

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

RC-07-016
Rev. 02- 10/07



“Detección y selección de metabolitos bioquímicos como marcadores
de calidad en el proceso cervecero”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MC. Claudia Berenice López Alvarado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



RC-07-016
Rev. 02- 10/07

“Detección y selección de metabolitos bioquímicos como marcadores de calidad
en el proceso cervecero”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MC. Claudia Berenice López Alvarado

COMITÉ DE TESIS

Dr. Benito Pereyra Alférez
Presidente

Dr. Luis J. Galán Wong
1 Vocal

Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Secretario

Dr. Hugo A. Luna Olvera
2 Vocal

Dr. Jorge H. García García
3 Vocal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

RC-07-016
Rev. 02- 10/07



“Detección y selección de metabolitos bioquímicos como marcadores de calidad en el proceso cervecero”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MC. Claudia Berenice López Alvarado

Dirección de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Director de Tesis

Dr. Luis C. Damas Buenrostro
Asesor Externo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

RC-07-016
Rev. 02- 10/07



El Presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 4 (L4) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas/UANL, bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez y en el laboratorio de Microbiología y Oficina de la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma bajo la dirección del Dr. Luis C. Damas Buenrostro

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero a través del proyecto “Optimización del proceso a partir de un Análisis de Genómica Estructural y Funcional en Levaduras y Malta” (231412) apoyado por el Programa de Estímulos a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación. Además del apoyo económico a mí como becaria Conacyt (290134).

Quisiera agradecer a Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, especialmente al Dr. Luis C. Damas Buenrostro y MC. Esmeralda Pérez Ortega por su gran apoyo para el diseño de la investigación y su continuo interés, así como ayuda y confianza a lo largo del proyecto para la obtención de resultados.

De igual manera a mis compañeros de laboratorio en el L4 del Instituto de Biotecnología; Hugo, Ramiro, Saúl, Charly, César y Adrián por su apoyo en experimentos y discusión de resultados.

También quiero agradecerle al Dr. Víctor E. Aguirre Arzola por todo su apoyo y amistad.

A mi amiga del alma Dra. Jessica Giselle Herrera Gamboa primero por su amistad y segundo por su apoyo incondicional durante estos 4 años.

Por último, un gran agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Benito Pereyra Alférez por ser una constante guía a lo largo de mi preparación académica, por brindarme su conocimiento, experiencias y consejos, y sobre todo por la amistad que me ha dado durante estos años.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme seguir adelante con mis estudios y llevar a cabo un nuevo reto en mi vida, dejándome compartirlo con mis seres queridos, gracias por ser mi luz y guía, por estar conmigo en cada momento difícil y por ayudarme a seguir en este camino de la vida.

A mis padres Refugio López García y Blanca Lilia Alvarado Monsiváis, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha ayudado a ser una persona de bien, y sobre todo por su amor incondicional. ¡Gracias por darme la vida!

A mis hijas Emma Ramiro López y Aída Ramiro López, por ser la máquina que me da la fuerza y me impulsa a seguir a delante para buscar nuevos retos en mi vida; por darme todo su amor y por prestarme su tiempo para yo dedicarlo a la investigación. Las amo con todo mi corazón.

A mi esposo Adrián Ramiro Carretero, por estar todos estos años de formación académica a mi lado siempre apoyándome y empujándome a querer mejorar cada día como persona, profesionalista y científica.

Índice General

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Características de la malta.....	3
2.2 Importancia del grano de cebada en la elaboración de malta.....	3
2.3 Composición bioquímica y propiedades del grano de cebada.....	4
2.4 Enzimas implicadas en el proceso del malteado.....	4
2.5 Definición de malta de buena calidad.....	5
2.6 Clasificación de los parámetros de calidad de la malta en función de su importancia.....	5
2.7 Comercialización de malta.....	5
2.8 Calidad de la cerveza.....	5
2.9 Comportamiento en la cervecería.....	6
2.10 En que influye la calidad de la malta.....	6
2.11 Usos de la malta: Elaboración de cerveza.....	6
2.12 Variables de Calidad del proceso de elaboración de cerveza.....	7
2.13 Ingredientes para la elaboración del mosto y sus propiedades.....	7
2.14 Requerimientos nutricionales para un buen desempeño de la levadura cervecera.....	8
2.15 Absorción y metabolismo de carbohidratos en el mosto.....	9
2.16 Metabolismo de aminoácidos en el mosto.....	9
2.17 Producción de compuestos volátiles y de azufre formados por el metabolismo y excreción de la levadura cervecera durante la fermentación.....	9
2.18 Panorama general de la producción de cebada y cerveza a nivel mundial.....	10
3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1 Muestras biológicas.....	14
6.2 Extracción de proteínas.....	14
6.3 Determinación del perfil de proteínas.....	14
6.4 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).....	14
6.5 Efecto del pH en las hidrolasas de las maltas.....	15
6.6 Actividad de amilasa y proteasa mediante zimografía.....	15
6.7 Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF.....	17
6.8 Determinación de actividad enzimática en soporte empleando sustratos sintéticos.....	18
6.9 Purificación parcial de las enzimas de las maltas cerveceras.....	19
6.10 Efecto de la temperatura en las hidrolasas presentes en la cebada malteada.....	19
6.11 Elaboración y evaluación de mostos 100% cebada malteada.....	19
6.12 Nitrógeno amino libre (FAN).....	20
6.13 Determinación de azúcares en el mosto.....	20
6.14 Color.....	20
6.15 pH.....	20
6.16 Viscosidad.....	20
6.17 Análisis de aminoácidos libres.....	21
6.18 Monitoreo de las hidrolasas presentes en mostos 100% cebada malteada.....	21
7. RESULTADOS.....	22

7.1 Determinación del perfil de proteínas.....	22
7.2 Determinación del perfil de proteínas de la malta: La extracción de proteínas fue realizada a pH 7.5 y pH 5.0.....	22
7.3 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).....	22
7.4 Efecto del pH en las hidrolasas presentes en la cebada malteada.....	24
7.5 Actividad de amilasa y proteasa mediante zimografía.....	24
7.6 Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF y Nano LC-MS/MS.....	28
7.7 Determinación de actividad enzimática en soporte empleando sustratos sintéticos.....	28
7.8 Purificación parcial de las enzimas de las maltas cerveceras.....	29
7.9 Efecto de la temperatura en las hidrolasas presentes en la cebada.....	32
7.10 Elaboración y evaluación de mostos 100% cebada malteada.....	34
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIÓN.....	46
10. PERSPECTIVAS.....	47
11. LITERATURA CITADA.....	48
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Orden de asimilación de aminoácidos en el mosto.....	10
2. Parámetros de los mostos producidos con las diferentes maltas.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Producción mundial de cebada en el 2013.....	11
2. Perfil de proteínas mayoritarias de las maltas cerveceras.....	22
3. Perfil de proteínas de las muestras de malta extraídas con Tris-HCl 5mM a pH 7.5 (a) y Acetatos 0.05M pH 5.0 (b).....	23
4. Proteoma de las maltas cerveceras en geles de 2D-PAGE.....	23
5. Efecto del pH en la actividad general proteolítica.....	24
6. Efecto del pH en la actividad general de diastasas.....	25
7. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en Zimogramas en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizados con gelatina al 0.1%.....	26
8. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en Zimogramas 1D en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1 % en condición reductora.....	27
9. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en Zimogramas 2D en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizados gelatina al 0.2% en condición reductora.....	27
10. Efecto del pH sobre la actividad amilácea en Zimogramas copolimerizados con almidón de papa al 0.2% en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras.....	28
11. Selección e identificación de enzimas candidatas como marcadores de calidad.....	29
12. Determinación del tipo de actividad enzimática específica en ensayo en soporte empleando sustratos sintéticos.....	30
13. Determinación del tipo de actividad enzimática específica en ensayo en microplaca empleando sustratos sintéticos.....	30
14. Cromatogramas de las maltas M3 y D3.....	31
15. Determinación de proteasa total con azocaseína al 1% (a) y Determinación de actividad específica de proteasas (b).....	31
16. Actividad de proteasa total en zimogramas en 2D-PAGE copolimerizado con gelatina al 0.1% en condiciones reductoras empleando la malta D3.....	32
17. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa en muestras de malta, ensayo en microplaca (parte superior) y en geles de poliacrilamida al 12 % copolimerizado con almidón de papa 0.2% como sustrato (parte inferior).....	33
18. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasa total en muestras de malta, empleando azocaseína al 1% como sustrato.....	34
19. Preparación de mostos 100 % cebada malteada.....	35
20. Cuantificación de proteína total soluble en el proceso de maceración.....	35
21. Monitoreo de las enzimas hidrolíticas presentes en las maltas durante el proceso de maceración.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

°C:	Grados Célcius
β:	Beta
%:	Porcentaje
ml:	Mililitros
pH:	Potencial de hidrógeno
μM:	Micromolar
M:	Molaridad
PA:	Poliacrilamida
cm:	Centímetros
2D-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones
μl:	Microlitro
min:	Minuto
V:	Voltios
IFE:	Isoelectroenfoque
mg/ml:	Miligramo por mililitro
FAN:	Alfa-amino nitrógeno libres
α:	Alfa
g:	Gramos
°P:	Grados plato
ppm:	Partes por millón
mM:	Milimolar
N:	Normalidad
mA:	Miliamperes
1D:	Una dimensión
μg:	Microgramo
h:	Hora
s:	Segundo
rpm:	Revoluciones por minuto
kDa:	kiloDaltons
L:	Litro

RESUMEN

La malta es la materia prima en el proceso de producción de cerveza, en ella coexisten una mezcla de sustratos, proteínas y las enzimas necesarias para su transformación para la elaboración de cerveza. La concentración y tipo de cada uno de estos componentes influye directamente en el proceso cervecero y calidad del producto. En este trabajo muestra los resultados de comparación proteómica de ocho diferentes variedades de malta. Primero fueron obtenidos los perfiles de proteínas y observamos que sus patrones son muy distintos, de las proteínas del endospermo (hordeínas), la M1 tiene mayor contenido del tipo B, mientras que la M2 es la única que tiene del tipo gamma. Las enzimas hidrolíticas tipo proteasas presentaron un pH óptimo entre 5.0-9.0, mientras que para las diastasas fue 5.0-7.0. Mediante zimografía determinamos los perfiles enzimáticos de las hidrolasas e identificamos las señales proteicas con diferencias significativas que pudieran ser utilizadas como marcadores de calidad. La identidad de las señales fue obtenida mediante las técnicas de MALDI-TOF/TOF y Nano LC-MS/MS, donde encontramos que la M1 y D3 tienen una proteína idéntica, esto es de gran relevancia ya que estas dos maltas son diferente variedad y de distinta procedencia. Además, con este estudio fueron detectadas varias proteínas que se relacionan con el desempeño de la fermentación y con la calidad de la cerveza. Debido a su importancia en el proceso cervecero, se estudió la actividad enzimática general y específica. Entre las proteasas, en D1 sobresale una metaloproteinasa ca. 150 kDa y una amilasa ca. 20 kDa. Mientras que D3 presentó una cisteinil proteasa ca. 37 kDa y dos amilasas de ca. 30-35 kDa. En cuanto a la termoestabilidad de las enzimas de las maltas, todas mostraron ser termoestables a temperaturas superiores de 80 °C. El análisis de los mostos arrojó que las tres maltas evaluadas (D1, D2 y D3) dan perfiles óptimos para una buena fermentación, sin embargo, la malta D3 proporciona mejores características para la producción de cerveza.

ABSTRACT

The malt is the raw material in the brewing process, in which it coexists with a mixture of substrates, proteins and enzymes necessary for its transformation for brewing. The concentration and type of each components in the malt influences the brewing process and product quality directly. This paper describes the results of proteomics comparison of eight different varieties of malt. First the protein profiles were obtained, and we observe that their profiles are very different, of the endosperm proteins (Hordeins) the M1 has the highest content of type B, while the M2 is the only one that has the gamma type. Subsequently, we measured the effect of pH on hydrolytic enzymes, in the case of proteases the optimum range was 5.0-9.0, while for diastases it was 5.0-7.0. By zymography we determine the enzymatic profiles of the hydrolases and to identify the protein signals with significant differences that could be used as quality markers. The identity of the signals was obtained through the techniques of MALDI-TOF/TOF and Nano LC-MS/MS. We found that M1 and D3 have an identical protein, this has a great relevance since these two malts are different variety and source. In addition, several proteins were detected, and they are related to fermentation performance and beer quality. Due to its importance in the brewing process, the general and specific enzymatic activity was studied. The proteases included a metalloproteinase with a molecular weight of ca. 150 kDa and an amylase of ca. 20 kDa. D3 contained a cysteinyl protease of ca. 37 kDa and two amylases of ca. 30-35 kDa. With thermostability analysis of the enzymes in the malts, all of them were shown to be thermostable at temperatures above 80 °C. The analysis of the worts showed that the three malts evaluated (D1, D2 and D3) give optimal profiles for a good fermentation, however, malt D3 has better quality characteristics for beer production.

1. Introducción

La cebada (*Hordeum vulgare*) es uno de los cereales más cultivados en el mundo, ocupa el cuarto lugar en importancia después del trigo, el arroz y el maíz y es ampliamente utilizado para las industrias de alimentos y bebidas (Guo *et al.* 2016). La cebada tiene el potencial de modificar las proteínas del endospermo, como son: señalización, traducción, mecanismos de defensa, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y su contenido enzimático (Wang *et al.* 2004). Esto le permite tener una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales y de estrés biótico y abiótico, tales como la limitación de agua y suelos salinos (Ouda y Gaballah. 2007).

En México, la cebada es producida en dos ciclos de cultivo: primavera-verano (temporal) y otoño-invierno (riego). Y actualmente, seis variedades son destinadas a la industria cervecera por su alta calidad: Armida, Adabella, Esmeralda, Alina, Esperanza y Doña Josefa. Estas variedades corresponden más del 70% de la producción total anual en el país (Fernández. 2013).

En la industria cervecera, la cebada es el principal ingrediente para la preparación del mosto fermentable y sus características bioquímicas estarán relacionadas con la calidad de la cerveza. Para que la cebada sea utilizada en la preparación de la cerveza, debe ser sometida a un proceso de malteado (cebada malteada) con el fin de activar las enzimas necesarias para transformar proteínas y almidones del endospermo, en nutrientes para la levadura. La calidad de la malta, y por consecuencia de la cerveza, dependerán de la cantidad y tipo de tres componentes principales del grano de cebada: proteínas, almidones y enzimas, los cuales varían de acuerdo con la variedad de cebada, condiciones de cultivo y proceso de malteado (Fang *et al.* 2019). Dos tipos principales de actividad enzimática participan en el proceso cervecero: proteasas y amilasas.

Las proteasas de la malta determinan el tipo y concentración de aminoácidos en el mosto. Estos, serán metabolizados por la levadura, definiendo los sabores y olores en la cerveza. Se ha visto que las enzimas tienen un impacto en el desarrollo de métodos de malteo, durante el proceso se generan cuatro endoproteasas estables a 38 °C e inactivadas a 72 °C. La actividad proteolítica está involucrada en los niveles de FAN (amino nitrógeno libre), mejoran la extracción de los azúcares fermentables al degradar las proteínas inhibitoras de la dextrinasa limitante y la β -amilasa (Hu *et al.* 2013). Actividades de tipo serino proteasas y aminopeptidasas pueden estar relacionadas a la generación de proteínas activas formadoras de turbidez (Jones. 2001).

La concentración de los azúcares fermentables y no fermentables, derivados del almidón en el mosto, definen la calidad de la cerveza en términos de contenido de alcohol y contenido calórico. Las diastasas son la sinergia de tres enzimas principales (α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa limitante) involucradas en la hidrólisis del almidón durante la maceración del mosto. La β -amilasa se acumula durante el desarrollo de la semilla y juega un papel clave durante la degradación del almidón. Diversos autores han diferenciado y comparado variedades de cebada malteada empleando zimogramas, con el fin de estudiar los perfiles enzimáticos y caracterizando bioquímicamente los sistemas hidrolíticos para encontrar enzimas que sirvan como marcadores de calidad de la cebada malteada (Wrobel y Jones. 1992).

