor agregado considerable, debido a su contribución al manejo de residuos agroindustriales. (Salazar-Posada 2012)

Tomando en cuenta que la solubilidad de una proteína está influenciada por factores como la composición de aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos), su

estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la misma proteína.

Los principales factores ambientales que influyen en la solubilidad de la proteína son el pH, la temperatura, la constante dieléctrica del medio y la fuerza iónica (en general las proteínas requieren algo de sal para entrar en solución (fenómeno de “salting-in”) y son precipitadas por concentraciones relativamente elevadas de sales).

Se realizó un perfil de aminoácidos que se obtienen de las diferentes enzimas utilizadas, para esto se ajustaron las muestras hidrolizadas a un mismo pH y se compararon con 15 de los 20 tipos de aminoácidos habituales y un aminoácido no esencial. La L-ornitina se considera no esencial, ya que el organismo la fabrica a partir del aminoácido L-arginina. De hecho, la ornitina y la arginina son bastante similares en su estructura. (Ornitina.com)

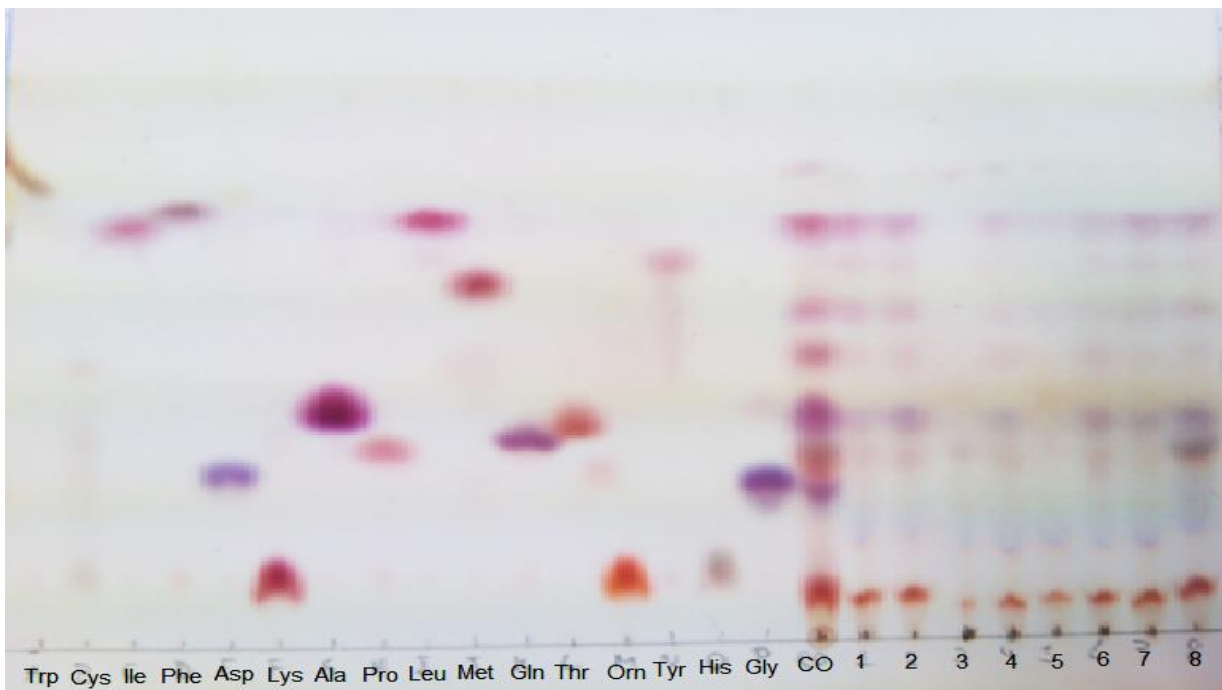


Figura 5. Perfil de aminoácidos hidrólisis enzimática del extracto de cerveza oscura (CO= control, 1=hidrólisis con alcalasa ^c/US, 2=hidrólisis con alcalasa ^s/US, 3= hidrólisis con papaína ^c/US, 4=hidrólisis con papaína ^s/US, 5= hidrólisis con neutrasa ^c/US, 6= hidrólisis con neutrasa ^s/US, 7= hidrólisis con alcalasa, papaína y neutrasa ^c/US, 6= hidrólisis con alcalasa, papaína y neutrasa ^s/US)

Tabla 12. Perfil de aminoácidos del extracto de cerveza oscura húmeda obtenidos por medio de hidrólisis enzimática.

Hidrólisis enzimática	Perfil de Aminoácidos
Control (CO)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met y Trp
Con alcalasa c/sonicación (1)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Con alcalasa s/sonicación (2)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Con papaína c/sonicación (3)	Ala, Cys, Lys, Pro y Trp
Con papaína s/sonicación (4)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Con neutrasa c/sonicación (5)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Con neutrasa s/sonicación (6)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Con alcalasa, papaína y neutrasa c/sonicación (7)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Con alcalasa, papaína y neutrasa s/sonicación (8)	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr

Se pudieron observar diferencias en el perfil de aminoácidos entre métodos y enzimas.

- 1) Se pudo observar que el control se encuentra parcialmente hidrolizado sin embargo, hubo diferencia entre los aminoácidos libres encontrados, es decir; en los hidrolizados se encontró el aminoácido Tyr mientras que en el control no se pudo observar, sin embargo el aminoácido Gly desapareció en los hidrolizados; también se pudo observar que varía la intensidad de las “marcas” entre los aminoácidos encontrados.
- 2) Utilizando la enzima alcalasa, la diferencia observada entre el utilizar sonicación y la utilización del orbital fue la desaparición del aminoácido Trp

(en el orbital) lo que nos indica que la sonicación es de ayuda para la ruptura de los enlaces peptídicos.

- 3) Con la enzima papaína se encontró mayor diferencia en el perfil pues utilizando la sonicación se pudieron encontrar 5 aminoácidos libres mientras que en orbital se encontraron 8 variando Leu, Met y Tyr. En este caso se contrasta con la enzima alcalasa, pues la sonicación no fue de ayuda para la ruptura de los enlaces peptídicos si no que pudo darse el caso de que el ultrasonido rompiera la estructura de los aminoácidos.
- 4) En cuanto a la enzima neutrasa con orbital y con sonicación, al igual que la mezcla de enzimas (alcalasa, papaína y neutrasa) con orbital y con sonicación no se observaron diferencias entre sus perfiles de aminoácidos libres.

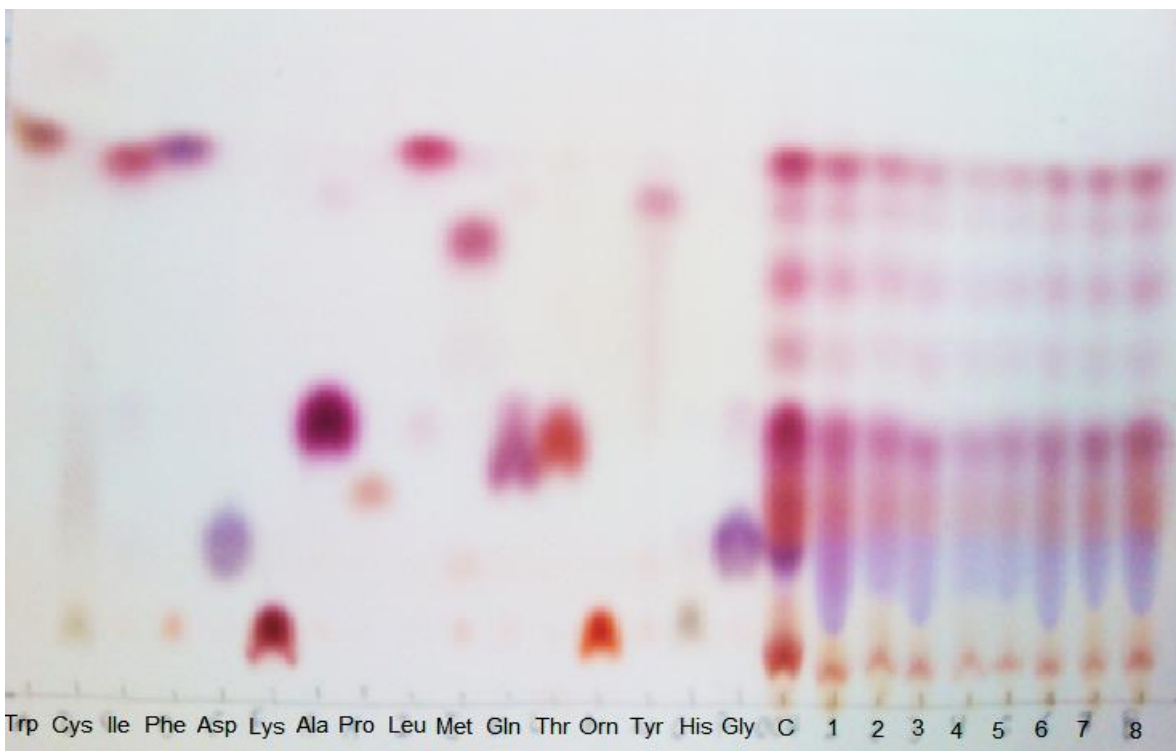


Figura 6. Perfil de aminoácidos hidrólisis enzimática del extracto de cerveza clara húmeda (C= control, 1=hidrólisis con alcalasa °/US, 2=hidrólisis con alcalasa °/US, 3= hidrólisis con papaína °/US, 4=hidrólisis con papaína °/US, 5= hidrólisis con neutrasa °/US, 6= hidrólisis con neutrasa °/US, 7= hidrólisis con alcalasa, papaína y neutrasa °/US, 6= hidrólisis con alcalasa, papaína y neutrasa °/US)

Tabla 13. Perfil de aminoácidos del extracto de cerveza clara húmeda obtenidos por medio de hidrólisis enzimática.