La obtención de un marcador de calidad de la cebada malteada podría ahorrarle a la industria cervecera una cantidad sustancial por año. La identificación de las enzimas presentes en la malta y el estudio bioquímico de su actividad (niveles de pH, temperatura, tiempo, etc.) podría dar la información necesaria para que los cerveceros ajusten de manera eficiente sus procesos, evitando operaciones innecesarias de acuerdo con el tipo de materia prima utilizada (López *et al.* 2016). Es por esto por lo que, en el presente estudio se compararon bioquímicamente los perfiles hidrolíticos de ocho cebadas malteadas de diferente genotipo, cultivadas bajo diferentes condiciones de riego, con el propósito de analizar diferencias entre condiciones y su relación con los parámetros de calidad del mosto y la cerveza.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de la malta: La malta es la cebada parcialmente germinada y secada; durante la germinación se producen una gran cantidad de enzimas activas que transforman las reservas del grano (principalmente almidón) en compuestos requeridos durante la elaboración de cerveza (Callejo. 2002).

Actualmente, la cebada es el cereal más empleado para la elaboración de malta cervecera, en menor proporción se usa el trigo y sorgo. Cada año se producen alrededor de 1.5×10^7 toneladas de malta a partir de cebada; alrededor de un 94% de esa cantidad, es usada en la industria cervecera (Schilbach. 1999). La conversión de cebada en malta requiere un mínimo de 2 semanas y se somete a malteado después de 6 a 8 semanas de la cosecha del grano.

La malta es la materia prima necesaria para la fabricación de cerveza ya que confiere características de color, sabor y espuma por ello su elaboración exige controles rigurosos de tiempo y temperatura, el malteado constituye toda una industria que en la mayoría de los casos es independiente de la industria cervecera.

Tipos de maltas cerveceras: malta cervecera clara, malta cervecera clara especial, maltas oscuras (secadas parcialmente), maltas tostadas y maltas destiladas.

2.2 Importancia del grano de cebada en la elaboración de malta: La planta de cebada pertenece a la familia de las Gramíneas, todas las cebadas se integran en el género *Hordeum* dentro del cual se encuentran las especies *Hordeum distichum* o dísticas (plantas que producen 2 granos en los nudos de la cabeza: es decir producen cabezas de 2 hileras) y *Hordeum vulgare* o hexísticas (con cebadas que producen cabezas de 6 hileras).

Ambas especies de cebada se emplean para la elaboración de malta cervecera: las variedades *Hordeum distichum* producen granos más gruesos y uniformes y por ello se utilizan para la elaboración de maltas primordialmente en países de Europa, en tanto que las variedades de *Hordeum vulgare* poseen un alto potencial enzimático y son preferidas principalmente en cervecerías de México, Canadá y EUA (Hornsey. 1999).

La semilla de cebada está rodeada de una capa protectora que recubre la verdadera cubierta de la semilla o testa, por lo tanto, posee 3 capas (cáscara, pericarpio y testa) que le confieren una protección al grano destinado al malteado, sobre todo durante el almacenamiento. Los fragmentos de cáscara sirven de lecho filtrante después de la maceración para separar el mosto.

El endospermo de los granos de cebada posee hasta un 90% de carbohidratos totales, de los cuales un 80% se encuentra en forma de gránulos de almidón que sirve de reserva nutritiva del grano. El almidón es solubilizado e hidrolizado durante el malteado hasta monosacáridos (principalmente glucosa y maltosa), gracias a la capacidad enzimática de las α y β -amilasas que se desarrollan en la cebada durante la germinación.

2.3 Composición bioquímica y propiedades del grano de cebada: El grano de cebada como tal, no produce un mosto fermentable, por lo que es necesario someter a la cebada por un proceso de germinación donde el embrión pasa a un estado de vida activo, induciendo la secreción de enzimas que se difunden por el endospermo. El proceso de germinación y su posterior tostado es lo que se conoce como malta.

Entre las características de calidad de la cebada que tienen impacto en el proceso cervecero destacan: la humedad, el extracto, el mosto, el pH, el color, la modificación citolítica, la viscosidad, la actividad proteolítica, las proteínas, el nitrógeno soluble, el índice de Hartong, el índice de Kolbach, la clasificación del tamaño del grano y los precursores de dimetilsulfuro (PDMS).

El proceso de malteado consiste en un proceso aparte, aunque estrechamente ligado al proceso de producción de cerveza. En la malta coexiste una gran cantidad de sustratos como almidón, proteínas y glucanos, y las enzimas producidas en la germinación ayudarán a degradar estos componentes y generar otros más sencillos que serán asimilados y transformados por la levadura en la etapa de fermentación.

La presencia y concentración de proteínas y enzimas en la malta impactan de manera directa las características del mosto y este a su vez determinara la eficiencia de la fermentación y características organolépticas de la cerveza.

Por ejemplo, un alto contenido de glucanos genera un mosto viscoso y turbio, aumentando costos de filtración, por lo cual es necesario que la malta con altos contenidos de glucanos posea además un contenido proporcional de enzimas necesarias para su degradación (Moralejo-Vidal. 1993).

2.4 Enzimas implicadas en el proceso del malteado: Las amilasas degradarán los almidones presentes en la malta, produciendo azúcares más simples que serán utilizados por la levadura en la fermentación. La actividad de estas enzimas es inhibida durante el proceso de cocimiento, por lo que es deseable que se encuentren en concentraciones altas para lograr la hidrólisis completa del almidón (Axcell y Murray. 1980; Moll *et al.* 1981).

Otras proteínas importantes relacionadas con la calidad de la malta son las hordeínas, conocidas como proteínas de reserva. El contenido de hordeínas en la malta es un criterio tradicional empleado para evaluar la calidad de la malta. En la industria cervecera ciertos niveles de hordeínas son deseables, si la concentración de hordeínas se encuentra por debajo de cierto nivel, se tendrá un mosto deficiente en aminoácidos, esenciales para el desempeño de la levadura y por el contrario un alto contenido de hordeínas producirá mostos turbios difíciles de filtrar (Van den Berg *et al.* 1981; Smith y Lister. 1983).

La hidrólisis de proteínas de la malta es clave para la fermentación. Durante la hidrólisis por efecto de enzimas proteolíticas se generan compuestos nitrogenados (como por ejemplo péptidos pequeños y aminoácidos), los cuales son metabolizados por las levaduras generando subproductos que impactan sobre la producción compuestos volátiles.

Las proteasas juegan un papel vital en el proceso cervecero, ya que su actividad hidrolítica genera mostos solubles y nutrientes, aminoácidos y péptidos, indispensables para la fermentación. El impacto de estas enzimas es enorme en el desarrollo de métodos de malteo. Las endoproteasas son estables a 38 °C, pero inactivadas rápidamente a 72 °C (Jones *et al.* 2000; Jones y Marinac. 2002). Durante el malteo se pueden generar tres-cuatro tipos de endoproteasas, pero el número se incrementa durante el proceso, especialmente en la maceración, donde la actividad proteolítica puede ser regulada por inhibidores de bajo peso molecular (Jones. 2001).

Las endoproteasas también pueden generar PAN, (proteínas activas para formar niebla). Este tipo de actividad está relacionada con serino proteasas y aminopeptidasas. Ensayos de 2D han logrado identificar alrededor de 40 actividades de proteólisis.

2.5 Definición de malta de buena calidad: Es aquella que tiene un buen desempeño en la cervecería, permitiendo la elaboración de cerveza de buena calidad y con adecuado rendimiento de fábrica.

2.6 Clasificación de los parámetros de calidad de la malta en función de su importancia: En México, los parámetros de calidad para la malta se encuentran establecidos en la NMX-FF-043-SCFI-2003

2.7 Comercialización de malta: Humedad, Proteína total, Extracto fino

2.8 Calidad de la cerveza: Pos-color, Nitrógeno soluble, FAN (amino nitrógeno libre), Atenuación límite aparente, Poder diastásico, Alfa-amilasa.

2.9 Comportamiento en la cervecería: Viscosidad, Friabilidad, Beta-glucanos.

2.10 En que influye la calidad de la malta: En el tipo de cerveza, el color, la espuma, la fermentabilidad (grado alcohólico), la estabilidad coloidal, el sabor y la estabilidad del sabor.

2.11 Usos de la malta:

Elaboración de cerveza: El proceso de producción de cerveza comienza con el malteado. En el malteado, la cebada es sometida a un proceso de remojo que permite la germinación del grano y posteriormente se somete a un secado (Kramer. 2006). Durante la germinación se producen enzimas del tipo proteasas y amilasas necesarias para la degradación de proteínas de reserva y almidones presentes en el mosto. Otros ingredientes del mosto son el agua, los adjuntos, que sirven como fuente de almidón y el lúpulo, el cual proporciona el sabor amargo característico de la cerveza y un aroma herbal cítrico, ayudando a balancear el sabor dulce de la malta. Las resinas del lúpulo inhiben el crecimiento de la mayoría de las bacterias lo cual ayuda mantener la fermentación libre de contaminación ayudando a conservar las características de la cerveza (Sidor. 2006).

Después de un proceso de maceración, se somete a un proceso de cocimiento. En el cocedor se reciben todos los ingredientes, para ser acondicionados en una solución acuosa donde con el auxilio de enzimas y temperatura, los almidones son transformados en azúcares simples, enriqueciendo la concentración de sólidos disueltos (Grado plato, °P), al que se le llama mosto. En la olla de cocimientos se calienta el mosto hasta la temperatura de ebullición y se adiciona el lúpulo.

Los principales objetivos del hervido son precipitar proteínas coagulables, lo que da estabilidad física, asegura la estabilidad microbiológica, reduce compuestos indeseables, como dimetilsulfuro, isomerización de lúpulo y evaporar el agua educación de compuestos indeseables como dimetilsulfuro (DMS) y evaporar el agua hasta el nivel de concentración de azúcares deseado (°P)

Después el mosto hervido se bombea hasta un recipiente con entrada tangencial en el fondo (conocido como whirlpool), lo cual facilita la acumulación de sólidos en el centro y fondo del recipiente (Fahy y Spencer. 1999), después de un breve reposo el mosto es transferido a un enfriador donde se reduce la temperatura hasta 9-15 °C, que es la temperatura de inculo.

Antes de la inoculación el mosto debe ser aireado con oxígeno que la levadura utilizará para la etapa de crecimiento, después por efecto de la fermentación el oxígeno disuelto será desplazado por dióxido de carbono, generando condiciones de anaerobiosis. La fermentación se considera el paso más importante y complejo del proceso cervecero, ya que en este se desarrollan los subproductos que impactaran los cambios de sabor y aroma procedentes del metabolismo de la levadura (Carey y Grossman. 2006).

Al final de la fermentación, la cual puede durar desde 7-11 días, dependiendo del tipo de cerveza, se somete a una etapa de maduración, carbonatación, estabilización en frío, clarificación y estandarización. Finalmente, la cerveza es enviada al proceso de filtración, donde el líquido es clarificado y carbonatado para enviarlo a las líneas de envasado.

La cerveza es la bebida alcohólica más antigua y de mayor consumo en el mundo. En el 2008, la producción mundial ascendió a más de 1.8 mil millones de hectolitros, generando ganancias mayores a \$ 295 mil millones de USD (Fasoli *et al.* 2010).

Dada la importancia, resulta sorprendente que existan solo unos cuantos reportes del proteoma de la cerveza. En promedio, la cerveza contiene entre 0.2 y 0.6 g/100 ml de proteína. Tales proteínas, que provienen de la cebada, malta y levadura están directamente involucradas en estabilidad de la cerveza, deterioro coloidal y formación de espuma (Picariello *et al.* 2011; Siebert. 2009).

2.12 Variables de Calidad del proceso de elaboración de cerveza: El cervecero en la práctica en 1977 menciona las variables para la generación de los indicadores de calidad fisicoquímica de la cebada malteada. La elaboración de cerveza es un proceso controlado donde se van definiendo parámetros de control como es el contenido de azúcares fermentables, turbidez del mosto, pH, color EBC, viscosidad y grado de producto final. Estas variables en su mayoría se ven influenciados por la calidad de la cebada malteada. En el producto final la calidad del sabor, espuma, color, olor y cuerpo, también dependen de la materia prima utilizada.

2.13 Ingredientes para la elaboración del mosto y sus propiedades: Para la elaboración de cerveza se requieren diversos ingredientes que le darán sus características fisicoquímicas. En el caso del mosto, el cual es el líquido donde se inocula la levadura para la fermentación, se elabora de lo siguiente: Malta, es derivada de la cebada malteada la cual, es una fuente de extracto fermentable y proporciona características de aroma, sabor

y color a la cerveza. Para obtener la malta, ésta pasa a través de un proceso de remojo, germinación y secado, en donde por medio de ciertas enzimas se rompe la pared del endospermo, quedando proteínas solubles en agua y por último se inicia la degradación de gránulos de almidón en azúcares fermentables, y otros productos (Kendall. 1995).

Lúpulo, el cual contribuye al aroma de la cerveza, proviene de la planta *Humulus lupulus*. Tiene diversos beneficios en la cerveza como es la estabilidad en la espuma, la claridad en la cerveza mejora la estabilidad de sabor por medio de la actividad bacteriostática de sus ácidos iso-alfa provenientes de sus resinas (Grant. 1995).

Agua, contribuye aproximadamente el 96% del volumen total de la cerveza, aportando minerales, los cuales se controlan por medio de desmineralización y por ajuste de sales para alcanzar los parámetros requeridos (Moll. 1995).

Estos ingredientes se introducen en orden al área de cocimientos, en donde bajo ciertas temperaturas, actúan enzimas amilasas que hidrolizan el almidón y lo transforman en azúcares fermentables provenientes tanto de la malta como de los adjuntos. Posteriormente, se elimina toda cascarilla y se lleva a ebullición en donde es introducido el lúpulo. Una vez realizado este paso, se transfiere el mosto a un recipiente para favorecer el asentamiento de sólidos (llamado “trub”). Después se lleva a través de chaquetas de enfriamiento hasta dejarlo a una temperatura adecuada para la inoculación de levadura.

2.14 Requerimientos nutricionales para un buen desempeño de la levadura cervecera: Cuando la levadura es inoculada en el mosto, entra a un ambiente extremadamente complejo. Este contiene azúcares, dextrinas, vitaminas, sales, iones y minerales, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, solo por mencionar algunos. Investigaciones han demostrado que la levadura utiliza de manera ordenada la amplia variedad de nutrientes en el mosto.

Oxígeno: Cuando la levadura se inocula en el mosto, es necesario contar con cierta cantidad de oxígeno, ya que este promueve que la levadura sintetice ácidos grasos y esteroides para producir los componentes de la membrana necesarios para su crecimiento adecuado durante la fermentación. La concentración de este debe de estar optimizada ya que una inadecuada aireación puede generar limitaciones en el crecimiento, problemas de sabor en la cerveza y un bajo rendimiento en la fermentación. Es por ello que se sugiere introducir 1 ppm por cada °P (es igual a 1 g de extracto en 100 g de mosto) generado en el mosto (Duan *et al.* 2004).

2.15 Absorción y metabolismo de carbohidratos en el mosto: Los azúcares fermentables, son consumidos por la levadura en el orden siguiente: sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y maltotriosa. Estos dos últimos son los más complejos y abundantes en el mosto, por lo que la levadura cervecera posee permeasas de maltosa y maltotriosa que transportan este azúcar dentro de la célula; ya una vez dentro, el azúcar es hidrolizado a glucosa por medio de la enzima α -glucosidasa (Zheng *et al.* 1994).

2.16 Metabolismo de aminoácidos en el mosto: El crecimiento de la levadura es activado al sintetizar proteínas y otros componentes nitrogenados de la célula, para esto, se requiere de la absorción de α -amino-nitrógeno (FAN), principalmente en forma de aminoácidos (Lewis y Young. 1995). La concentración de cada aminoácido depende en gran medida de la malta utilizada (Boulton y Quain. 2001) y, además, de su utilización en el crecimiento celular, algunos aminoácidos son precursores de importantes compuestos volátiles que impactan en el sabor de la cerveza (Hazelwood *et al.* 2008).

La levadura asimila los aminoácidos de manera secuencial a lo largo de la fermentación (Tabla 1). A través de la ruta de Ehrlich son catabolizados los aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos y sulfurados, donde son convertidos a alcoholes de fusel los cuales son importantes precursores de los ésteres. Los ésteres son los compuestos responsables del sabor afrutado de las bebidas alcohólicas, entre los más importantes se encuentran el acetato de etilo y acetato de isoamilo (Heggart *et al.* 1999).

2.17 Producción de compuestos volátiles y de azufre formados por el metabolismo y excreción de la levadura cervecera durante la fermentación: A través de la ruta de la biosíntesis de la isoleucina y valina se generan intermediarios tales como α -acetolactato, los cuales son excretados al medio y químicamente se convierten en dicetonas vicinales que imparten un sabor tipo mantequilla a la cerveza (Munroe. 1995).

Igualmente, los compuestos volátiles de azufre son subproductos del metabolismo de aminoácidos y concentraciones mínimas por encima del nivel aceptable, pueden generar notas desagradables en la cerveza. Entre estos compuestos se encuentran principalmente el ácido sulfúrico (imparte olor a huevos podridos), sulfuros y tioles (vegetales cocidos), tioésteres (vegetales podridos) y dióxido de azufre.

Tabla 1. Orden de asimilación de aminoácidos en el mosto

Grupo A Inmediata	Grupo B Gradual	Grupo C Baja	Grupo D Escasa o nula
Acido glutámico	Valina	Glicina	Prolina
Acido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	Triptófano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amonio	
Lisina			
Arginina			

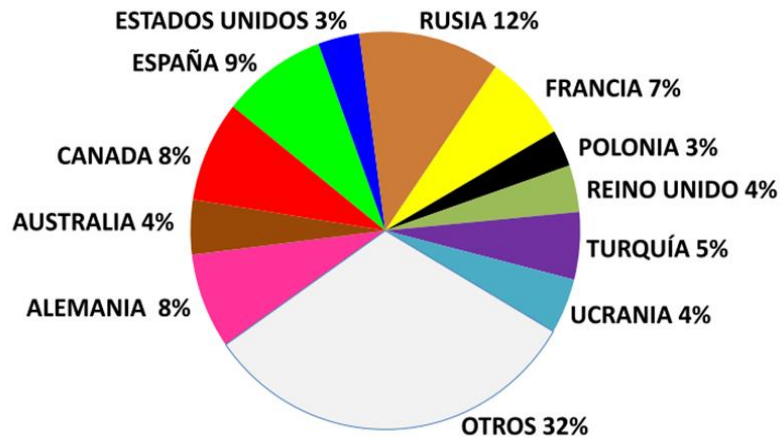
2.18 Panorama general de la producción de cebada y cerveza a nivel mundial:

México es el país exportador de cerveza más importante del mundo, con una participación del 17% del mercado, mismo que comparte con Países Bajos, Alemania, Bélgica y Reino Unido, que en conjunto concentran más del 60% de las exportaciones mundiales.

Entre 2003 y 2011, la producción nacional de cerveza ha crecido a un ritmo promedio del 3.3%, principalmente como consecuencia del dinamismo en sus exportaciones, mismas con un crecimiento medio del 5.6% durante el mismo periodo. De igual forma, de enero a junio de 2012, las exportaciones crecieron a un ritmo de 6.8%, acumulando un valor de 1,097 millones de dólares.

El mercado nacional de la cerveza está controlado por dos grandes grupos cerveceros, Modelo concentra más de 55% y Cuauhtémoc Moctezuma 43%, el resto del mercado es de unas cuantas empresas cerveceras de menor tamaño. Las dos empresas más grandes cuentan con marcas reconocidas a nivel nacional y en el extranjero. Los dos grupos mantienen un esquema de integración vertical con capacidad de producir malta internamente, aunque también son deficitarios en este insumo.

Actualmente, Grupo Modelo posee ocho plantas en territorio nacional con una capacidad instalada de 70 millones de hectolitros anuales de cerveza y cuatro plantas transformadoras de malta, además de una Maltería en Idaho Falls, E.U.A. con una capacidad instalada de 340 mil toneladas de malta por año. En cambio, Cuauhtémoc Moctezuma opera seis plantas productoras con una capacidad instalada de 41 millones de hectolitros anuales de cerveza y una producción interna de 130 mil toneladas de malta. Los dos grupos cuentan con proveedores nacionales e internacionales para abastecerse de cebada.



Fuente: elaborado con datos de FAOSTAT

Figura 1. Producción mundial de cebada en el 2013.

Aproximadamente el 70% de la cebada de producción nacional se emplea básicamente a la elaboración de malta cervecera y el 30% restante como alimento para ganado y otros usos.

Se mantiene un déficit comercial para la cebada debido a la creciente demanda de malta por la industria cervecera, como consecuencia del crecimiento de sus exportaciones, así como a la fuerte competencia internacional de este grano. De esta forma, la demanda de cebada y malta es tal que rebasa la capacidad productiva del país.

Ante las limitaciones productivas y las restricciones de la capacidad instalada para la transformación de la cebada a malta, México ha incrementado sus importaciones de cebada y malta, a una tasa media anual del 8.7% y 8.8%, respectivamente, durante 2003 y 2011. Dichas importaciones son un complemento de la producción nacional, ya que conforman el 9% del consumo nacional aparente de cebada y el 36% del consumo nacional aparente de malta. Se destaca que las importaciones de cebada y malta que la industria cervecera nacional lleva a cabo provienen en su totalidad de Estados Unidos y Canadá, las cuales están exentas de arancel. Alrededor de 3,000 toneladas de malta se importaron de Francia, Bélgica y Alemania durante 2011 y 2012, mismas que representan en conjunto el 1.6% del volumen total importado.

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las proteasas de la malta juegan un papel relevante porque determinan el tipo y concentración de aminoácidos en el mosto, los cuales son metabolizados por la levadura, la cual genera tipo de ésteres que incorporan sabores y el perfil de aroma a la cerveza.

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas de mayor producción, expansión y venta a nivel mundial. Todas las empresas que operan en este rubro persiguen incrementar cada día su producción, productividad y desarrollo tratando de ubicarse entre las mejores y abarcar mayor participación en el mercado.

Debido a que aún no se tiene un total conocimiento y control sobre la síntesis de compuestos que impactan las características de la cerveza, es necesaria una caracterización adecuada de la malta (materia prima) y estudiar la relación que existe entre las hidrolasas y aminoácidos y azúcares fermentables presentes en el mosto. Con este estudio se pretende predecir las características deseables del mosto, para obtener un producto final de buena calidad.

4. HIPÓTESIS

Existen proteínas de la malta que impactan en el proceso cervecero y en las características sensoriales de la cerveza.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar las proteínas producidas en las diferentes fases del proceso cervecero provenientes de la malta e identificar las que impacten en las características sensoriales de la cerveza.

5.2 Específicos

1. Analizar el proteoma de la malta, con diversos parámetros de calidad de la cerveza.
2. Identificar, a nivel molecular, las enzimas nativas de mayor relevancia para el proceso cervecero.
3. Correlacionar las proteínas y aminoácidos presentes en el mosto para determinar los parámetros de fermentación y características sensoriales de la cerveza.
4. Correlacionar las diastasas y azúcares fermentables presentes en el mosto para predecir el contenido calórico y de alcohol en la cerveza.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestras biológicas: Fueron evaluadas ocho cebadas malteadas (*Hordeum vulgare L.*) de diferente genotipo (nombradas como M1, M2, M3, M4, M5, D1, D2 y D3 respectivamente) cultivadas bajo diferentes condiciones de cultivo, las cuales fueron proporcionadas por Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma (CCM), México. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. Adicionalmente, fue utilizada la malta comercial 2-ROW como control obtenida de la empresa Malteurop (Milwaukee, WI, USA).

6.2 Extracción de proteínas: Las muestras de malta (10 g) fueron molidas hasta un polvo fino (<50 µm) usando un molino de marca Foss Cyclotec 1093. Las proteínas totales se extrajeron empleando dos buffers de extracción (Tris-HCl 25 mM; MgCl₂ 5 mM pH 7.5), según lo reportado por López y cols. (2016) y Buffer de Acetatos 0.05 M (Wrobel y Jones. 1992).

Las proteínas específicas como: i) albúminas; ii) globulinas y iii) prolaminas fueron extraídas a partir de 50 mg de harina agregando: 500 µl de agua mQ (Albúminas); 500 µl de NaCl 0.5 M (pH 7) (Globulinas) o 500 µl de etanol al 70% (Prolaminas). Los tubos fueron agitados en vortex durante 30 min en intervalos de 5 min, centrifugados 10 s. El sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su uso. La concentración de proteína soluble total se determinó mediante el método de Bradford.

6.3 Determinación del perfil de proteínas: El perfil de proteínas fue determinado mediante geles de PA en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes con el sistema de buffer discontinuo descrito por Laemmli (1970). Además, fueron utilizados geles en gradiente de concentración de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes siguiendo el protocolo descrito por Bollag y cols. (1996). Los geles fueron corridos a 20 mA cada uno en una cámara de electroforesis vertical Mighty Small II para geles de 8 x 7 cm SE250 de Amersham Biosciences Corp. El patrón de bandas fue analizado mediante el software Quany One v. 4 utilizando un densitómetro GS-800 Calibrated de Bio-Rad.

6.4 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE): Previo a la separación en 2D, las muestras de malta se ajustaron a 150 µg de proteína, fueron limpiadas con el estuche 2D Clean-Up kit (GE Healthcare). La mezcla de proteínas fue resuspendida en 125 µl de DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare) con 0.5% del buffer IPG (GE Healthcare). Las muestras fueron pasivamente absorbidas durante la etapa de rehidratación por 17 h en

tiras ReadyStrip™ IPG 7 cm pH 3-10 (Bio-Rad. Hercules, CA. USA). El isoelectroenfoco se realizó utilizando un equipo Protean IEF Cell System (Bio Rad) para un total de 14 kWh (250 V por 20 min, 4000 V por 2 h y 4000 V hasta 10000 Vh). Después de eso, las tiras fueron equilibradas consecutivamente en dos buffers de equilibrio (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 20% glicerol, 2% SDS), suplementado con DTT (2%) y después iodoacetamida (2.5 %). Las tiras equilibradas fueron corridas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% en presencia de buffer (0.25 M Tris Base, 2 M glicina y 1% SDS) a 10 mA/gel durante 30 min y 20 mA/gel durante 1.5 h. Los geles fueron teñidos con tinción de Azul Brillante de Coomassie R250 (0.1% Azul Coomassie R250, 8% ácido acético, 40% metanol, 52% agua). Las separaciones fueron realizadas por duplicado para cada muestra.

6.5 Efecto del pH en las hidrolasas de las maltas: El efecto del pH sobre la actividad enzimática tipo amilasa fue realizada en placas de 96 pozos de acuerdo a Oliveira y cols. (2019). En breve: Usamos Buffer de Acetato de Sodio (BA) 0.05 M (pH 3.0, 4.0 y 5.0) y Buffer de Fosfato de Sodio (BF) 0.1 M (pH 6.0, 7.0 y 9.0). En cada pozo de la microplaca fueron colocados: 20 µl de cada buffer a sus respectivos niveles de pH, 10 µl de solución de almidón de papa al 0.2% y 10 µl de cada muestra. La microplaca fue incubada a 40 °C por 30 min. Posteriormente, añadimos 30 µl de la solución de Lugol a una dilución 1:10 y 170 µl de agua bidestilada. Finalmente, la absorbancia fue leída a 595 nm.

Por otro lado, la actividad de tipo proteasa, fue realizada de acuerdo con la metodología descrita por Secades y Guijarro (1999). Para este ensayo fue empleada azocaseína 1.0% como sustrato disuelta en buffer Tris-HCl 25 mM con MgCl₂ 5 mM en un rango de pH de 3.0 a 11.0. A 60 µl de cada muestra de malta fueron agregados 240 µl de azocaseína 1.0%, mezclados por vórtex e incubadas a 40 °C por 30 min. La reacción fue detenida con 300 µl de TCA 10%, incubado en hielo por 30 min y centrifugación a 15,000 g por 10min a 4 °C. Pasado el tiempo fueron tomados 400 µl del sobrenadante y fueron neutralizados con 100 µl de NaOH 1.8 N. Finalmente, se leyó la absorbancia a 420 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad que produjo un aumento en A420 de 0.01 en 30 min a 30 °C. Se realizaron triplicados biológicos para todas las pruebas.

6.6 Actividad de amilasa y proteasa mediante zimografía: La actividad enzimática fue evaluada mediante zimogramas de una dimensión como lo describen Herrera y cols. (2018) y López y cols. (2016) con algunas modificaciones. En resumen, las muestras fueron ajustadas a 100 µg/µl de proteína total soluble y mezcladas con el buffer de corrida (125

mM Tris-HCl pH 6.8, glicerol 24% [v/v], 0.02% [w/v] azul de bromofenol y 1% SDS), la separación se realizó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (1% SDS) copolimerizado con almidón de papa al 0.2% [p / v] (actividad amilasa) o 0.1% [p/v] de gelatina (actividad proteasa) (Sigma, San Luis, Misuri, USA).

Los geles fueron corridos a 50 voltios y 4 °C hasta que el frente del azul de bromofenol alcanzó el límite inferior del gel. Después de la separación, los geles fueron lavados con agua bidestilada y fueron incubados durante toda la noche a 40 °C en buffer de acetato de sodio 0.05 M pH 5.0 y buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0 para actividad amilasa.

Para la actividad de proteasas, las proteínas fueron renaturalizadas incubando los geles en agitación moderada durante 40 min en solución de tritón X-100 al 2.5%. Posteriormente, los geles fueron lavados con agua bidestilada para quitar el exceso de tritón. Para la activación de las enzimas de tipo proteasas, los geles fueron incubados durante toda la noche a 40 °C en buffer Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM en un rango de pH de 4.0 a 7.5.

Para los zimogramas de doble dimensión la actividad enzimática tipo proteasa fue evaluada como lo describe Grudkowska y cols. (2013). En resumen, las muestras fueron precipitadas con acetona al 100% agregando 5 volúmenes, se mezcló por 30 s y se incubó toda la noche a -20 °C. Al día siguiente fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y al precipitado se le agregó acetona fría al 80%, se mezcló por 30 s y fue incubada por 30 min a -20 °C (este paso se repitió tres veces), posteriormente, las muestras se dejaron secar por 5 min en hielo. Finalmente, a cada muestra se le agregaron 500 µl de buffer de rehidratación el cual contiene los anfólitos, en una placa especial se colocaron las tiras IPG 7 cm pH 3-10, 125 µl de cada muestra y aceite mineral grado proteómico. Se procedió a correr el IFE empleando las siguientes condiciones: 1) Rehidratación pasiva/carga a 10 °C por 15 h y 2) Condiciones de separación:

Fase	V	Tiempo	V/h	Rampa
1	250	20 min	-	Lineal
2	4000	2 h	-	Lineal
3	4000	-	10 000	Rápida
Total		5 h	14 000	

Terminado el IFE se procedió a equilibrar las tiras en condiciones no desnaturalizantes, para posteriormente, correr los geles de PA al 12% con 0.2% de gelatina copolimerizada en condiciones reductoras, los cuales fueron corridos a 4°C por 3 h.