Hidrólisis enzimática	Perfil de aminoácidos
Control (C)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa c/sonicación (1)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa s/sonicación (2)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con papaína c/sonicación (3)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con papaína s/sonicación (4)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con neutrasa c/sonicación (5)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con neutrasa s/sonicación (6)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa, papaína y neutrasa c/sonicación (7)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa, papaína y neutrasa s/sonicación (8)	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro

En cuanto al control (extracto proteico de cerveza clara húmeda) se pudo observar que se encuentra parcialmente hidrolizado y comparándolo con los hidrolizados utilizando las diferentes enzimas y métodos físicos no se observó diferencia entre su perfil de aminoácidos libres, la única diferencia que se pudo observar es la intensidad entre las “marcas” de los aminoácidos.

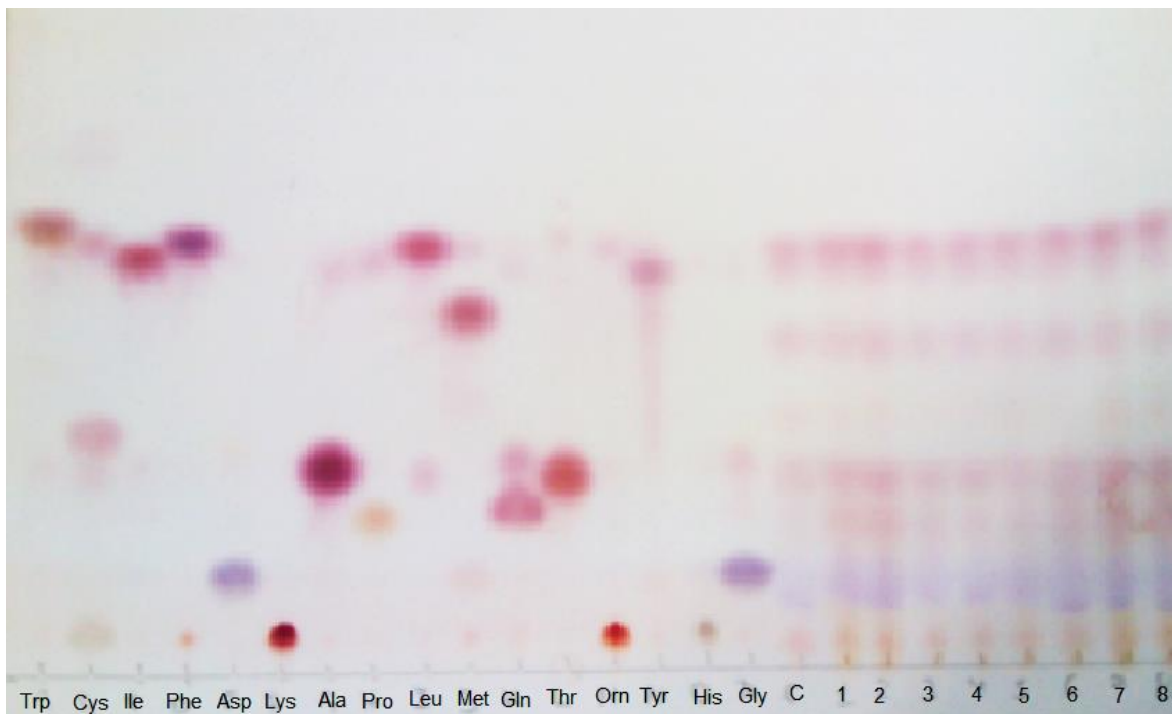


Figura 6. Perfil de aminoácidos hidrólisis enzimática del extracto de cerveza clara deshidratada (C= control, 1=hidrólisis con alcalasa °/US, 2=hidrólisis con alcalasa °s/US, 3= hidrólisis con papaína °/US, 4=hidrólisis con papaína °s/US, 5= hidrólisis con neutrasa °/US, 6= hidrólisis con neutrasa °s/US, 7= hidrólisis con alcalasa, papaína y neutrasa °/US, 6= hidrólisis con alcalasa, papaína y neutrasa °s/US)

Tabla 14. Perfil de aminoácidos del extracto de cerveza clara deshidratada obtenidos mediante hidrolisis enzimatica.

Hidrólisis enzimática	Perfil de aminoácidos
Control extracto cerveza clara deshidratada	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met y Tyr
Con alcalasa c/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa s/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con papaína c/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con papaína s/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro

Con neutrasa c/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con neutrasa s/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa, papaína y neutrasa c/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro
Con alcalasa, papaína y neutrasa s/sonicación	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Tyr y Pro

Para el extracto de cerveza clara deshidratada se pudo observar que el control se encuentra parcialmente hidrolizado y comparando el perfil de aminoácidos libres con los hidrolizados, se encontró un aminoácido libre más (Pro).

Tabla 15. Diferencias entre perfil de aminoácidos encontrados en la hidrolisis ácida y enzimática.

Hidrolisis ácida	Hidrolisis enzimática
Asp, Leu, Lys, Met, Pro	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr

Comparando el perfil de aminoácidos entre las hidrolisis con las que se trabajó (ácida y enzimática) se pudo observar que la mejor hidrólisis fue la enzimática al encontrarse un mayor perfil de aminoácidos libres.

La hidrolisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrolisis química, ácida o alcalina, entre las que cabe mencionar las siguientes:

- **Selectividad:** las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos o anti nutricionales.

- Condiciones moderadas de temperatura y pH. La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40 a 60°C y pH comprendido entre 4-8.
- No se añaden sustancias extrañas. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales.
- Se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

No obstante, en la hidrólisis enzimática de proteínas es necesario separar o desnaturalizar la enzima y trabajar en condiciones asépticas, ya que por ser un proceso relativamente lento, puede producirse contaminación microbiana de la mezcla reaccionante.

Tabla 16. Perfil de aminoácidos entre los diferentes extractos (cerveza oscura húmeda, cerveza clara húmeda y Cerveza clara deshidratada).

Muestra	Extracto de cerveza oscura húmeda	Extracto de cerveza clara húmeda	Extracto de cerveza clara deshidratada
Perfil de aminoácidos	ALA, CYS, GLY LEU, LYS, MET Y TRP	ALA, CYS, GLY LEU, LYS, MET, PRO Y TYR	ALA, CYS, GLY LEU, LYS, MET, PRO Y TYR

El mayor perfil de aminoácidos que se encontró en los hidrolizados del extracto de cerveza oscura húmeda fue la enzima alcalasa utilizando sonicación, con la enzima papaína utilizando orbital y con la enzima neutrasa utilizando sonicación. En cuanto al extracto de cerveza clara tanto húmeda como deshidratada el mayor

perfil de aminoácidos encontrados fue al utilizar la enzima Alcalasa con el método de sonicación.

7.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Se pudo encontrar el perfil de aminoácidos de las siguientes muestras:

Tabla 16. Comparación del perfil de aminoácidos por cromatografía de gases utilizando el KIT EZFAAST y el método de cromatografía en capa fina.

Muestra	Cromatografía de gases	Cromatografía en capa fina
Hidrólisis ácida	Ala, Gly y Val	Asp, Leu, Lys, Met y Pro
Extracto proteico de cerveza oscura húmeda	Ala, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Leu, Lys, Met, Phe, Trp y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met y Trp
Hidrolisis enzimática con alcalasa con US	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Met, Val, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr.	Ala, Cys, Lue, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa sin US	Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, His, Leu, Met, Val, Pro, Thr y Tyr.	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con papaína con US	Ala, Asn, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr y Tyr.	Ala, Cys, Lys, Pro y Trp
Hidrolisis enzimática con papaína sin US	Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, Val, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Lue, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Hidrolisis enzimática con neutrasa con US	Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, Leu, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr

Hidrolisis enzimática con neutrasa sin US	Ala, Asn, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro, Trp y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa con US	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa sin US	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Extracto proteico de cerveza clara húmeda	Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, Leu, Met, Val, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa con US	Asn, Asp, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Orn, Trp y Tyr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa sin US	Asn, Asp, Gln, Glu, His, Leu, Phe, Trp y Tyr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con papaína con US	Asp, Gln, Glu, Phe y Tyr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con papaína sin US	Gln	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con neutrasa con US	Ala, Asp, Gln y Trp	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con neutrasa sin US	Ala, Gly, Pro, Ser y Thr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa con US	Ala, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Val, Phe, Pro y Tyr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa, papaína y	Ala, Asp, Gln, Glu, His, Phe, Pro y Tyr	Ala, Gly, Cys, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr

neutrasa sin US		
Control extracto proteico de cerveza clara deshidratada	Ninguno	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa con US	Asp, Gln, Glu, His, Val, Phe, Trp y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa sin US	Ala, Asp, Glu, His, Lys, Met, Val, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con papaína con US	Ala, Glu, Phe, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con papaína sin US	Ala, Glu, Phe, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con neutrasa con US	Ala, Asp, Glu, Val, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con neutrasa sin US	Ala, Glu, Phe, Pro, Ser, Thr y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa con US	Asp, Gln, Glu, His, Val, Phe y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr
Hidrolisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa sin US	Asp, Gln, Glu, His, Val, Phe y Tyr	Ala, Cys, Gly, Leu, Lys, Met, Pro y Tyr

Se pudo observar que el perfil de aminoácidos varía entre ambos métodos analíticos pudiéndose encontrar más aminoácidos al utilizar el cromatógrafo de gases con el KIT EZFAAST, sin embargo algunos otros aminoácidos no fueron posible detectarse. No se piensa que los métodos analíticos utilizados sea mejor uno que el otro, sin embargo se piensan dos posibles incertidumbres; una es que las condiciones con las que se trabajó el cromatógrafo tal vez no fueron las

adecuadas para ciertos aminoácidos; y la otra es que el Kit tenía algún tiempo de haberse adquirido y tal vez algún reactivo no cumpliera con la adecuada derivatización en las muestras.

8. CONCLUSIONES

- Los hidrolizados enzimáticos presentan mayor ventaja que los hidrolizados químicos en cuanto al perfil de aminoácidos libres encontrados.
- Las condiciones óptimas que se encontraron para realizar las hidrolisis enzimáticas fueron: para papaína pH=8, temperatura de 37°C y relación E/S del 0.5%, para alcalasa pH=8, temperatura de 50°C y relación E/S del 0.5%, y para la neutrasa pH= 6, temperatura de 45°C y relación E/S del 0.5%
- El uso de sonicación redujo el tiempo de hidrólisis a la mitad.
- El extracto de cerveza clara presenta mayor perfil de aminoácidos libres que el de la cerveza oscura.
- Hay un mayor perfil de aminoácidos en el extracto de cerveza oscura utilizando alcalasa con el método de sonicación, con papaína utilizando orbital y con neutrasa utilizando sonicación, para el extracto de cerveza clara tanto húmeda como deshidratada el mayor perfil de aminoácidos encontrados fue con la enzima alcalasa utilizando sonicación.
- El hidrolizado se puede utilizar como fuente de nitrógeno en alimentación (preparación de alimentos o dietas enterales).