Terminada la electroforesis los geles se lavaron varias veces con agua bidestilada para quitar el exceso del buffer de corrida, posteriormente, los geles se pusieron en buffer de renaturalización (Tris-HCl 25 mM; MgCl₂ 5 mM pH 7.5; Tritón X-100 al 2.5% y Buffer de Acetatos 0.05 M; Cisteína 2 mM pH 5.0; Tritón X-100 al 2.5%) y se dejaron incubando por 20 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se retiró el buffer de renaturalización y los geles fueron lavados varias veces con agua bidestilada, se agregó el buffer de incubación (Tris-HCl 25 mM; MgCl₂ 5 mM pH 7.5 y Buffer de Acetatos 0.05 M; Cisteína 2 mM pH 5.0) y los geles se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se retiró el buffer de incubación y se tiñeron los geles con solución de tinción (azul brillante de Coomassie R250) para revelar la actividad enzimática.

Para estos ensayos empleamos enzimas comerciales como control: tripsina de páncreas bovino (Cas. T1426), bromelina de tallo de piña (Cas. B4882), α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Cas.10065) y β -amilasa tipo II-B de cebada (Cas. A7130). Todas las enzimas fueron adquiridas de la compañía Sigma, San Luis, Misuri, (USA).

Posteriormente, fueron realizados ensayos de inducción, para esto se empleó una concentración de proteína soluble de 200 μ g/ μ l, suplementada con ácido giberélico a 10 μ M e incubadas por 96 h a 4 °C (Koehler y Ho. 1988). Después, 20 μ l de volumen final de la reacción fueron combinados con buffer de corrida y corridos en zimogramas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

La actividad de amilasa fue revelada con solución de Lugol, mientras que la actividad de proteasa fue revelada con tinción de azul brillante de Coomassie R250. La actividad fue observada por las bandas claras sobre el fondo del gel. Todos los zimogramas se realizaron por triplicado.

6.7 Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF: La identificación de proteínas mediante espectrometría de masas fue realizada por la empresa Applied Biomics (Hayward, CA, USA). Los spots fueron sujetos a una digestión con tripsina en gel, extracción de péptidos y desalado, seguido de un análisis por MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) para determinar la identidad de la proteína mediante la búsqueda en las bases de datos con el software GPS Explorer equipado con el motor de búsqueda Mascot.

6.8 Determinación de actividad enzimática en soporte empleando sustratos sintéticos:

Para la determinación de actividad enzimática en soporte fue realizada siguiendo la metodología descrita por Vinokurov y cols. (2005). En resumen, para evaluar la actividad fueron preparados geles de PA al 12% en condición nativa, fueron corridos a 20 mA, 4 °C, 2 h.

Terminada la electroforesis los geles fueron lavados varias veces con agua bidestilada para quitar el exceso de buffer de corrida y al final se lavaron con el buffer para cada sustrato. Por otro lado, la membrana de nitrocelulosa la cual se emplea de soporte se humedece con buffer de transferencia y luego se deja secar a temperatura ambiente. En una bolsa de plástico se coloca la membrana de nitrocelulosa, luego se le agrega 1 ml del sustrato sintético, posteriormente se coloca el gel de PA al 12% y finalmente se tapa con el resto del plástico para hacer una cámara de humedad, esperar a que se observe una coloración amarilla en el gel de PA para iniciar con el revelado de la actividad enzimática (diazotización) en la membrana de nitrocelulosa:

1. Se agregaron 10 ml de nitrito de sodio 0.1% en HCl 1 M, fue incubado en agitación por 5 min a temperatura ambiente.
2. Se desechó la solución y se enjuago la membrana con agua bidestilada.
3. Se adicionaron 10 ml de sulfamato de amonio 0.5% en HCl 1 M, fue incubado en agitación por 5 min a temperatura ambiente.
4. Se desechó la solución y se enjuago la membrana con agua bidestilada.
5. Finalmente, se agregó N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine al 0.05% en etanol al 50%, y esperamos a la aparición de color rosa indicando la hidrólisis de los sustratos.

Para el ensayo en microplaca se empleó la metodología descrita por Pires y cols. (2007). Fueron preparados los buffers adecuados para cada sustrato sintético, a diferentes pH's (5.0, 7.0 y 9.0), fue agregado el sustrato sintético a una concentración de 1 mM el cual esta disuelto en DMSO concentrando. En una microplaca fueron colocados 2.5 µl de cada enzima empleada como control (tripsina, papaína y carboxipeptidasa), mientras que para las muestras empleamos 10 µl a una concentración de 50 µg/ µl, fueron agregados 100 µl del buffer con el sustrato y se incubó a temperatura ambiente por 30 min, posteriormente, se leyó la absorbancia a 405 nm a los 10 y 30 min.

Para este ensayo empleamos los siguientes sustratos sintéticos: N α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride [L-BAPNA] (Cas. B3133), N-Benzoyl-L-tyrosine p-nitroanilide (Cas. B6760) y pGlu-Phe-Leu p-nitroanilide (Cas. P3169). Todos los sustratos fueron adquiridos de la compañía Sigma, San Luis, Misuri, (USA).

6.9 Purificación parcial de las enzimas de las maltas cerveceras: La purificación parcial de las enzimas de las muestras de malta fue realizada de acuerdo con lo descrito por Zhang y Jones. (1996). Para esto empleamos cromatografía de intercambio catiónico utilizando la columna CM HiTrapFF y HiTrap SP XL de 1 ml de GE Healthcare, las muestras fueron eluidas con Buffer de acetatos de sodio en gradiente de 5-300 mM con un flujo de 1 ml/min, posteriormente, las proteínas retenidas fueron lavadas con Buffer de Acetatos de sodio 2 M. Todo el proceso se llevó a cabo empleando el equipo Econo Gradient pump de Biorad y Fraction collector Model 2110 de Biorad.

Para evaluar la actividad enzimática se empleó la metodología anteriormente descrita. Además, evaluamos las fracciones con los sustratos sintéticos en ensayo en microplaca como lo describe (Pires *et al.* 2007).

6.10 Efecto de la temperatura en las hidrolasas presentes en la cebada malteada: La evaluación del efecto de la temperatura sobre las hidrolasas presentes en las cebadas malteadas fue realizada en microplaca de 96 pozos, para esto las muestras fueron ajustadas a 200 µg / µl de concentración de proteína total soluble, posteriormente, fueron colocadas a diferentes temperaturas (control, 40, 60, 80, 90 y 100 °C) durante una hora, por último, se realizó el ensayo de actividad enzimática como lo mencionamos anteriormente.

6.11 Elaboración y evaluación de mostos 100% cebada malteada: Para la elaboración de los mostos 100% cebada malteada empleamos las maltas D1, D2, D3 y como control la malta comercial 2-ROW de la empresa Malteurop (Milwaukee, WI, USA). Los mostos fueron preparados en el laboratorio de acuerdo con limure y cols. (2012); 50 g de cebada malteada fueron mezclados con 200 ml de agua bidestilada desionizada. La mezcla se calentó a 45 °C por 30 min. Después la temperatura se incrementó a 70 °C (1 °C/min) y se agregaron 100 ml de agua bidestilada desionizada e incubada a 70 °C por 60 min. Finalmente, el mosto fue enfriado hasta temperatura ambiente (22 °C), filtrado y ebulido durante 15 min. En cada cambio de temperatura, 5 ml de mosto fueron tomados y almacenados a -20 °C para su posterior análisis. La evaluación de los parámetros fue realizada siguiendo los métodos analíticos oficiales de la American Society of Brewing Chemists (Métodos de análisis ASBC) por el laboratorio de CCM. Las muestras de cada mosto fueron tomadas en condiciones asépticas.

6.12 Nitrógeno amino libre (FAN): Fue utilizado el método colorimétrico de ninhidrina para determinar la cantidad de FAN en el mosto. (Método de Wort-12). Los mostos (1 ml) se diluyeron a 100 ml con agua destilada y 2 ml de la dilución fueron transferidos a tubos de ensayo por triplicado. Después, se añadió 1 ml de reactivo de ninhidrina (Na_2HPO_4 2.8 mM, ninhidrina 0.3 mM, KH_2PO_4 4.4 mM, pH 6.6–6.8) a cada muestra y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 16 minutos. La reacción se dejó enfriar durante 20 min en un baño de agua a 20 °C. Posteriormente, fueron añadidos 5 ml de la solución de dilución (KIO_3 9.4 mM, etanol al 38.4%) a cada muestra. Después de mezclar bien la reacción, la absorbancia es medida a 570 nm contra agua bidestilada. Fue utilizada solución de glicina 0.14 mM como solución estándar. Para los cálculos se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{FAN (mg/ml)} = (\text{absorbancia neta de la solución de prueba} / \text{absorbancia neta de la solución estándar}) \times 2 \times \text{dilución}$$

6.13 Determinación de azúcares en el mosto: Las muestras de mosto fueron analizadas por HPLC Agilent 1100 con detección ELSD. El solvente de HPLC fue 75% de acetonitrilo en agua, a una tasa de flujo de 1 ml/min utilizando una columna de hidratos de carbono de Alltech de 4.6 mm x 250 mm. El ELSD se ajustó a un caudal de nitrógeno de 2 ml/min (a 87 ° DO). Las mediciones fueron realizadas por duplicado.

6.14 Color: El color fue determinado siguiendo el método Beer-10. 100 ml de volumen final de mosto es filtrado y mezclado con 5 g de tierra de diatomeas grado analítico. Se deja reposar por 5 min y se filtra nuevamente para clarificar completamente el mosto. La absorbancia se mide a 430 nm en una cubeta de espectrofotómetro (1/2 in.). El color es calculado por la ecuación:

$$\text{Color} = 10 (\text{Absorbancia en } \frac{1}{2} \text{ cubeta a } 430 \text{ nm})$$

6.15 pH: La concentración de iones hidrógeno se mide empleando un potenciómetro a temperatura ambiente.

6.16 Viscosidad: La viscosidad de los mostos se midió de acuerdo con el método Wort-13. Este método calcula la viscosidad absoluta o dinámica (en unidades centipoise) utilizando un viscosímetro Ostwald, con un rango de agua de 50 - 150 s y de acuerdo con el principio

de Hoesppler al medir el tiempo de rodadura de una bola a través de un capilar de vidrio inclinado lleno de 5 ml de agua o mosto a 20 °C. Cálculos:

$$\text{Viscosidad} = \text{Tiempo de flujo de mosto} \times \text{Densidad de mosto} \times 1.002$$

6.17 Análisis de aminoácidos libres: Fue determinado el perfil y concentración de aminoácidos presentes en cada mosto mediante el método de AccQ Tag Waters, utilizando el reactivo AccQ Flour (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamato, AQC); seguido de cromatografía de líquidos de alto desempeño reversa (High Performance Liquid Chromatography, HPLCII) para separar los derivados; finalmente, la cuantificación se realizó por medio de un detector de fluorescencia a 395 nm.

6.18 Monitoreo de las hidrolasas presentes en los mostos 100% cebada malteada: Para el monitoreo de las hidrolasas presentes en los mostos 100% cebada malteada fue empleada la metodología descrita anteriormente.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación del perfil de proteínas: El perfil de proteínas de almacenamiento y de reserva, mostraron diferencia en los perfiles proteicos en las globulinas y las hordeínas (Fig. 2), estas últimas están implicadas en el perfil de aminoácidos presentes en el mosto y en su filtrabilidad.

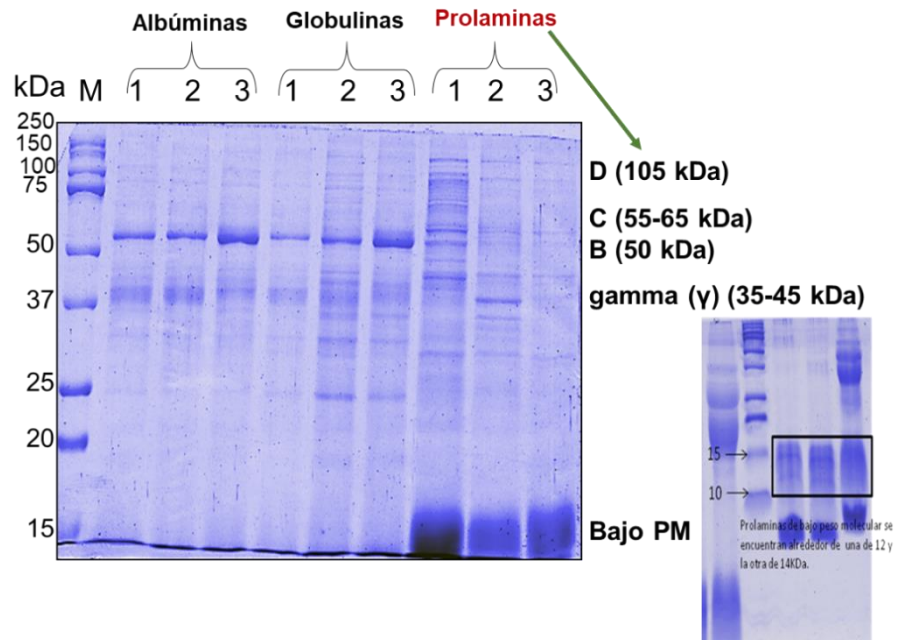


Figura 2. Perfil de proteínas mayoritarias de las maltas cerveceras.

7.2 Determinación del perfil de proteínas de la malta: La extracción de proteínas fue realizada a pH 7.5 y pH 5.0: Empleando diferentes pH's en las extracciones de proteínas totales solubles, observamos que no hay diferencia entre los perfiles a excepción de la malta M4 que tiene seis proteínas de alto peso molecular como se muestra en la figura 3a carril 5, la cual fue extraída con buffer Tris-HCl 5mM a pH 7.5.

7.3 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE): Contando con los perfiles de 1D, se procedió a evaluar el proteoma de las maltas en geles de 2D, para esto solo empleamos tres maltas nombradas como M3, M4 y D3 como se muestra en la figura 4, en la cual podemos observar que en las tres variedades de malta si hay diferencia entre su proteoma,

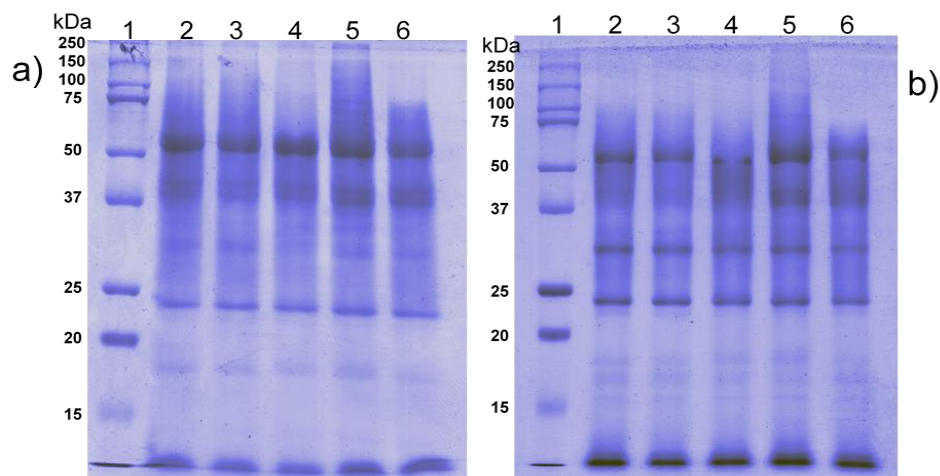


Figura 3. Perfil de proteínas de las muestras de malta extraídas con Tris-HCl 5mM a pH 7.5 **(a)** y Acetatos 0.05M pH 5.0 **(b)**. Carriles: 1. Marcador de peso molecular Kaleidoscope (BioRad); 2. M1. 3. M2. 4. M3. 5. M4. 6. M5.

la malta M3 presenta más proteínas con un punto isoeléctrico de 4-7 y de 9-10 (Fig. 4a), mientras que la maltas M4 y D3 solo se concentran en un rango de 5-7 (Fig. 4b y c), otra cosa que evaluamos en esta sección fue la sensibilidad de la tinción donde observamos que seguir empleando la tinción de azul de Coomassie es la mejor opción, debido a que logramos obtener buena resolución en los spots detectados mientras que con la tinción de fluorescencia Oriol, el perfil se muestra muy similar.