9. ANEXO

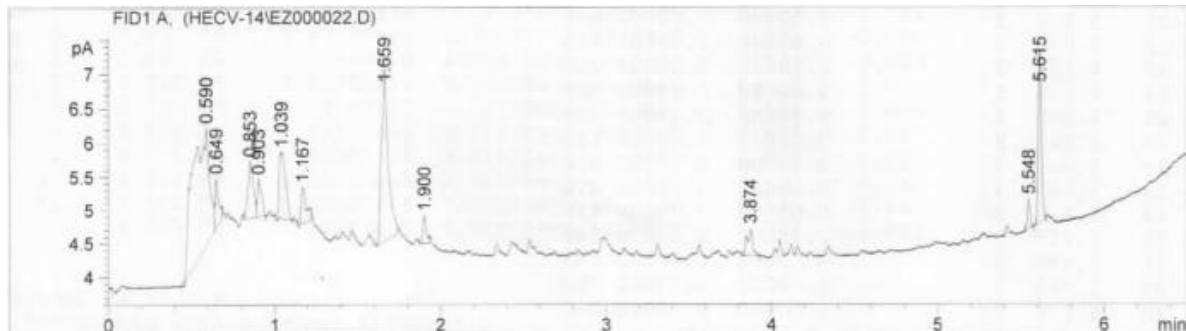
➤ Tiempos de retención de estándares de aminoácidos.

AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
ALA	1.669
SAR	1.731
GLY	1.777
ABA	1.879
VAL	1.974
BAIB	2.052
IS	2.100
LEU	2.181
AILE	2.210
ILE	2.239
THR	2.447
SER	2.489
PRO	2.562
ASN	2.652
TPR	3.002
ASP	3.171
MET	3.209
HYP	3.342

GLU	3.511
PHE	3.553
AAA	3.800
APA	4.050
GLN	4.133
ORN	4.496
GPR	4.550
LYS	4.741
HIS	4.925
HYL	5.099
TYR	5.192
PHP	5.417
TRP	5.490
CTH	5.918
C-C	6.138

Cromatogramas para perfil de aminoácidos en Cromatografía de gases.

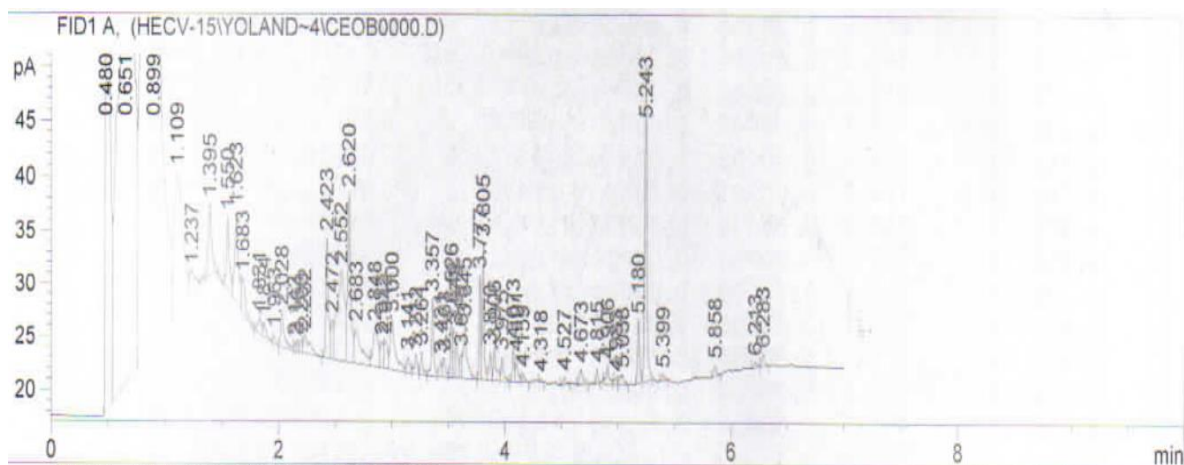
➤ Hidrólisis ácida.



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.659	7.282
GLY	1.897	0.744
VAL	1.900	0.619

➤ Cromatogramas del extracto de cerveza oscura húmeda.

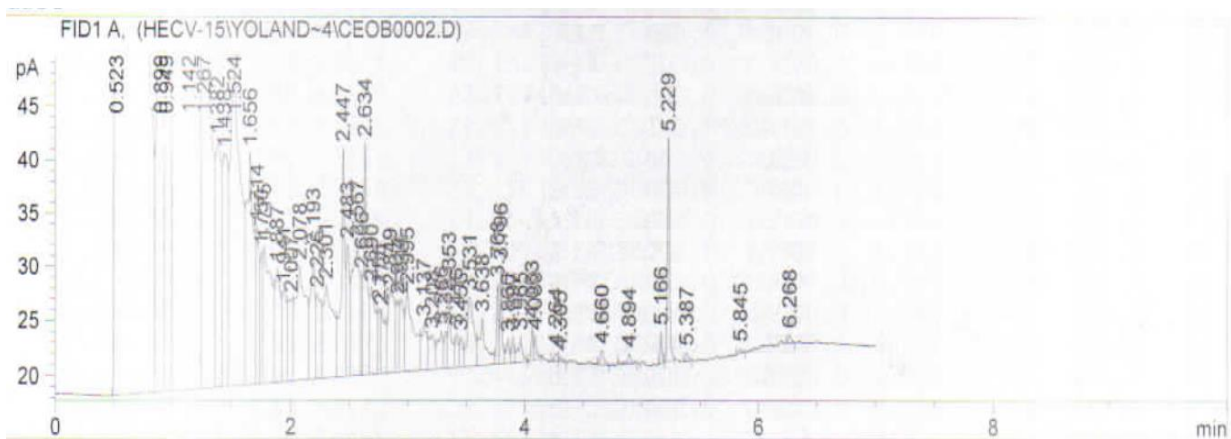
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.623	18.863
GLY	1.713	46.396
VAL	1.963	1.093
LEU	2.164	1.042
THR	2.423	17.132
SER	2.472	6.277

PRO	2.552	39.33028
ASN	2.620	9.287
ASP	3.141	2.528
MET	3.212	3.255
GLU	3.526	7.079
PHE	3.549	5.707
GLN	4.101	3.541
HIS	4.906	3.641
TYR	5.180	7.321

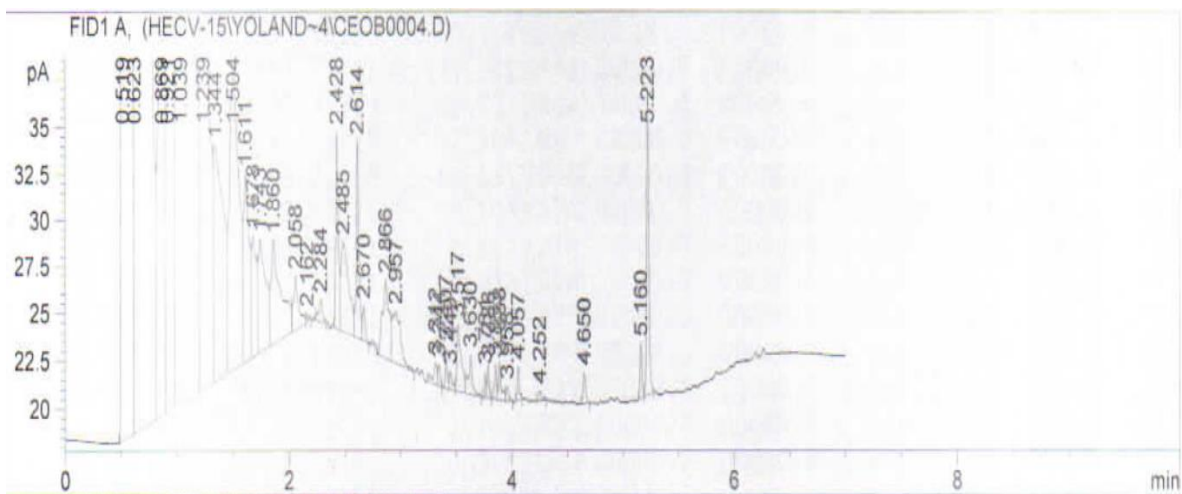
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.656	89.353
GLY	1.714	27.932
VAL	1.941	21.614

LEU	2.193	30.749
THR	2.423	17.132
PRO	2.567	54.141
ASN	2.634	41.869
ASP	3.137	13.499
MET	3.208	10.434
GLU	3.531	24.174
HIS	4.945	7.666
TYR	5.166	3.286

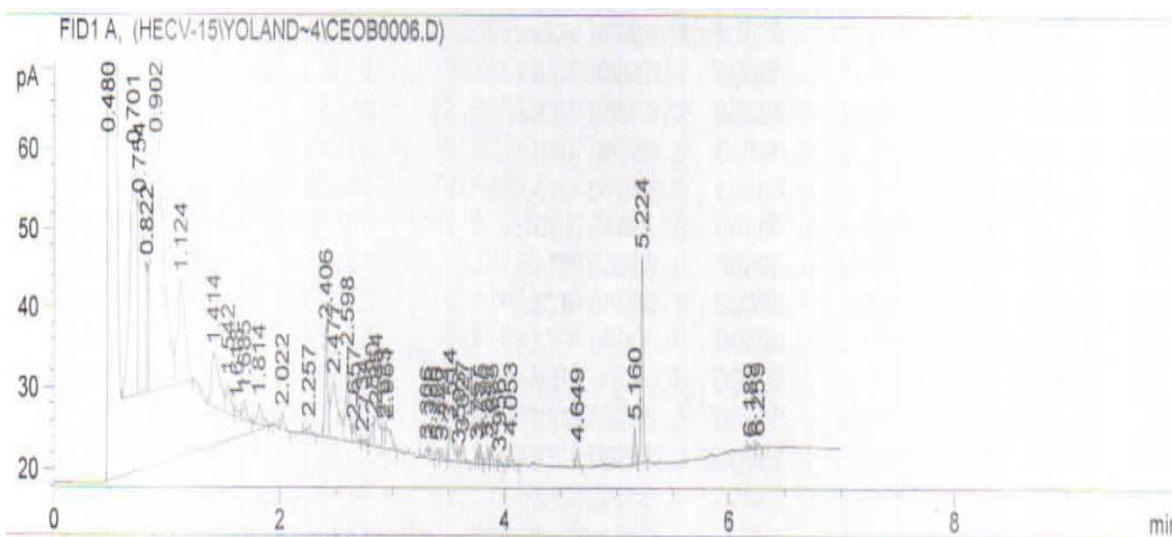
➤ Hidrólisis enzimática con papaína con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.611	33.970
GLY	1.743	28.297

LEU	2.162	6.385e-1
THR	2.428	167.794
SER	2.485	23.071
ASN	2.614	17.111
GLU	3.517	9.186
TYR	5.160	3.379

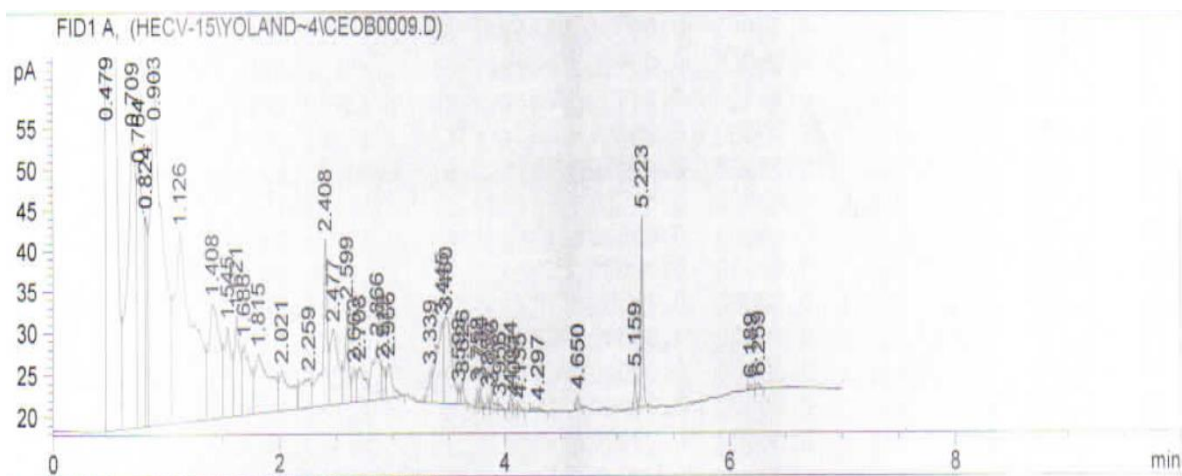
➤ Hidrólisis enzimática con papaína sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.685	6.189
GLY	1.717	30.536
VAL	1.946	8.144
THR	2.406	23.137
SER	2.477	32.158

PRO	2.598	20.06
ASN	2.657	4.314
ASP	3.144	3.767
GLU	3.514	9.98
PHE	3.593	1.647
TYR	5.160	5.286

➤ Hidrólisis enzimática con neutrasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.608	46.124
GLY	1.741	46.182
LEU	2.184	8.195
THR	2.430	48.815
SER	2.470	30.058
PRO	2.557	6.664

GLU	3.531	64.759
PHE	3.556	35.04
GLN	4.135	1.127
TYR	5.160	4.086

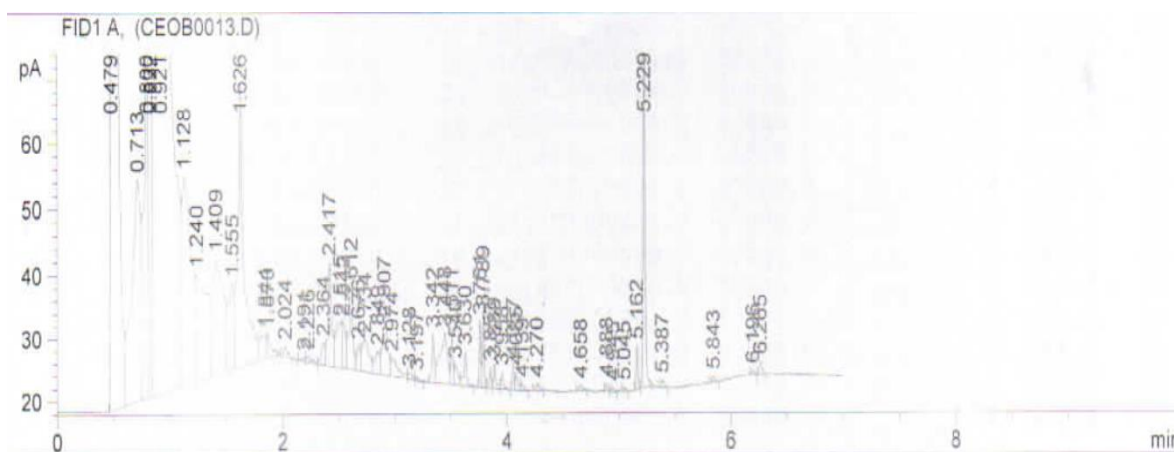
➤ Hidrólisis enzimática con neutrasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.692	80.196
GLY	1.754	54.93
LEU	2.175	8.458
THR	2.424	55.275
SER	2.447	96.327
PRO	2.572	13.064
ASN	2.632	35.762

GLU	3.512	29.035
PHE	3.546	19.208
GLN	4.144	1.703
TYR	5.176	5.17

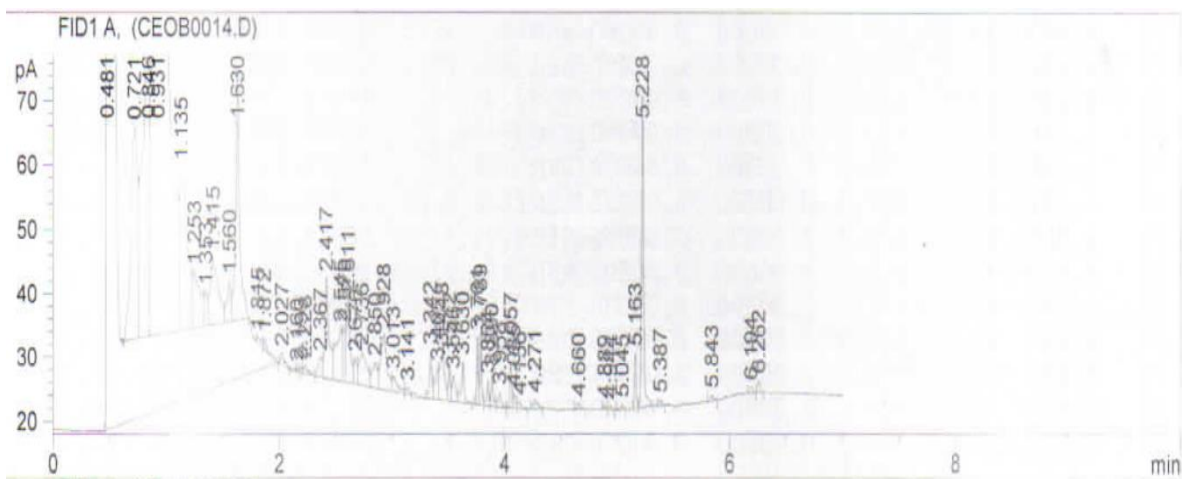
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.623	164.402
LEU	2.191	1.226
THR	2.417	38.841
SER	2.420	44.479
PRO	2.541	44.953
ASN	2.616	27.911
ASP	3.142	3.477
GLU	3.513	9.97

PHE	3.544	7.976
GLN	4.142	2.685
HIS	4.945	0.912
TYR	5.162	8.089

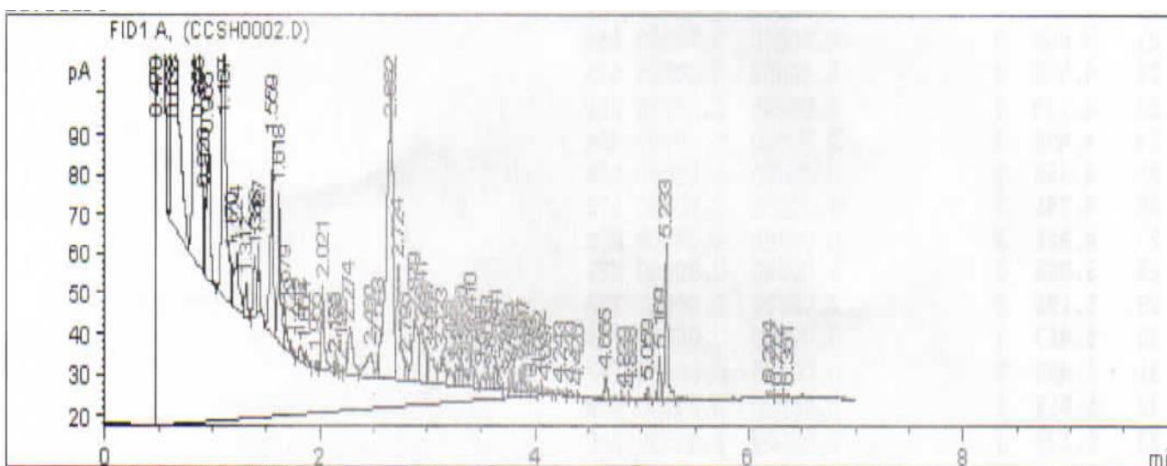
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.630	93.95
LEU	2.194	12.857
THR	2.416	59.255
SER	2.472	39.587
PRO	2.579	13.183
ASN	2.676	8.197
ASP	3.141	2.661
GLU	3.512	7.203