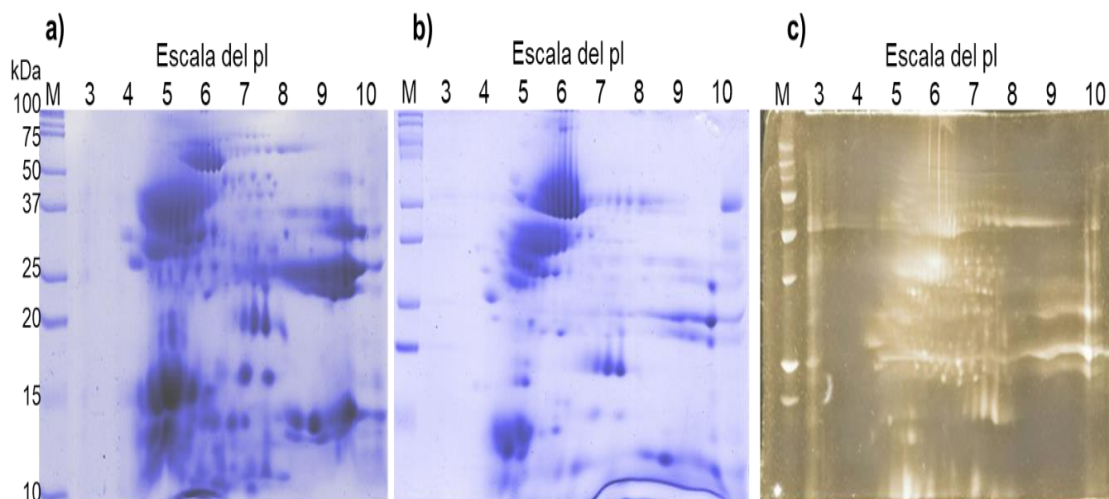


Figura 4. Proteoma de las maltas cerveceras en geles de 2D-PAGE. **M.** Marcador de peso molecular Kaleidoscope (BioRad); **a)** M3; **b)** M4; **c)** D3.

7.4 Efecto del pH en las hidrolasas presentes en la cebada malteada: El pH fue medido en un rango de 3.0 a 11.0. Todas las maltas presentaron mayor actividad enzimática entre pH 5.0 a 9.0 (Fig. 5). Esto resultados demuestran la presencia de proteasas ácidas (tipo cisteinil y aspártico proteasas) y alcalinas (tipo serino proteasas, carboxipeptidasas y aminopeptidasas). Las maltas M2, M5 y D3 presentaron un mayor contenido de enzimas ácidas, mientras que la malta M3 contiene mayor contenido de enzimas alcalinas.

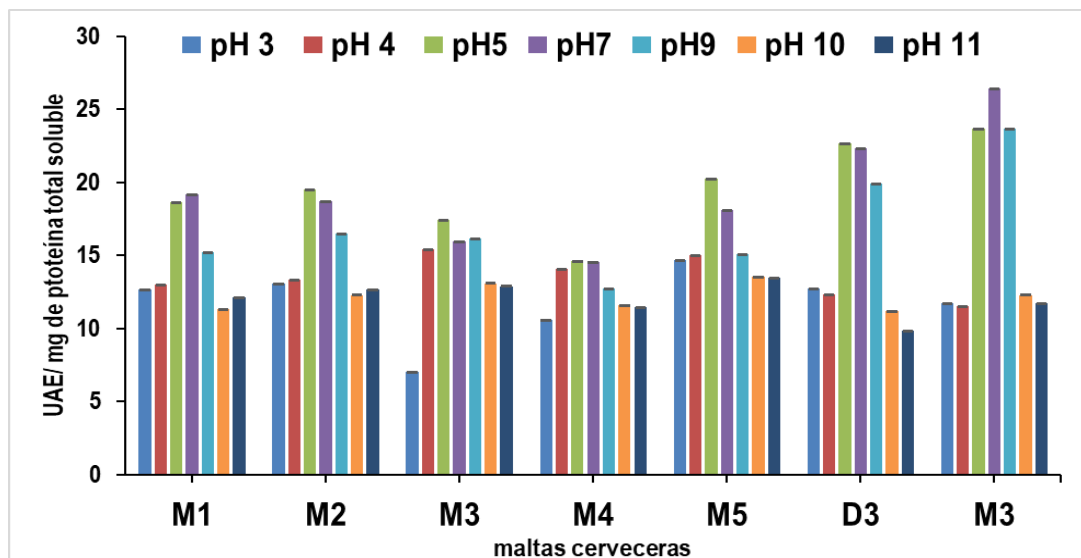


Figura 5. Efecto del pH en la actividad general proteolítica. UAE: Unidad de actividad enzimática.

Por otro, lado la actividad de las diastasas en las maltas D1, D2 y D3 las cuales fueron cultivadas en diferentes condiciones ambientales, no mostró diferencia entre el rango de pH de 3.0 a 9.0, mostrando máxima actividad amilácea a pH 5.0 y 7.0. Las maltas tuvieron un comportamiento similar a la α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma, San Luis, Misuri, USA) a excepción del pH 9.0, donde la α -amilasa disminuyó 2 veces su actividad enzimática. La β -amilasa tipo II-B de extracto crudo de cebada (Sigma, San Luis, Misuri, USA) mostró su máxima actividad a pH 5.0 y a valores más altos disminuye (Fig. 6).

7.5 Actividad de amilasa y proteasa mediante zimografía: Los zimogramas de 1D en condición reductora con SDS y nativa, son muy similares los perfiles enzimáticos, lo que si varió fue la actividad proteolítica al evaluar las dos extracciones de proteínas totales solubles y si precipitábamos dichas proteínas con sulfato de amonio al 40%, donde obtuvimos mejores resultados en los perfiles de proteasas fue empleando la extracción con

buffer Tris-HCl 5 mM a pH 7.5 y esta misma extracción pero precipitadas con sulfato de amonio al 40%, en comparación con la extracción con buffer de Acetatos de sodio 0.05 M que se mostró disminuida su actividad (Fig. 7b, c y d).

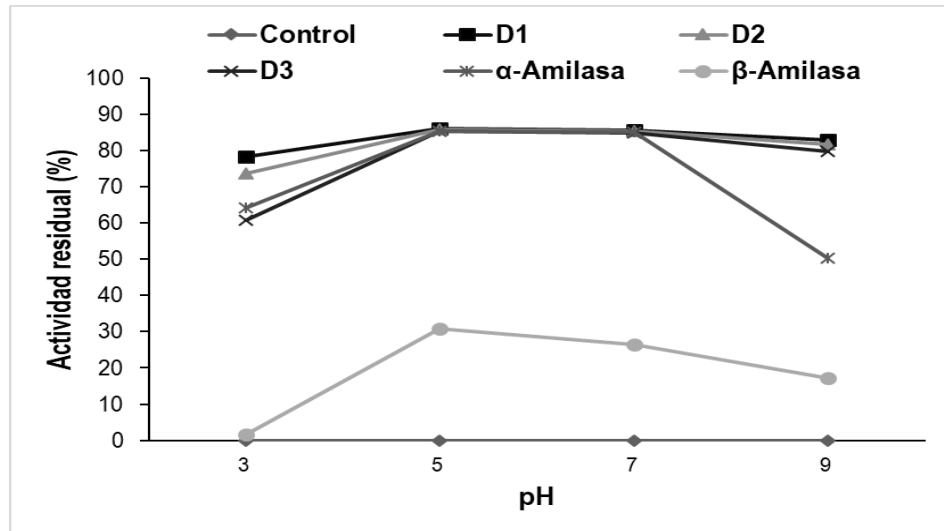


Figura 6. Efecto del pH en la actividad general de diastasas.

Las maltas D1, D2 y D3, incubadas a buffer Tris-HCl (25 mM) y $MgCl_2$ (5mM) a pH 5.0 y 7.5. A pH 5.0 no mostraron diferencia y solo se observó actividad de 23 y 35 kDa y sin bandas definidas de actividad a mayor peso molecular (Fig. 8a). Mientras que a pH 7.5 las tres maltas mostraron un perfil diferente. La malta D muestra 6 bandas con actividad proteolítica entre 50 y 150 kDa, mientras que las maltas D2 y D3 muestran un comportamiento similar a excepción que la D3 tiene una banda con actividad ca. 30 kDa (Fig. 8b).

Debido a que en las maltas D2 y D3 no observamos un patrón de actividad proteolítica definida como en la malta D1, empleamos el GA a 10 μ M, para estimular la actividad de las proteasas, observando que en la malta D3 incubada a pH 4.0 y 5.0 fue detectada una banda muy prominente de actividad proteolítica de 37- 50 kDa (Fig. 8 c y d 3+), esta actividad es muy similar a la tiolproteasa EP-A de cebada malteada. Finalmente, medimos la actividad proteolítica de las maltas M1-M5 y D3 en zimogramas de 2D en condición reductora con SDS, observamos que todas las maltas tienen un patrón de actividad muy diferente, la M3 tiene mayor actividad proteolítica en comparación con el resto de las maltas, la malta D3 tiene más variedad de enzimas las cuales se centran en un pl ca. 5 y 10 (Fig. 9).

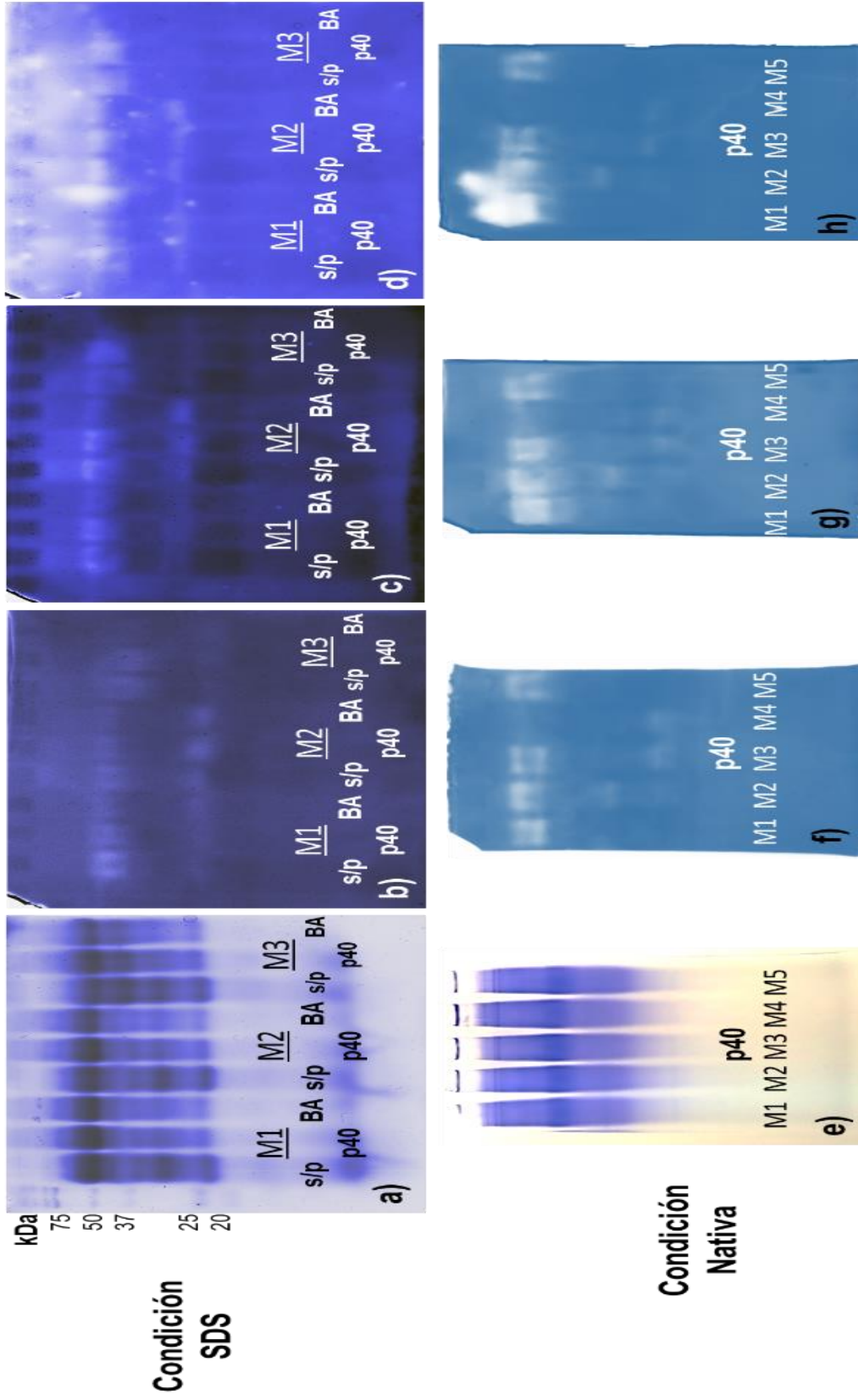


Figura 7. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en Zimogramas en gels de poliacrilamida al 12% copolimerizados con gelatina al 0.1%. Los gels fueron incubados con buffer Tris-HCl (25 mM) y MgCl₂ (5mM) a pH 5.0 (b y f); pH 7.0 (c y g) y pH 9.0 (d y h). Las figuras a y e muestran el perfil de proteínas. Símbolos: M1-M5, diferentes maltas; p40= precipitadas con sulfato de amonio al 40%.

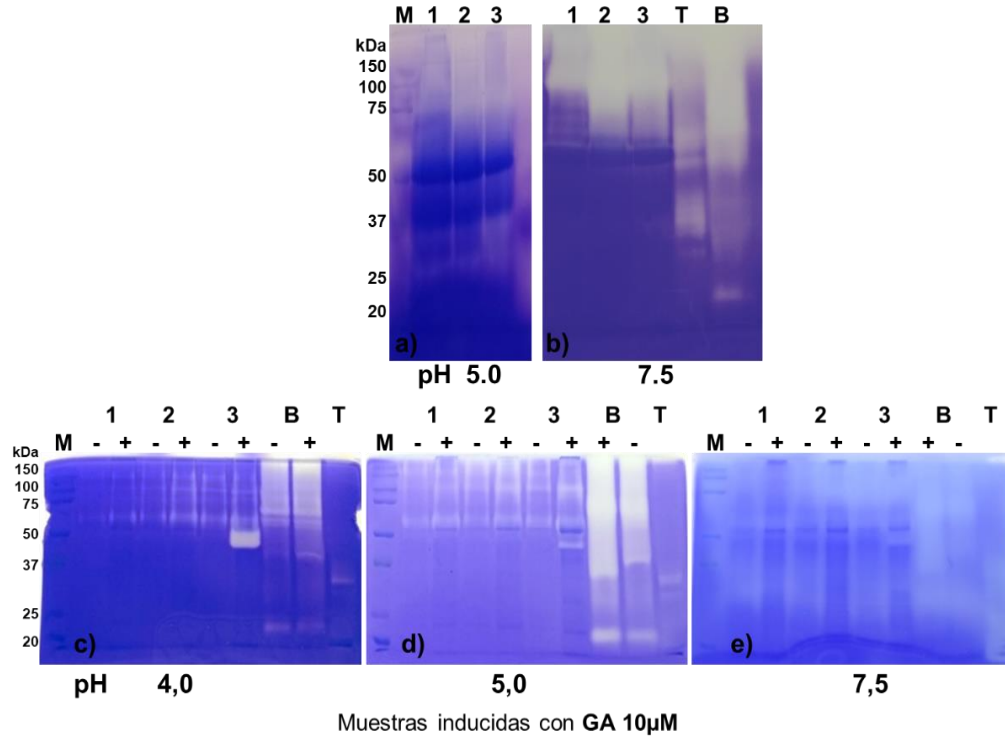


Figura 8. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en Zimogramas 1D en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina al 0.1% en condición reductora. Los geles fueron incubados con buffer Tris-HCl (25 mM) y $MgCl_2$ (5 mM) a pH 4.0 (c); pH 5.0 (a y d) y pH 7.5 (b y e). **M.** Marcador de peso molecular kaleidoscope de Biorad. **1.** Malta D1. **2.** Malta D2. **3.** Malta D3. **B.** Bromelina de pina. **T.** Tripsina de páncreas bovino. **+**. Inducido con GA. **-**. No inducido con GA.