PHE	3.546	8.317
GLN	4.136	2.125
HIS	4.944	0.981
TYR	5.163	9.849

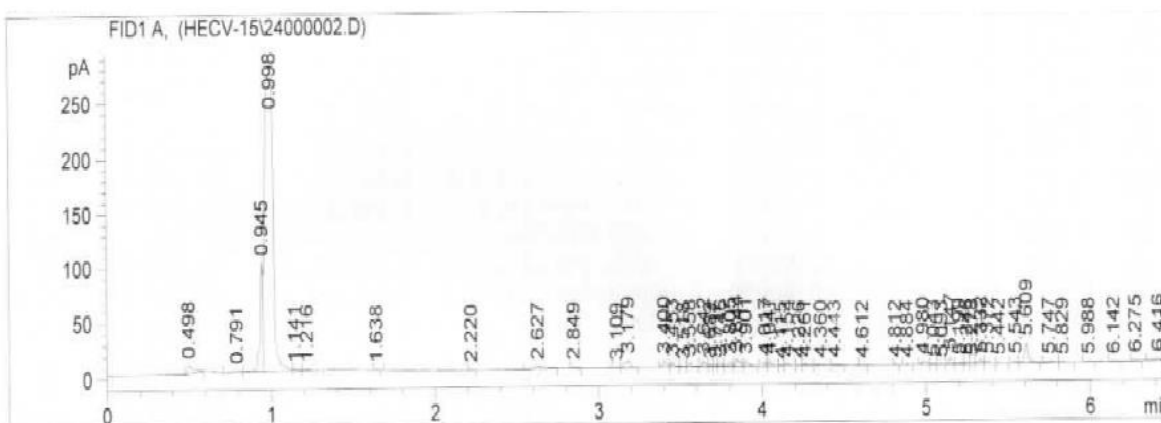
➤ Control extracto proteico de cerveza clara húmeda



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE	
	RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.618	64.216
GLY	1.728	0.692
VAL	1.955	2.100
LEU	2.158	2.232
THR	2.447	26.060
SER	2.469	23.667
PRO	2.543	9.706

ASN	2.662	290.156
ASP	3.133	15.873
MET	3.288	10.758
GLU	3.516	5.344
PHE	3.563	7.102
TYR	5.169	11.496

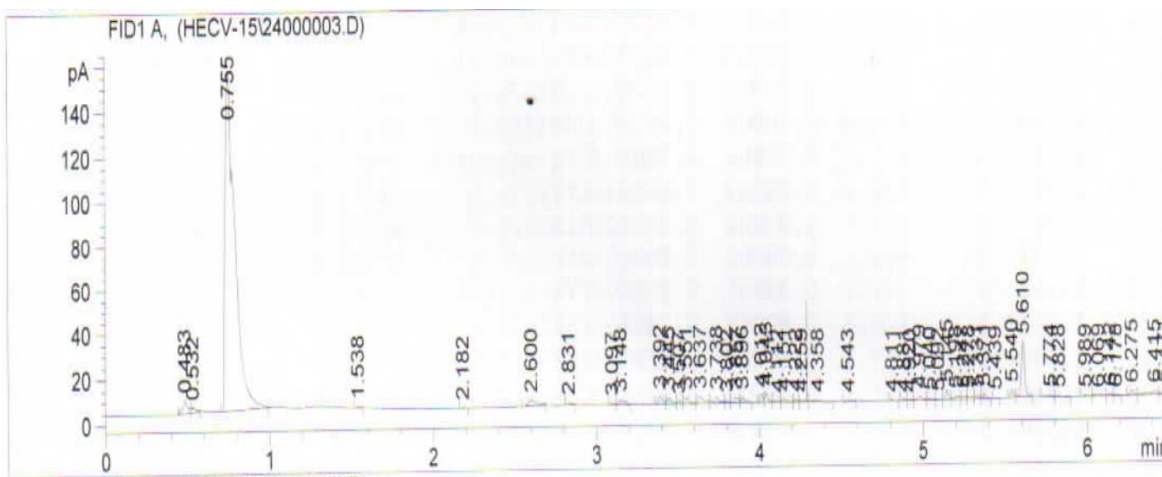
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
LEU	2.190	2.109
ASN	2.641	17.967
ASP	3.183	5.727
GLU	3.526	1.776
PHE	3.562	5.418
GLN	4.165	3.740

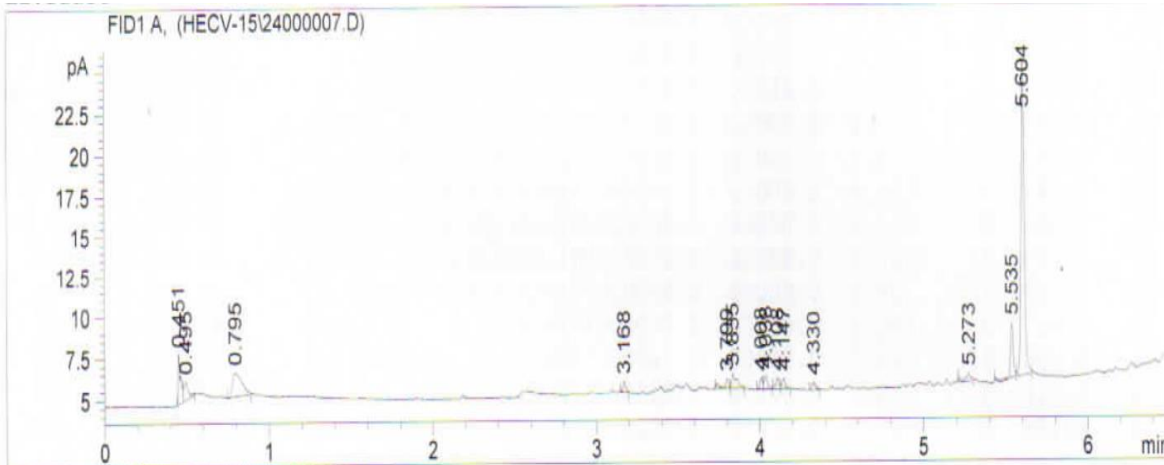
ORN	4.493	2.177
HIS	4.992	6.381
TYR	5.158	7.133

➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa sin US



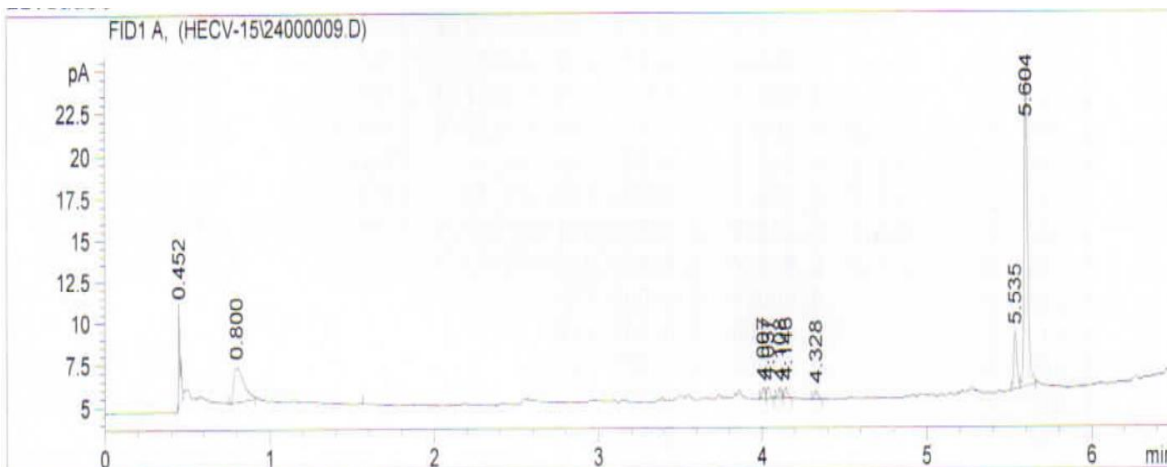
AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
LEU	2.182	0.504
ASN	2.600	9.172
ASP	3.148	4.578
GLU	3.507	1.781
PHE	3.551	4.498
GLN	4.151	2.301
HIS	4.979	4.373
TYR	5.145	4.827

➤ Hidrólisis enzimática con papaína con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ASP	3.171	1.548
GLN	4.109	1.245
TYR	5.140	2.216

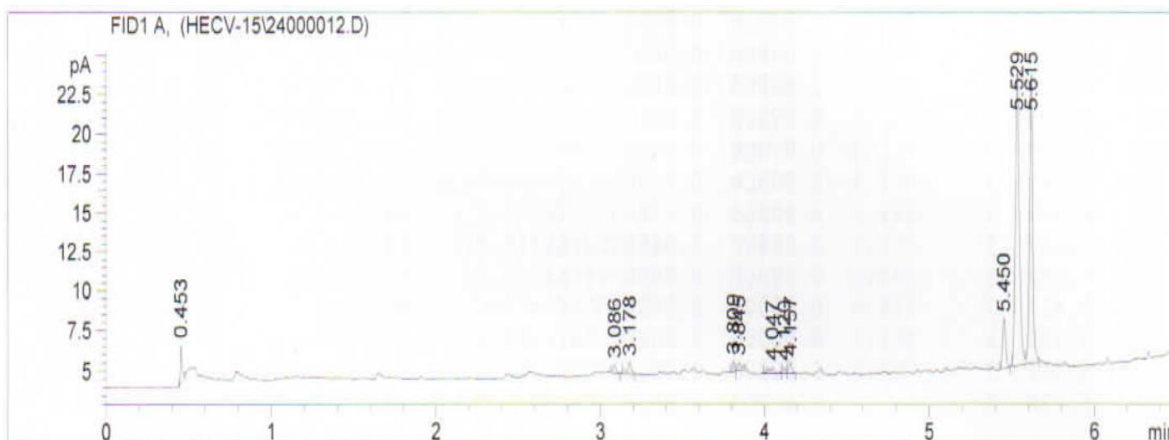
➤ Hidrólisis enzimática con papaína sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
------------	---------------------------	-------------