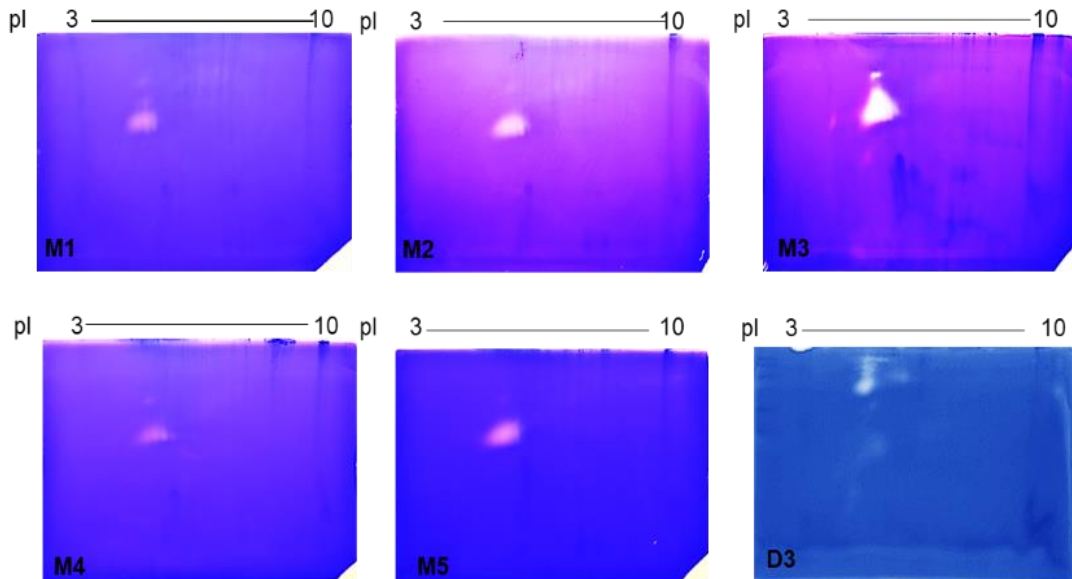


Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en Zimogramas 2D en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizados con gelatina al 0.2% en condición reductora. Los geles fueron incubados en Buffer de Acetatos 0.05 M pH 5.0.

Por otro lado, la actividad tipo amilasa en zimogramas con almidón de papa, mostraron una banda muy prominente de actividad de amilasa alrededor de 40-75 kDa. La malta D1 mostró una banda de aproximadamente 20 kDa a pH 5.0 (Fig. 10, flecha verde). La malta D3 muestra dos bandas de aproximadamente 30-35 kDa a pH 6.0 con alta actividad (Fig. 10, flecha roja).

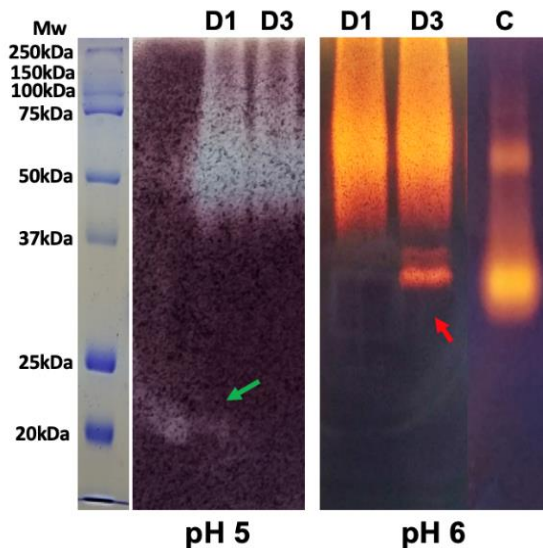


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad amilácea en Zimogramas copolimerizados con almidón de papa al 0.2 % en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras. **M.** Marcador de peso molecular Kaleidoscope Biorad. 1. Malta D1. 2. Malta D3.

7.6 Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF y Nano LC-MS/MS: En base los perfiles enzimáticos, seleccionamos las señales similares entre las diferentes variedades y las que eran únicas de cada variedad. Las muestras seleccionadas fueron enviadas a Applied Biomics, CA. Lo interesante fue encontrar que la enzima de la M1 y D3 tienen la misma secuencia aminoacídica, es una proteína de la cual se desconoce su función y es considerada una proteína hipotética, mientras que para la malta M3 también obtuvimos la identificación de una proteína hipotética (Fig. 11).

7.7 Determinación de actividad enzimática en soporte empleando sustratos sintéticos: Ensayamos dos métodos uno en soporte y otro en microplaca. En el soporte detectamos actividad tipo serino proteasas de ca.250, 150 y 60 kDa (Fig. 12 a, b y e), mientras que para el tipo cisteinil entre 150 y 70 kDa (Fig. 12c), para el tipo de carboxipeptidasa se mostró una ligera actividad por eso está señalado con un círculo rojo, solo el control que es la carboxipeptidasa Y de *S. cerevisiae* se detecta claramente.

Con respecto al ensayo en microplaca, todas las maltas mostraron las tres actividades (Fig. 13). Para el tipo serinoproteasa, pH's 5.0, 7.0 y 9.0, observamos que las maltas son las activas a pH 9.0; la malta M1 mostró mayor actividad tipo serinoproteasa (Fig. 13c): Esto concuerda con lo observado en la actividad en soporte (Fig. 12a). Para la actividad tipo cisteinil la malta D3 presento mayor actividad en comparación con la M4 que fue la que presentó menor actividad de ese tipo (Fig 13a). Por último, para el caso de la actividad específica tipo carboxipeptidasa las maltas D2 y D3 presentaron mayor actividad y de nuevo la M4 fue la que presentó menor actividad (Fig. 13b).

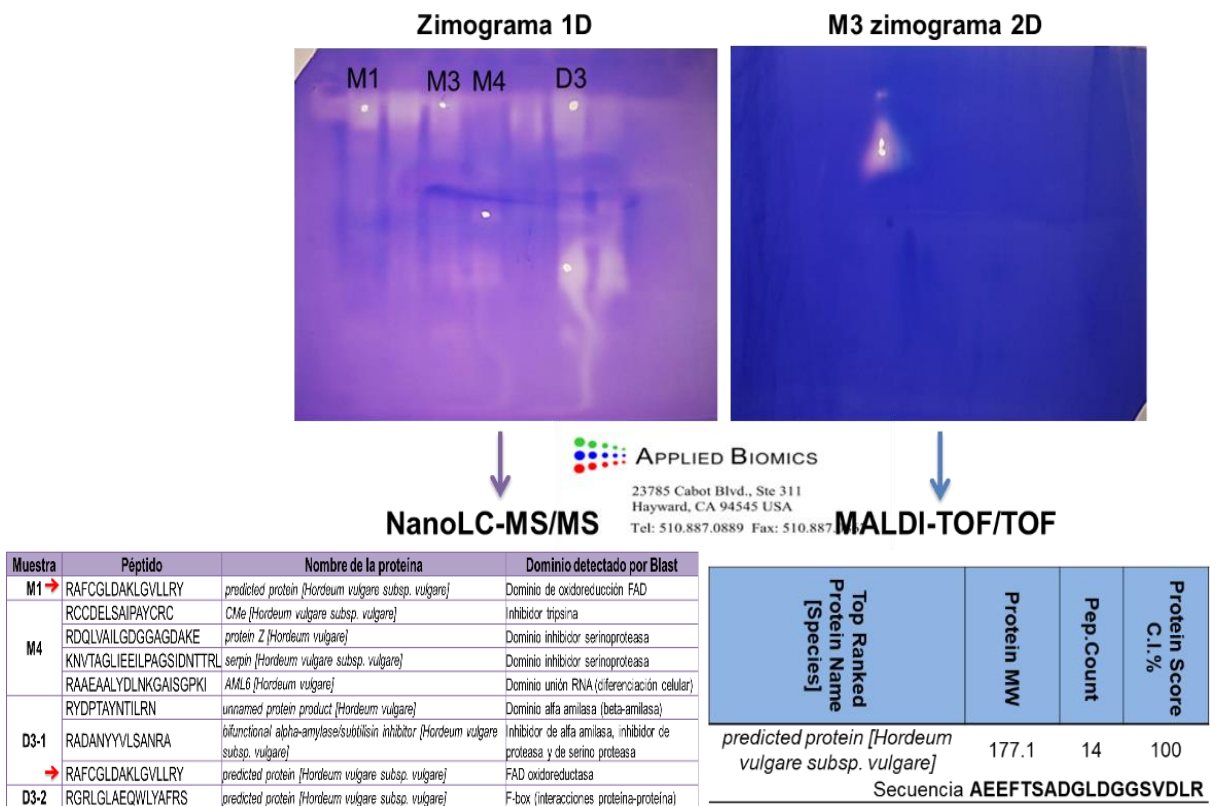


Figura 11. Selección e identificación de enzimas candidatas como marcadores de calidad.

7.8 Purificación parcial de las enzimas de las maltas cerveceras: Al conocer el tipo específico de las enzimas presentes en las maltas se realizó una purificación parcial de dichas enzimas mediante cromatografía de intercambio catiónico en gradiente de concentración, para este procedimiento empleamos las maltas M3 y D3.

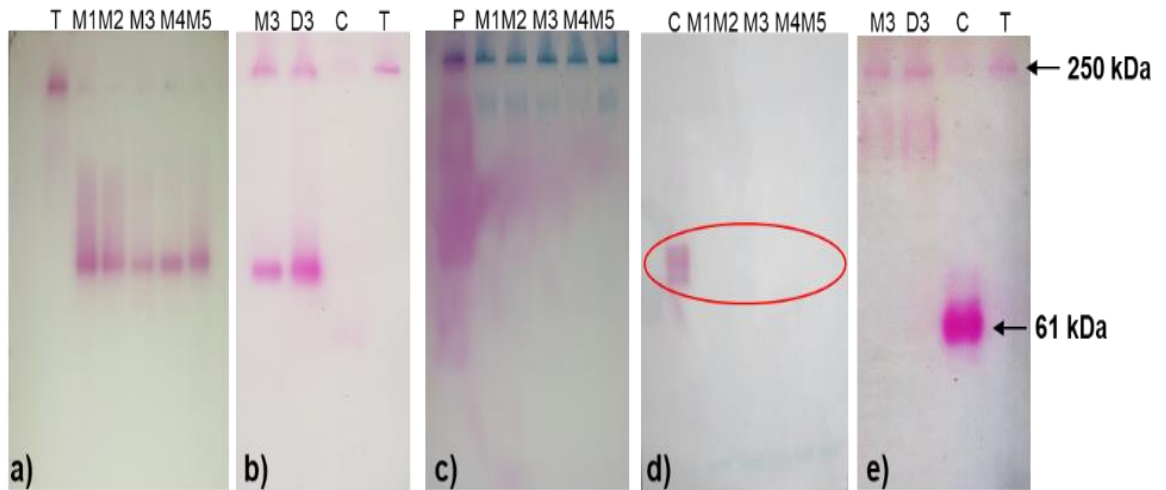


Figura 12. Determinación del tipo de actividad enzimática específica en ensayo en soporte empleando sustratos sintéticos. **M1-M5 y D3** = Maltas. **T.** Tripsina de páncreas bovino. **C.** Carboxipeptidasa Y de *S. cerevisiae*. **P.** Papaína. **a) y b)** Actividad tipo serinoproteasa (Tipo tripsina). **c)** Actividad tipo cisteinilproteasa. **d)** Actividad tipo carboxipeptidasa. **e)** Actividad tipo serinoproteasa (Tipo quimotripsina).

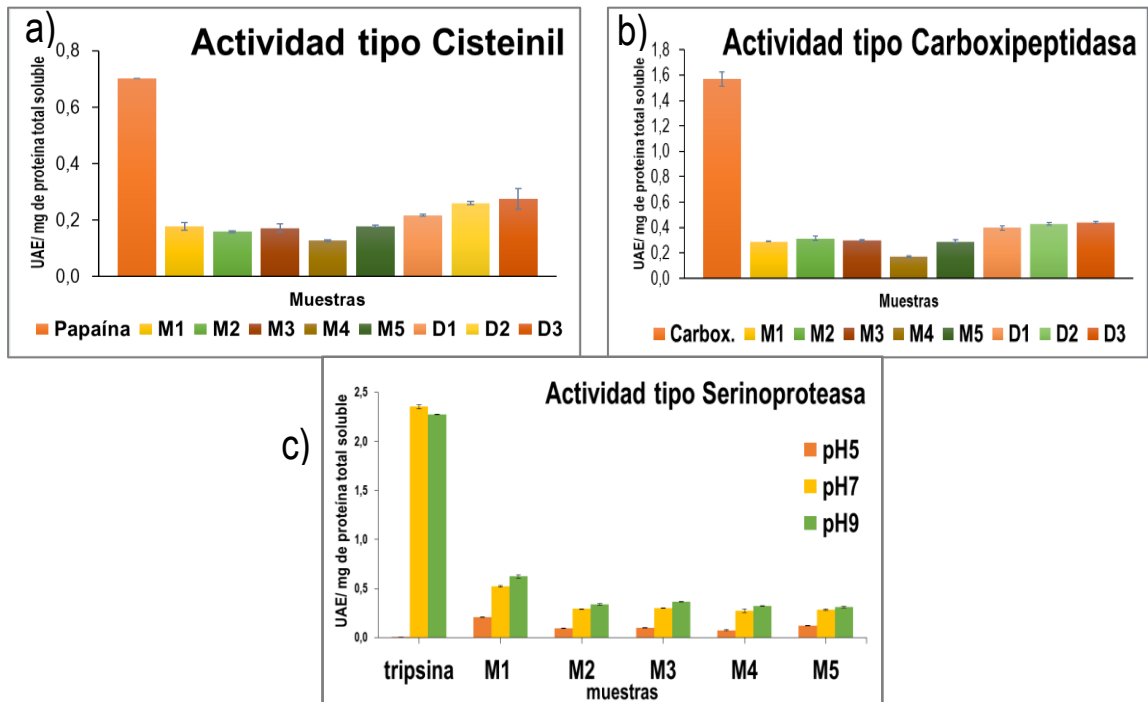


Figura 13. Determinación del tipo de actividad enzimática específica en ensayo en microplaca empleando sustratos sintéticos.

En la malta D3 obtuvimos un pico las fracciones 2-6, lo que significa que separamos solo una proteína, mientras que para la malta M3 obtuvimos dos picos el primero en las fracciones 2-3 y el segundo en las fracciones 6-7 y se dejó de detectar en la fracción 11, esto significa que de la malta M3 separamos dos proteínas (Fig. 14).

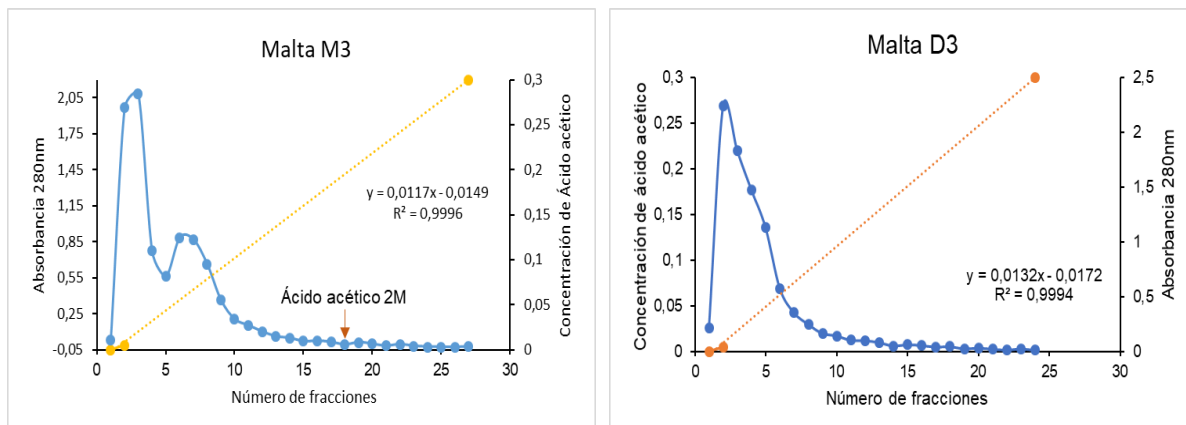


Figura 14. Cromatogramas de las maltas M3 y D3.

Todas las fracciones fueron evaluadas para determinar su actividad de proteasa total empleando azocaseína al 1% como sustrato (Fig. 15a), de las fracciones que mostraron actividad proteolítica fueron evaluadas con los sustratos sintéticos para determinar el tipo específico de la proteasa y observamos que la malta D3 mostró un 93% de actividad tipo cisteinil en comparación con la M3 que tuvo un 64% (Fig. 15b).

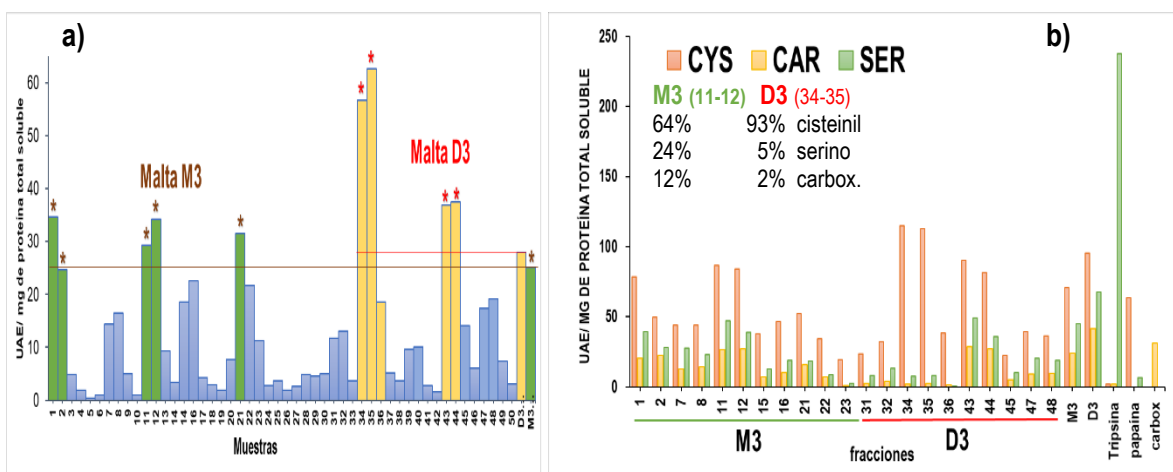


Figura 15. Determinación de proteasa total con azocaseína al 1% (a) y Determinación de actividad específica de proteasas (b).

De la fracción de la malta D3 que dio el 93% de actividad tipo cisteinil, se le determinó un zimograma en 2D-PAGE al 12% copolimerizado con gelatina al 0.1% en condición reductora y efectivamente solo mostró un spot con actividad proteolítica, este resultado concuerda con el observado en los zimogramas de 1D al inducir esta malta con GA (Fig. 16).

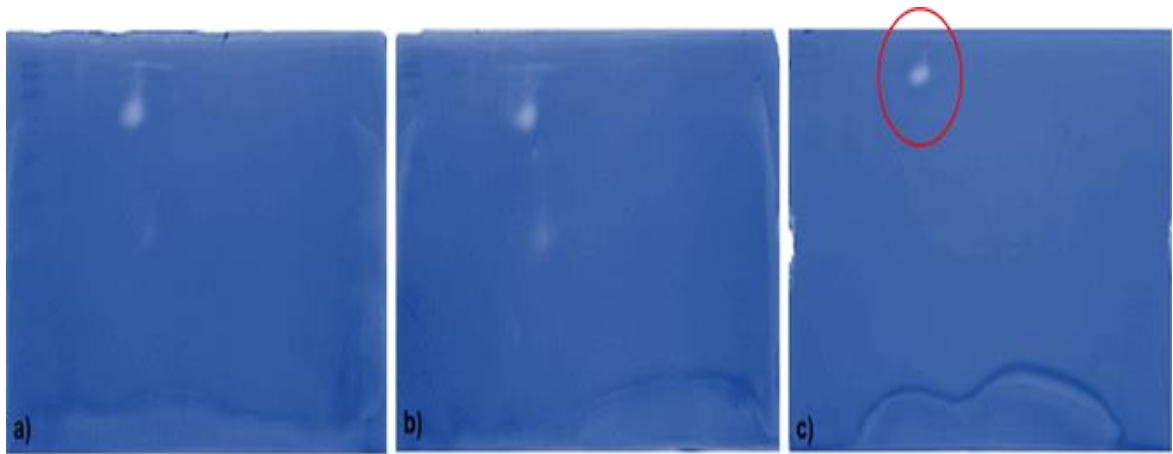


Figura 16. Actividad de proteasa total en zimogramas en 2D-PAGE copolimerizado con gelatina al 0.1% en condiciones reductoras empleando la malta D3. **a)** Extracción B. Acetatos 0.05 M pH 5.0. **b)** Extracción B. Tris-HCl 5mM, CaCl₂ 1 mM a pH 7.5. **c)** Fracción 34.

7.9 Efecto de la temperatura en las hidrolasas presentes en la cebada malteada: Otro punto de vital importancia para la industria cervecera es que las enzimas presentes en las maltas sean termoestables en el proceso de elaboración de cerveza, para esto medimos el efecto de la temperatura en las muestras de malta y posteriormente evaluamos su actividad hidrolítica. Para el caso de la determinación de la actividad amilácea empleamos las maltas D1, D2, D3 y MC (malta comercial empleada como control). Y observamos que todas las maltas tienen su mayor actividad a 60 °C, a 80 °C su actividad residual se reduce hasta el 20% en D1, 50% en D2 y en D3 y MC hasta el 30% (Fig. 17).

Esto se corroboró en zimogramas de almidón de papa al 0.2% como sustrato y observamos que la malta D2 incubada a pH 5.0 muestra actividad a 80 °C y una ligera actividad a 100 °C (Fig. 17d).

Para el caso de la evaluación de la termoestabilidad de las enzimas proteolíticas de las maltas empleamos las maltas M1, M3, M4 y D3. Todas las maltas mostraron diferente actividad a las temperaturas evaluadas teniendo sus máximas actividades a altas

temperaturas. Las maltas M1, M3 y M4 incubadas a pH 5.0 muestran su mayor actividad a 70 °C, mientras que a pH 7.0 la malta M1 su mayor actividad es a 90 °C, las maltas M3 M4 y D3 es a 100 °C (Fig. 18). A pH 9.0 solo la malta M3 mostró su mayor actividad a 45 °C.

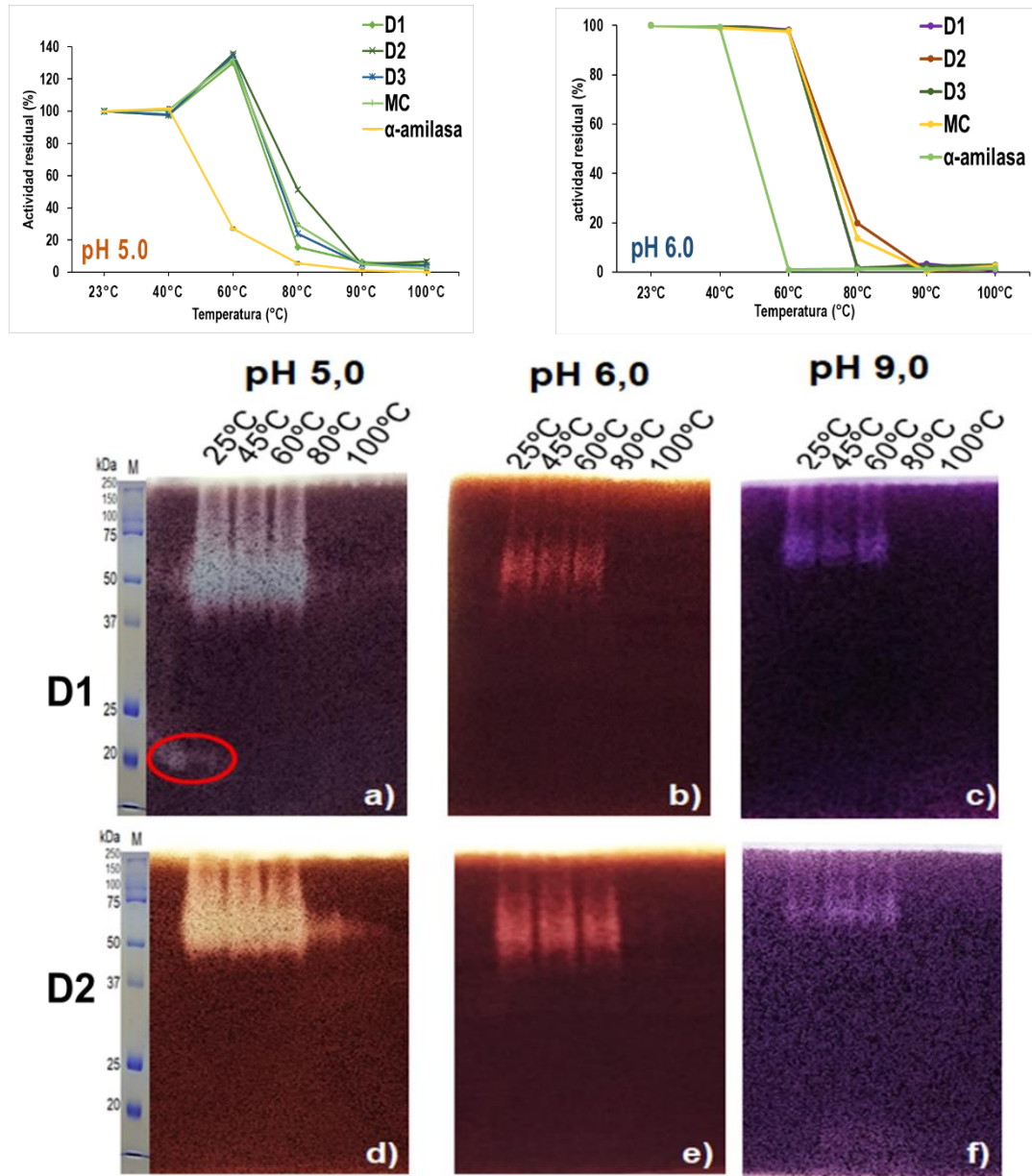


Figura 17. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilasa en muestras de malta, ensayo en microplaca (parte superior) y en geles de poliácridamida al 12 % copolimerizado con almidón de papa 0.2% como sustrato (parte inferior). **a y b)** Incubado en Buffer de acetatos de sodio 0.05 M más cisteína 5 mM pH 5.0. **b y e)** Incubado en Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 6.0. **c y f)** Incubado en Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M pH 7.0.

La malta D3 muestra menor UAE, esto se debe porque el ensayo fue realizado ajustando su concentración a 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que para las otras muestras se empleó el extracto de proteínas concentrado.

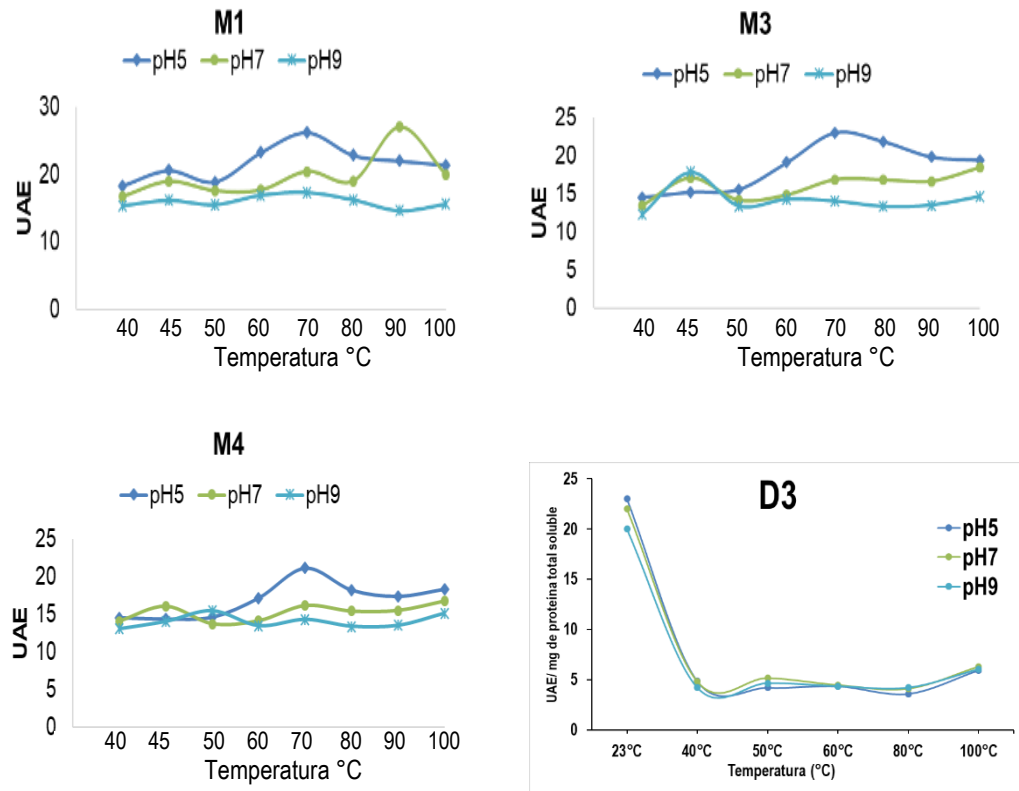


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad de proteasa total en muestras de malta, empleando azocaseína al 1% como sustrato.

7.10 Elaboración y evaluación de mostos 100 % cebada malteada: Para relacionar las enzimas de las maltas con el perfil de aminoácidos y azúcares fermentables, fueron preparados mostos 100 % cebada malteada, para este ensayo empleamos las maltas D1, D2, D3 y MC, primero se llevó a cabo el proceso de molienda, posteriormente la maceración la cual fue escalonada y en cada cambio de temperatura se tomó una muestra de 5 ml para sus posteriores análisis (Fig. 19).

Para determinar su contenido proteico, se cuantificó proteína total soluble mediante la técnica de Bradford y observamos que el mosto D1 no mostró diferencia en su cantidad de proteína, en comparación con los mostos D2 y D3 que disminuyeron casi el 50 % de su contenido de proteínas (Fig. 20).

Otro parámetro analizado fue el amino nitrógeno libre (FAN) importante para el crecimiento de la levadura. El mosto D1 obtuvo un valor más alto 327 mg/ L en comparación con el mosto D2 (244 mg / L) y el mosto D3 (262 mg/ L), el cual fue similar al valor obtenido con el mosto de malta comercial (269 mg/ L) (Tabla 2).

Estos resultados coinciden con las bandas de actividad proteolítica de alto peso molecular encontradas mediante zimogramas en la malta D1. Otro parámetro evaluado fue el color en donde el mosto D2 mostró un color más oscuro de 25.5 ± 0.21 en comparación con los otros mostos D1 (20.80 ± 0.57), D3 (20.90 ± 0.14) y mosto control (8.4) (Tabla 2).