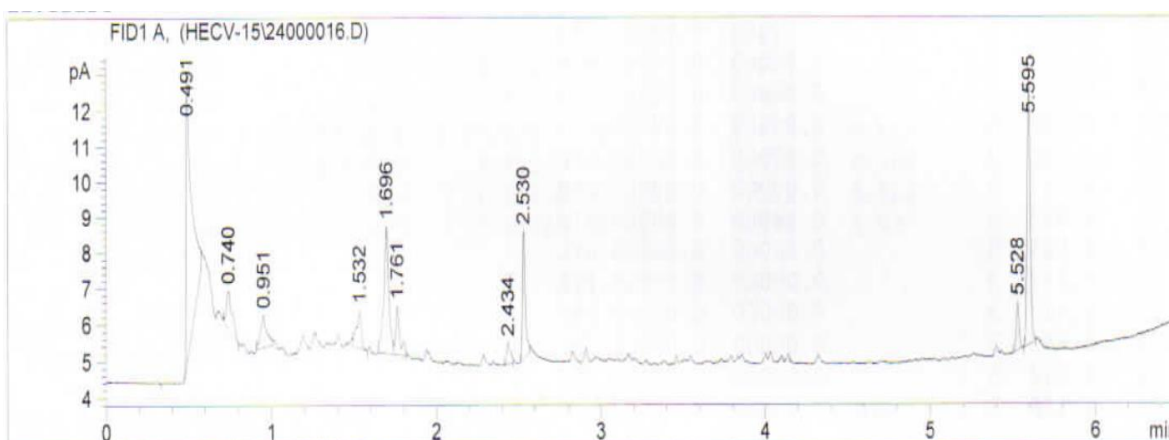
GLN	4.146	0.804
------------	--------------	--------------

➤ Hidrólisis enzimática con neutrasa con US



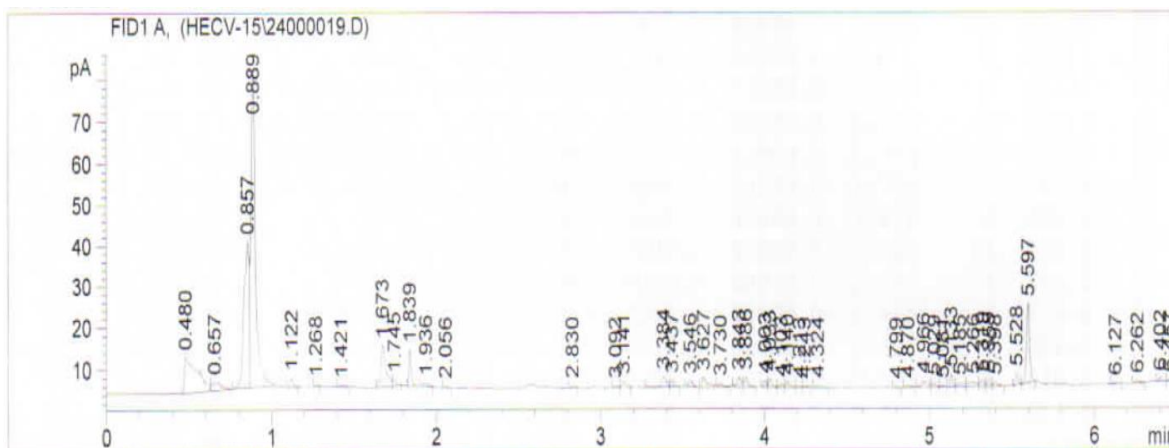
AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.640	4.014
ASP	3.178	1.214
GLN	4.157	0.847
TRP	5.450	4.068

➤ Hidrólisis enzimática con neutrasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.643	9.789
GLY	1.761	2.280
THR	2.423	1.624
SER	2.454	0.918
PRO	2.530	4.175

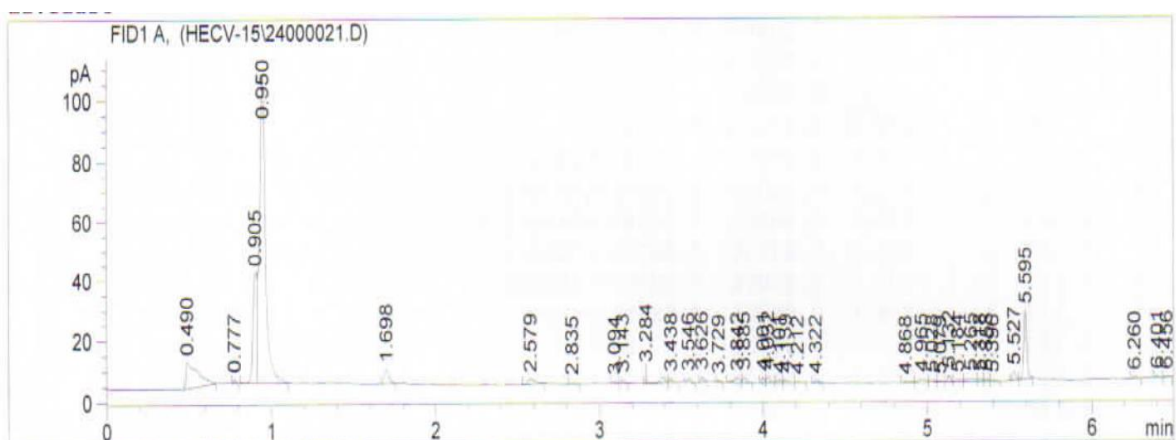
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.693	26.251
VAL	1.951	2.057
LEU	2.164	1.042
PRO	2.574	4.710
ASP	3.143	1.862

GLU	3.524	1.641
PHE	3.559	2.523
GLN	4.140	1.302
HIS	4.967	2.541
TYR	5.134	2.697

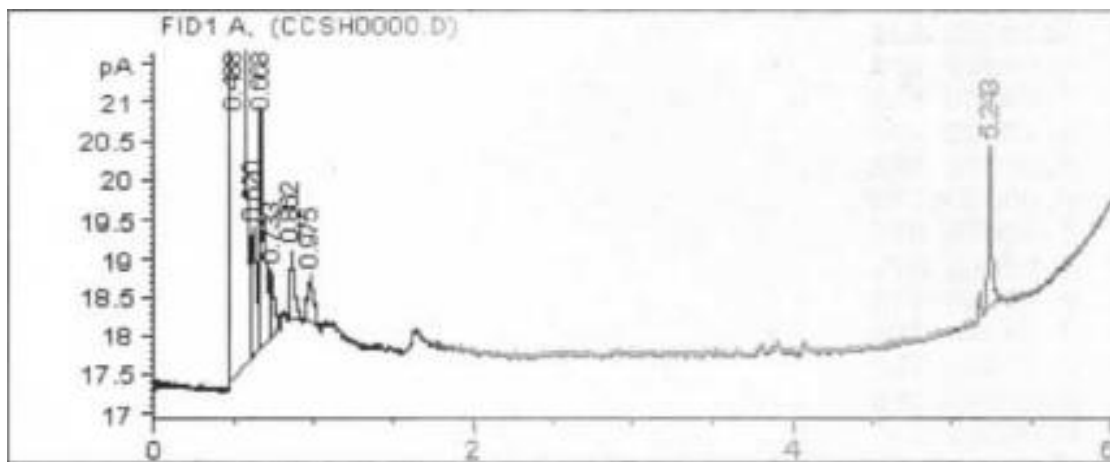
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa sin US



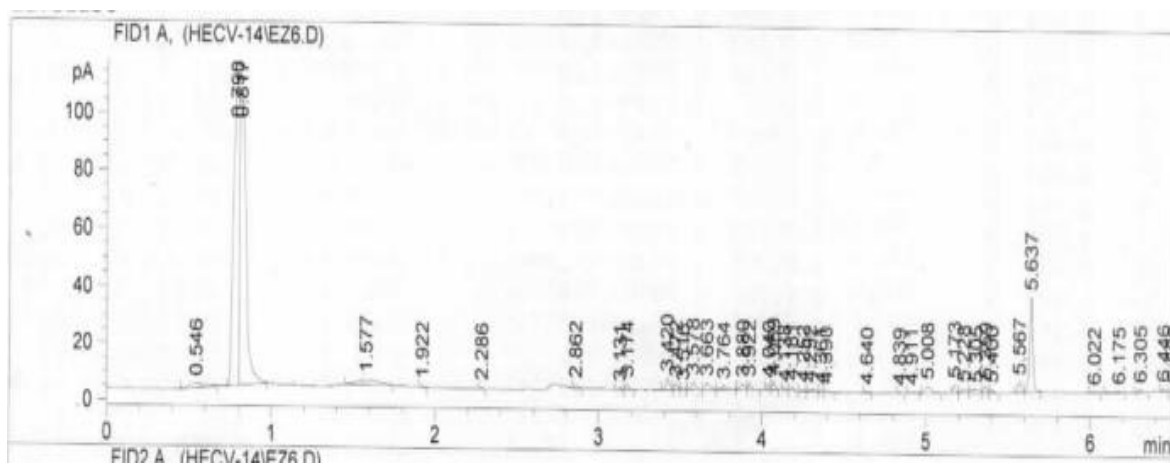
AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.698	8.703
PRO	2.579	4.989
ASP	3.143	1.556
MET	3.284	3.454
GLU	3.526	2.156
PHE	3.566	3.968
GLN	4.139	1.407

HIS	4.965	2.746
TYR	5.132	2.484

➤ Control extracto proteico de cerveza clara seca



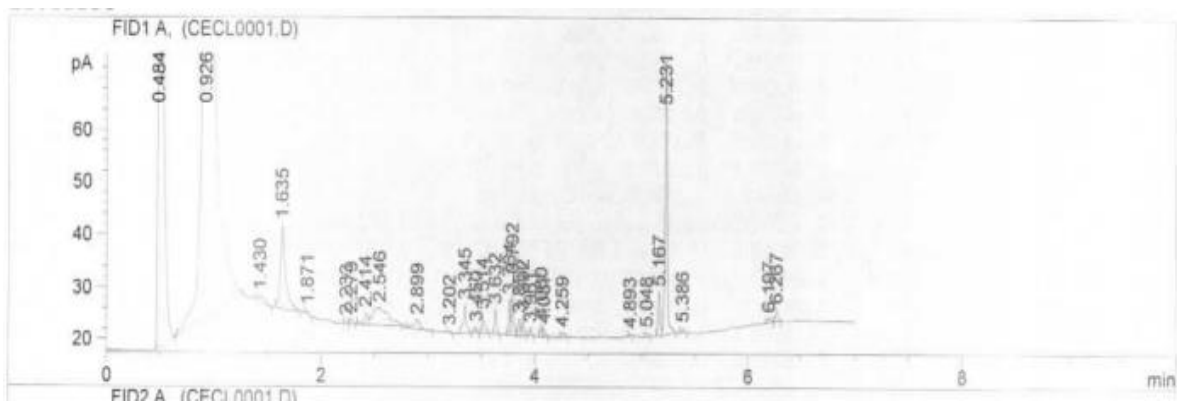
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ASP	3.168	1.613
GLU	3.510	0.776

PHE	3.573	4.793
GLN	4.172	2.183
HIS	4.904	0.943
TYR	5.167	2.384

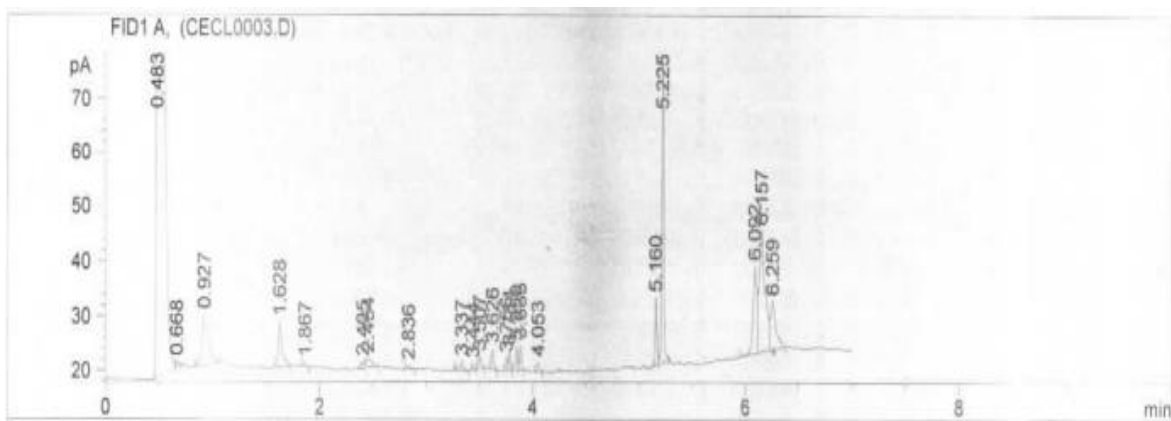
➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.635	53.422
THR	2.414	5.515
SER	2.458	6.847
PRO	2.546	35.029
ASP	3.199	0.852
MET	3.202	0.460
GLU	3.514	6.367
PHE	3.559	10.501
LIS	4.701	0.462

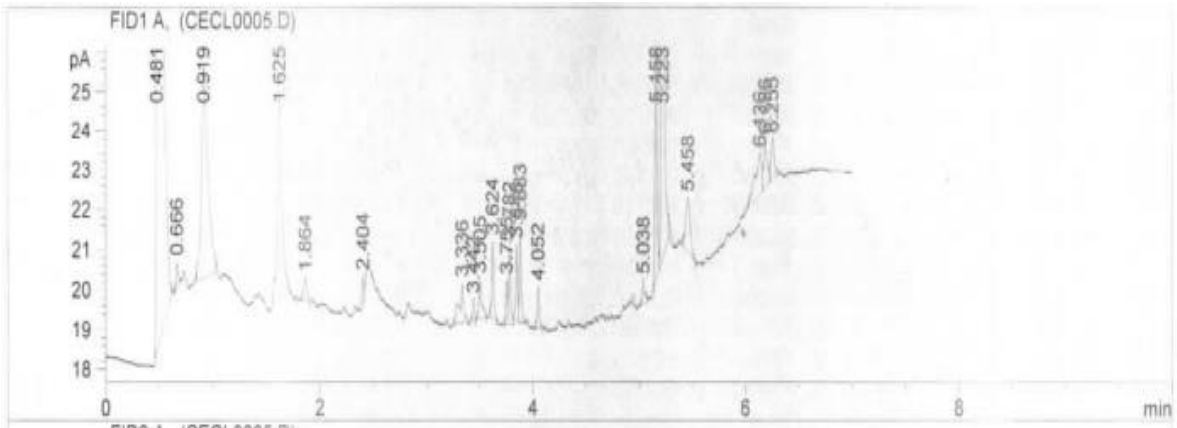
HIS	4.943	1.087
TYR	5.167	11.144

➤ Hidrólisis enzimática con papaína con US



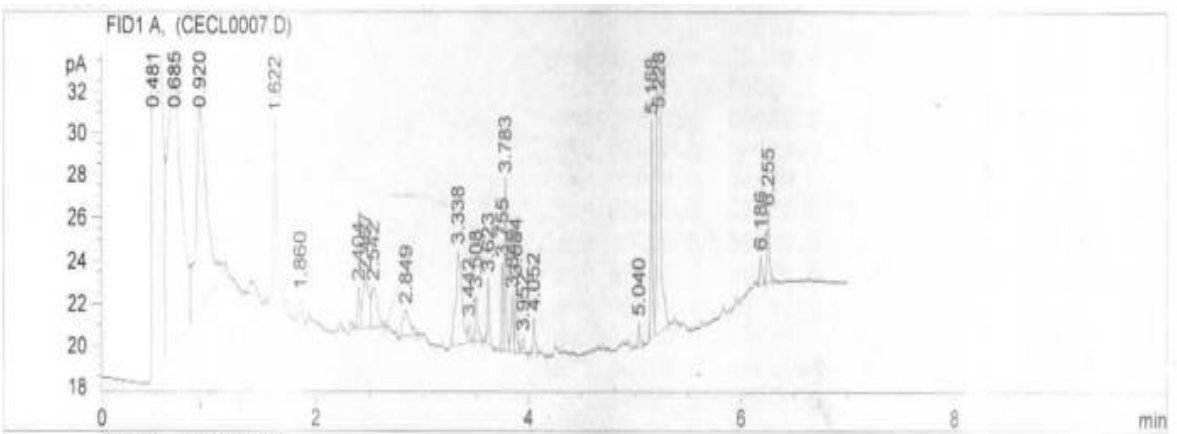
AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.628	20.544
THR	2.404	1.611
SER	2.454	6.842
GLU	3.507	4.147
PHE	3.594	2.270
TYR	5.160	15.498

➤ Hidrólisis enzimática con papaína sin US



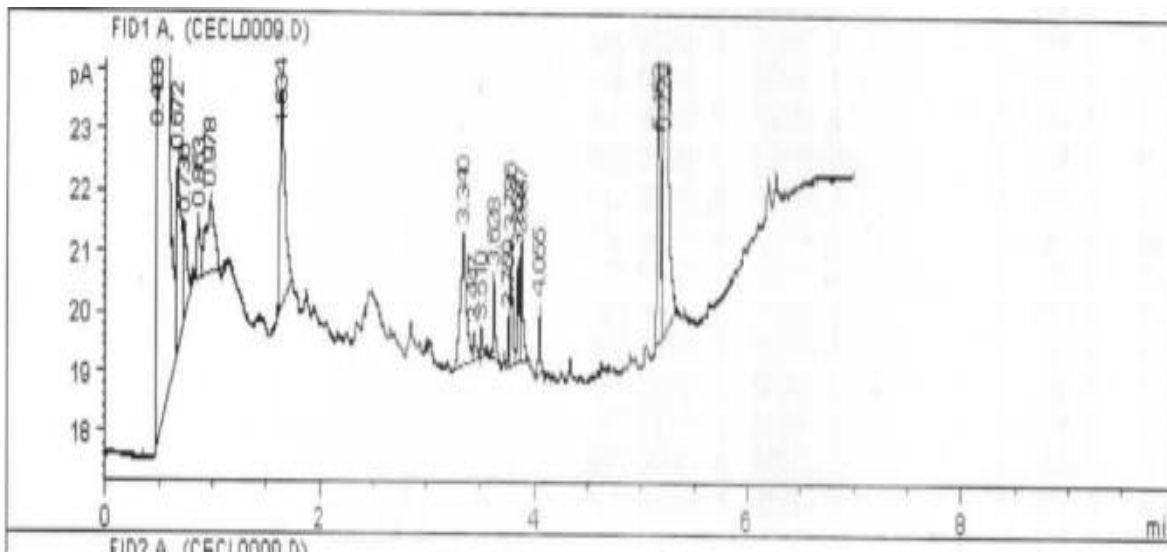
AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.625	13.811
THR	2.404	0.982
SER	2.452	0.890
GLU	3.505	1.829
PHE	3.565	1.643
TYR	5.158	9.381

➤ Hidrólisis enzimática con neutrasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.622	20.915
VAL	1.933	1.071
THR	2.404	9.973
SER	2.467	9.873
GLU	3.508	3.697
PHE	3.568	4.109
ASP	3.116	1.145
TYR	5.158	13.328

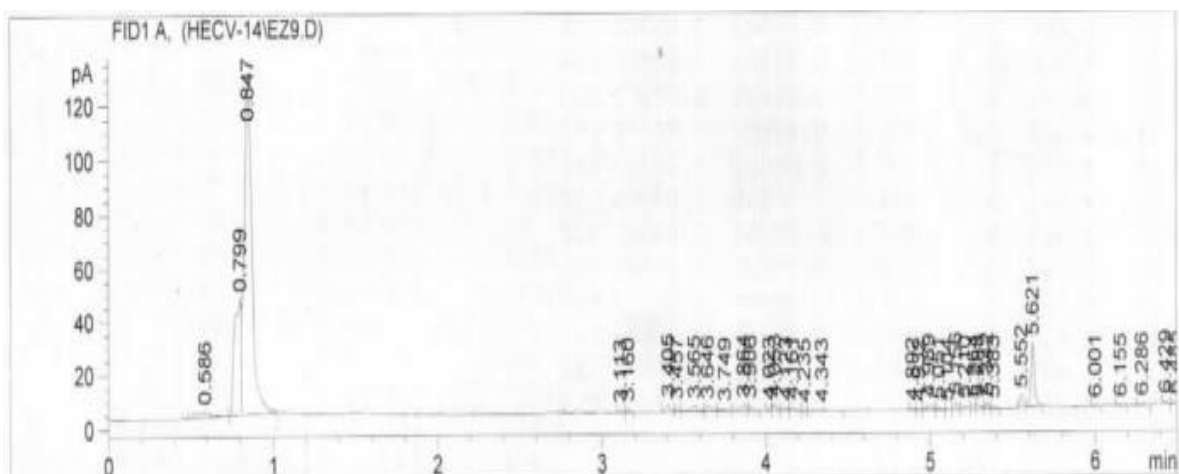
➤ Hidrólisis enzimática con neutrasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.625	13.811

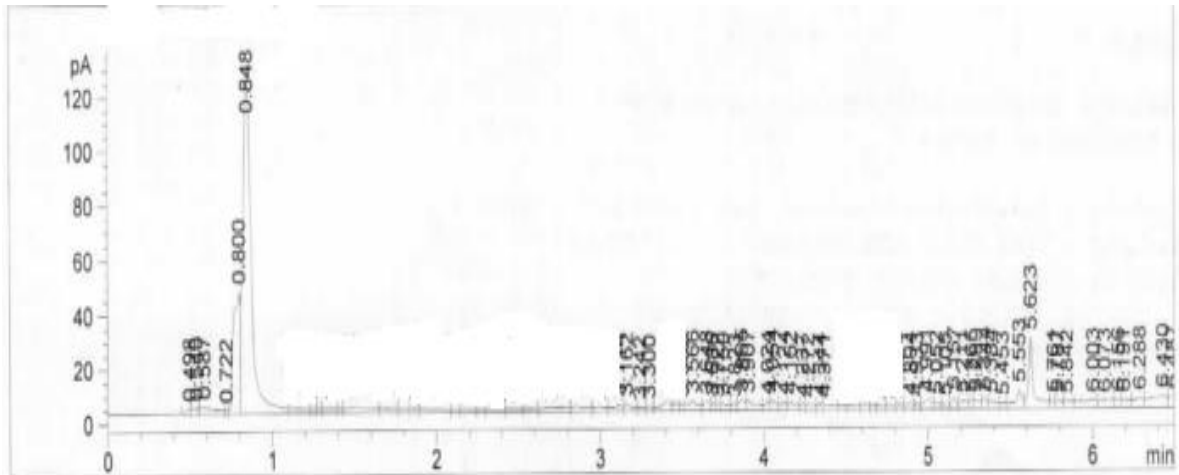
THR	2.404	0.982
SER	2.452	0.890
GLU	3.505	1.829
PHE	3.565	1.643
TYR	5.158	9.381

➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa con US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.634	8.114
THR	2.416	2.978
SER	2.444	2.298
GLU	3.509	13.076
PHE	3.556	1.029
TYR	5.163	10.366

➤ Hidrólisis enzimática con alcalasa, papaína y neutrasa sin US



AMINOÁCIDO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ÁREA (pA*s)
ALA	1.636	7.161
THR	2.418	2.325
SER	2.442	2.387
GLU	3.511	11.358
PHE	3.558	0.989
TYR	5.160	10.684

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen Jens. Enzymatic hydrolysis of food proteins, Editorial Elsevier applied science publishers, Estados Unidos, NY, 1986, pp 18, 153-157.
- Adler-Nissen Jens. "Proteases" in Enzymes in food processing, 3ª edición, Editorial Elsevier applied science publishers, Estados Unidos NY, 1993, pp 159-203.
- AINIA (Instituto Tecnológico Agroalimentario). Mejores técnicas disponibles en el sector cervecero (consultada el 18 de enero del 2016) disponible en: <<http://www.prtr-es.es/data/images/La%20industria%20cervecera-74F8271308C1B002.pdf>>
- Alcalasa: vestida para la ocasión, Ma. Gabriela de la Fuente Betancourt, p17 (consultada el 25 de junio del 2015) disponible en: <http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2004_2/alcalasa.pdf>
- Aminoacido.eu. Su portal de internet sobre aminoácidos (consultada el 20 de octubre del 2015) [en línea] <<http://www.aminoacido.eu/aminoacidos/>>
- *Animal político. Cerveza artesanal "el boom" invisible en México* [en línea] México 2015 (fecha de consulta 15 de octubre del 2015) disponible en: <<http://www.animalpolitico.com/2015/06/cerveza-artesanal-el-boom-invisible-en-mexico/>>
- Barth J.; Gmbh S.; Co KG. The Barth Report 7/9 [en línea] julio 2015 (consultada el 21 de octubre del 2015) disponible en: <http://www.barthhaasgroup.com/images/pdfs/reports/2015/BarthReport_2014-2015_EN.pdf>
- Benítez R., Ibarz A., Pagan, J., 2008, Protein hydrolysates: processes and applications, Grupo de Química de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad del Cauca. Popayán-Colombia, pp. 227-235.

- COFUPRO. Plan estratégico de investigación y transferencia de tecnología. Cadena agroalimentaria de cebada [En línea] (consultada el 22 de octubre del 2015) disponible en: <http://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit16.pdf>
- Callejo González M.J. Industrias de cereales y derivados, Editorial Mundiprensa, 1ª edición, Madrid 2002, pp 171-173,244-280.
- Castro Aravena Franklin Mauricio (2003). *Estudio de los residuos industriales líquidos e}y evaluación de las alternativas para la industria cervecera Valdivia*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias, Chile, pp. 2, 3, 14.
- Carlos Diez José. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS “SDS PAGE”, 2014. Proveniente de Unidad docente de Bioquímica y Biología molecular (Universidad de Alcalá). (consultada el 24 de junio del 2015) [En línea]: <http://www3.uah.es/jcdiez/biologia%20sanitaria/metodos%20biologia%20moleculare/quion.metodos.bs.2014.pdf>
- De proteína. Hidrólisis de proteínas (página consultada el 24 de junio del 2015) disponible en: <http://deproteinas.com/hidrolisis-de-proteinas>
- Depósito de documentos de la FAO. Métodos analíticos para la determinación de la humedad, alcohol, energía, materia grasa y colesterol en alimentos. [en línea] (página consultada el 26 de octubre del 2015) disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s16.htm>
- Depósito de documentos de la FAO. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. [en línea] (página consultada el 24 de junio del 2015) disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>
- Depósito de documentos de la FAO. Macronutrientes: carbohidratos, grasas y proteínas. . [en línea] (página consultada el 28 de junio del 2015) disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0d.htm>

- Espasa M. R. La fertilización foliar con aminoácidos [En línea] (consultada el 24 de octubre del 2015) disponible en <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_1983_12_33_35.pdf>
- Fennema Owen R. Química de los alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1998, pp. 278-285.
- Fernández Reyes Emilio; Galván Cejudo Aurora. Métodos para la cuantificación de proteínas. Proveniente de archivos de interés: Prácticas generales de Bioquímica y Biología molecular. [En línea] (página consultada el 24 de junio del 2015) disponible en: <<http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm>>
- García Garibay Mariano. Biotecnología alimentaria, Editorial Limusa, México D.F., 2004, pp 103-121, 401-419.
- Guadix, A.; Guadix, E.; Paez Dueñas, M. P.; González-Tello, P.; Camacho, F. Technological processes and methods of control in the hydrolisys of proteins. Departamento de ingeniería Química, Universidad de Granada, Ars Pharmaceutica 41:1; 79-89 [en línea] 2000: [Fecha de consulta: 9 de octubre de 2015] Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/183.pdf>
- Hernández Nayelli, Reyes Mónica, González Francisco, Núñez Lucila, Cooper Bárbara. Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas). Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 2015, pp 1-5,
- Horst-Dieter Tscheuschner. Fundamentos de tecnología de los alimentos, Editoria Acribia, Zaragoza España, 2001, pp 483-490
- International Trade Centre. Trade Map. [en línea] (fecha de consulta 21 de octubre del 2015) disponible en: <http://www.trademap.org/Country_SelProduct_TS.aspx>

- Iturbide Chiñas Francisca Aída; Sandoval Guillén Julieta. Manual de Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas, Facultad de Química UNAM, México 2013, pp 45-54, 83-88.
- Lee Byong H. Fundamentos de biotecnología de los alimentos, Editorial Acribia S.A, Zaragoza España, 2000, pp 16-25, 34-43, 332, 432-439
- Metcalf y Eddy Waste. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Editorial Mc Graw-Hill, Singapure 1995, pp 29, 42-44, 99.
- Muller H.G. Nutrición y ciencia de los alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1998, p 20
- NMX-F-096-1970. CALIDAD PARA PROTEÍNAS VEGETALES HIDROLIZADAS. HYDROLYZED VEGETAL PROTEINS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
- Ornitina.com [en línea] (página consultada el 28 de octubre del 2015) disponible en: <<http://www.ornitina.com/>>
- Quiminet.com Los aminoácidos y su aplicación en cosmética. [en línea] (página consultada el 31 de noviembre del 2015) disponible en: <<http://www.quiminet.com/articulos/los-aminoacidos-y-su-aplicacion-en-cosmetica-21753.htm>>
- Ramesh C.; Renuka M.; Kenneth L. Visualization of N-protected peptides, amino acids and aminocyclitol antibiotics a thin-layer chromatogram by ninhydrin. Journal of Chromatography, 170 (1979), Elsevier Scientific Publisher Company, Amsterdam, pp 498-501
- Robinson David S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1991, pp 143-155, 161, 162
- Salazar-Posada, C., López-Padilla, A., Cano-Salazar, J. A. Efecto del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de subproductos de la industria bovina. Revista Lasallista de Investigación [en línea] 2012, 9 (Julio-

Diciembre) : [Fecha de consulta: 9 de octubre de 2015] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69525875002>> ISSN 1794-4449>

- Sánchez C.L., Franco L., Bravo R., Rubio C., Rodríguez A., Barriga C., Cubero J. Cerveza y salud, beneficios en el sueño. Revista española de nutrición comunitaria. Elsevier. Vol. 16-3, 2010 [en línea] (Fecha de consulta: 3 de marzo de 2016) Disponible en:< <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-nutricion-comunitaria-299-articulo-cerveza-salud-beneficios-el-sueno-90000685>>
- Wieser Herbert. Chemistry of guten proteins. Elsevier. Food Microbiology, 2006, pp 115-119.
- Wong Dominic W. S. Química de los alimentos: Mecanismos y teoría, Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, 1995, pp 217-223