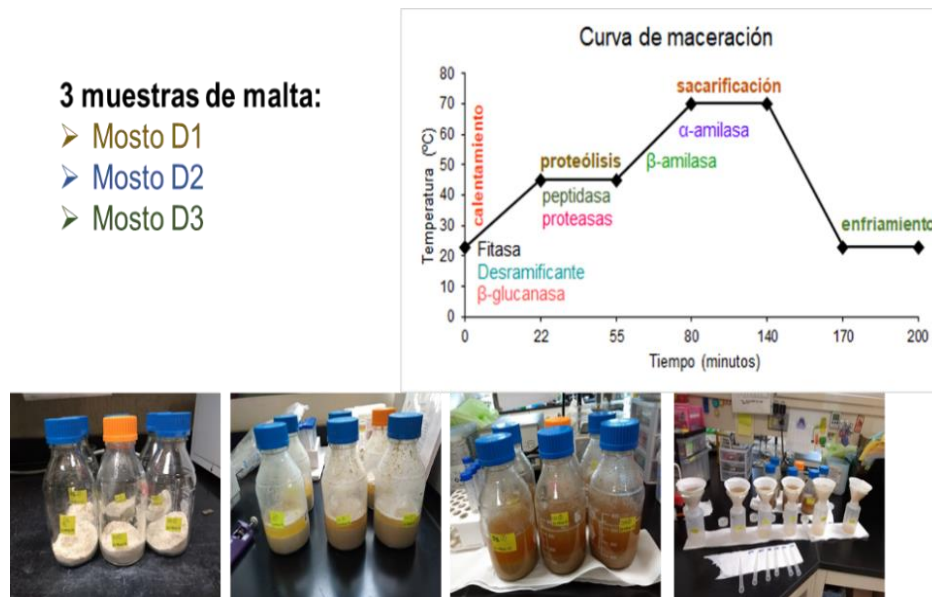


Figura19. Preparación de mostos 100% cebada malteada.

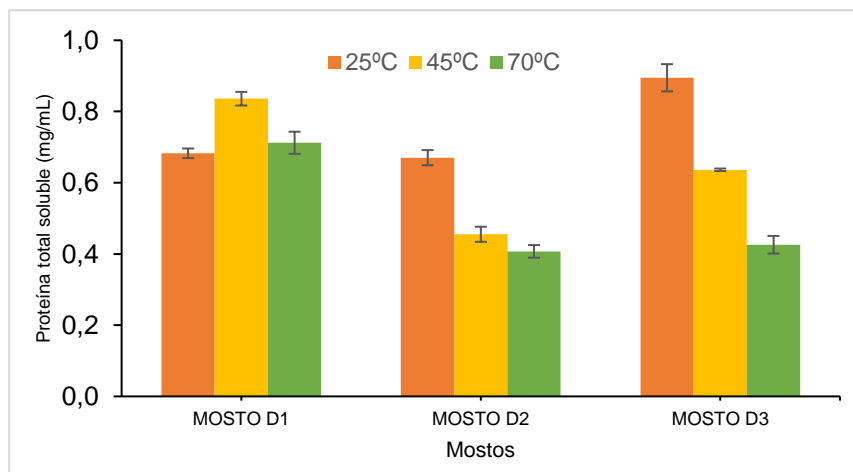


Figura 20. Cuantificación de proteína total soluble en el proceso de maceración.

Tabla 2. Parámetros de los mostos producidos con las diferentes maltas.

Parámetros analizados	Mostos			
	D1	D2	D3	MC
Proteína total soluble (mg/L)	700	400	400	400
Alfa-amino nitrógeno (mg/L)	327	244	262	269
Viscosidad (cps)	1.72	1.65	1.67	1.51
pH	5.9	6.0	6.0	5.9
Color (SMR)	20.8(±0.57)	25.5 (±0.21)	20.9 (±0.14)	8.4 (±0.21)
Glucosa	13.0 (±0.05)	12.0 (±0.11)	11.0 (±0.00)	12.0 (±0.15)
Sacarosa	3.0 (±0.04)	2.0 (±0.01)	2.0 (±0.01)	2.0 (±0.06)
Fructosa	1.0 (±0.01)	2.0 (±0.01)	2.0 (±0.01)	1.0 (±0.01)
Maltosa	55.0 (±0.16)	57.0 (±0.04)	61.0 (±0.34)	52.0 (±0.91)
Maltotriosa	12.0 (±0.04)	12.0 (±0.01)	13.0 (±0.07)	13.0 (±0.39)

En cuanto al perfil de aminoácidos libres los resultados muestran que algunos aminoácidos aumentan, por ejemplo, en el mosto D1 la prolina aumenta (1.67 veces) con respecto a los otros mostos, ácido aspártico (1.21 veces), metionina (1.40 veces), ácido glutámico (1.13 veces), histidina (1.68 veces), lisina (1.22 veces), leucina (1.22 veces), valina (1.24 veces) y fenilalanina (1.27 veces). Todos estos aminoácidos están relacionados con la alta fermentabilidad del mosto y estos resultados proporcionan valiosa información a los cerveceros.

En cuanto a los perfiles de azúcares fermentables en los mostos evaluados observamos que se encontraban dentro de los parámetros de calidad establecidos por la Convención Europea de Cervecería, 1998, donde aproximadamente el 60% de los azúcares eran maltosa, seguida de 15-17% de maltotriosa, 12-15% de glucosa y 1.3-1.9% de fructosa (Tabla 2). En base a estos resultados, las condiciones de cultivo no afectan significativamente el perfil de azúcares fermentables porque el mosto preparado con esta variedad produce el perfil óptimo para una buena fermentación y tiene niveles similares al mosto preparado con malta comercial. Sin embargo, el mosto D3 mostró niveles ligeramente más altos de fructosa, maltosa y maltotriosa. Con respecto al pH en todos los mostos se observó muy similar el cual osciló entre 5.9 y 6.0 (Tabla 2).

Otro parámetro analizado fue la viscosidad en de nuevo el mosto D1 obtuvo la mayor concentración de 1.72 cps con respecto a los otros mostos que cae dentro del parámetro normal, este parámetro está relacionado con el contenido de proteínas el cual concuerda

con nuestros resultados y, además, fue el mosto tuvo un tiempo de filtración más largo en comparación con los demás (Tabla 2).

Finalmente monitoreamos las enzimas durante el proceso de maceración mediante zimogramas para el caso de actividad de proteasas, observamos que las principales diferencias entre la malta D1 respecto a las otras maltas, son bandas de actividad presentes entre 25 y 37 kDa observadas principalmente a pH 5.0 y 7.5 (Fig. 21). Una pequeña banda de actividad de ca. 22 kDa fue observada en la etapa de maceración a 70 °C (pH 4.0), la cual está presente solo en esta malta (flecha amarilla). Otra de ca. 33 kDa (pH 7.0) que es más intensa en la malta D1 (flecha rosa). Estas dos bandas podrían estar relacionadas a los resultados descritos anteriormente.

Al analizar mediante zimogramas los patrones de actividad amilolítica, pudimos observar que los mostos preparados con la malta D1 y D2 son prácticamente iguales, sin embargo, el mosto D3 conserva la banda de actividad de aproximadamente 30 a 35 kDa a pH 6.0 (Fig. 21, cuadro verde), observada en los zimogramas de malta. Esta enzima podría estar relacionada a los niveles ligeramente más altos de algunos azúcares fermentables.

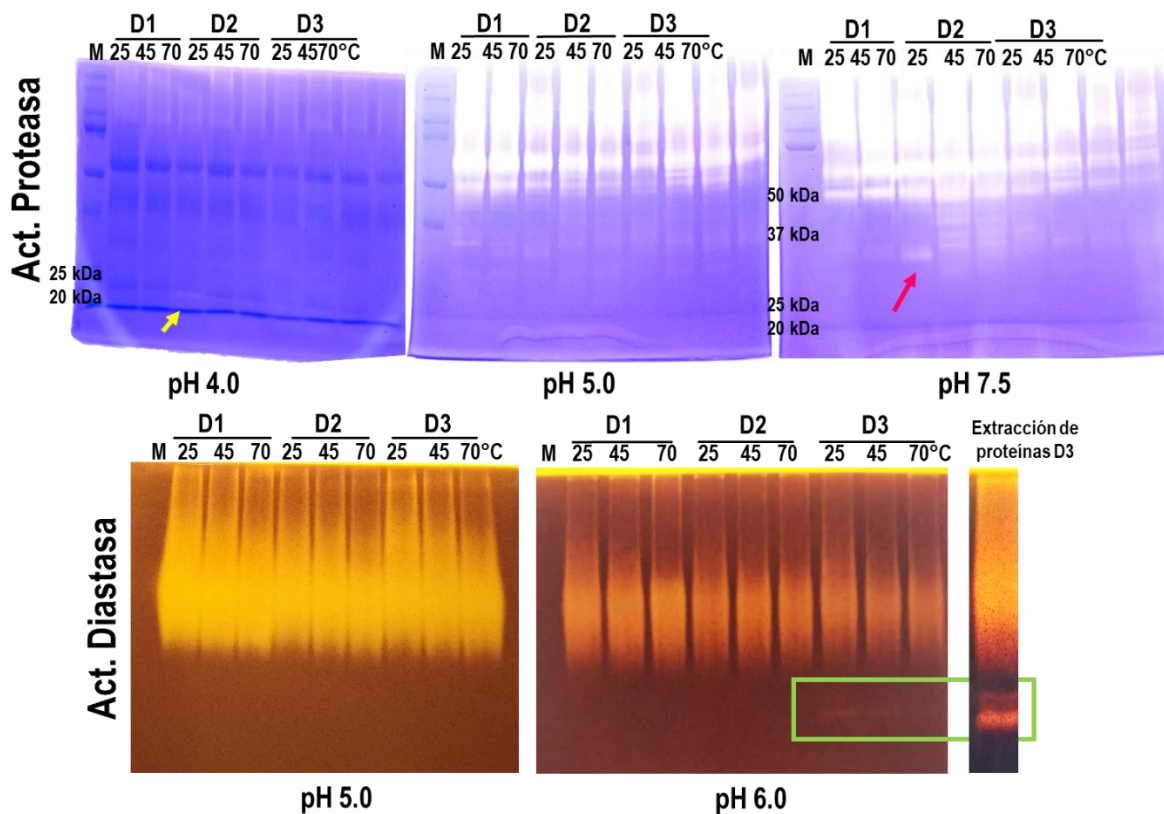


Figura 21. Monitoreo de las enzimas hidrolíticas presentes en las maltas durante el proceso de maceración. **D1, D2 y D3.** Maltas.

8. DISCUSIÓN

Con el objetivo de encontrar marcadores de calidad en maltas cerveceras, en el presente trabajo realizamos un acercamiento al proteoma de diferentes maltas. Analizamos el perfil de proteínas de almacenamiento y encontramos diferencia en las hordeínas (Fig. 2). El patrón del grupo B de la M1 se vio más aumentado con respecto al resto, solamente la malta M2 mostró una banda muy remarcada correspondiente a las hordeínas del grupo gamma, proteínas están implicadas en el perfil de aminoácidos presentes en el mosto y en su filtrabilidad (Van den Berg *et al.* 1981).

Por otro lado, investigamos el perfil de las proteínas solubles totales de cada malta extraída a pH 5.0 y pH 7.5 (Wrobel y Jones. 1992; Ostergaard *et al.* 2004). El perfil y concentración de proteínas solubles, mostró que no existe efecto del pH sobre la extracción (Fig. 3), a excepción de la malta M4 que tienes seis proteínas de alto peso molecular como se muestra en la figura 3a carril 5 la cual fue extraída con buffer Tris-HCl 5 mM CaCl₂ 1 mM a pH 7.5.

Comparamos el perfil proteómico de tres variedades de malta cervecera y observamos que si hay una diferencia significativa entre el contenido proteico de cada una ya que la malta M3 arrojó mayor cantidad de proteínas con un punto isoeléctrico de 4-7 y de 9-10 (Fig. 4a), mientras que la maltas M4 y D3 solo se concentran en un rango de 5-7 (Fig. 4b y c). Estudios de comparación proteómica han sido eficazmente empleados para identificar proteínas para distinguir cultivares de cebada, así como las cualidades de las cebadas y maltas (Jin *et al.* 2013). Guo y cols. (2016) mencionaron que el contenido de proteínas en el grano de cebada es significativamente diferente entre el cultivo y la cebada malteada, esto se asemeja a lo observado en nuestros resultados.

Li y cols. (2014) demostraron que la variación del proteoma de un cultivar de malta y otro se ve influenciado en los procesos de malteado, esto significa que las maltas evaluadas tuvieron un proceso de malteado diferente.

Con respecto al efecto del pH, observamos que todas las maltas se comportan diferente, pero para el caso de la actividad de proteasa su máxima actividad se dio en un rango de 5.0-9.0. Las maltas M2, M5 y D3 presentaron un mayor contenido de enzimas ácidas, mientras que la malta M3 contiene mayor contenido de enzimas alcalinas (Fig. 5). Jones (2005) menciona que las enzimas presentes en la malta dependen del pH en el que se encuentra el mosto, por ejemplo si las maltas se maceran a un pH de 3.8 las enzimas tipo cisteinil son las que predominan más fuertemente en el medio, mientras que si se

maceran a pH 6.0 y 8.0 las que predominan son las tipo serino y metaloproteasas y las tipo cisteinil son inactivadas, este resultado nosotros lo observamos cuando empleamos el GA para estimular la actividad tipo cisteinil y cuando incubamos los zimogramas a pH 7.5, la actividad se vio inactivada en las muestras de malta (Fig. 8).

Por otro lado, la evaluación de las diastasas fue realizada en los lotes de las maltas D1, D2 y D3 las cuales fueron cultivadas en diferentes condiciones ambientales, se midió el efecto del pH en el cual, no se mostró diferencia entre el rango evaluado de 3.0 a 9.0. Las tres maltas mostraron su máxima actividad amilácea a pH 5.0 y 7.0 (Fig. 6); Greenwood y MacGregor (1965), mencionan que el pH óptimo para las amilasas es de 5.5.

Al determinar el rango óptimo de pH en el cual las hidrolasas de la malta son más activas, procedimos a realizar zimogramas para ver el perfil tanto de las proteasas como de las amilasas presentes en cada una de las ocho variedades malta (Figs. 7, 8, 9 y 10).

Primero evaluamos las maltas M1-M5 en zimogramas en 1D copolimerizados con gelatina al 0.2% como sustrato en dos condiciones: reductoras y nativas para determinar la actividad proteolítica, observamos que existen diferencias muy marcadas entre las maltas (Fig. 7).

El perfil de las proteasas que visualizamos se asemeja a lo reportado por Jones y Marinac (2002), ellos emplearon gelatina y edestina como sustrato, los pusieron a pH 6.0 y 4.8 y a los dos pH el perfil de proteasas se observan muy similares a los que nosotros mostramos en este trabajo, a pH 6.0 se muestran proteasas de alto peso molecular las cuales pudieran ser tipo serino, metaloproteasas y aspártico proteasa y a pH 4.8 entre 20 y 75 kDa este dato también concuerda con lo observado en los zimogramas de las maltas D1, D2 y D3, los cuales incubamos a pH 5.0, en este pH están presentes las tipo cisteinil (Fig. 8).

En la figura 7(f, g y h) observamos que las maltas M3 y M4 muestran una actividad proteolítica débil de ca. 40 kDa, que coincide con una proteasa alcalina de bajo peso molecular previamente informada en semillas de frijol (Padmakar *et al.* 2005).

La malta M1 da una fuerte actividad proteolítica a pH 9.0 alrededor de 150-250 kDa (Fig. 7d). La malta D1 a pH 7.5 muestra 6 bandas con actividad proteolítica entre 50 y 150 kDa, mientras que las maltas D2 y D3 mostraron un perfil similar a excepción que la D3 muestra una de ca. 30 kDa (Fig. 8 a y b). Grudkowska y cols. (2013) reportan una metaloproteinasa (150 kDa) y una proteinasa aspártica (110 kDa) similares en hojas de trigo. Las metaloproteinasas están relacionadas con la calidad y pertenecen a un grupo de proteasas importantes en el proceso cervecero. Estas enzimas de alto peso molecular

juegan un rol importante en la hidrólisis de proteínas de almacenamiento, relacionadas con el contenido de KI y FAN. A pH 5.0 las maltas (D1, D2 y D3) no mostraron diferencias en los patrones de actividad, además, mostraron dos bandas de actividad de 23 y 35 kDa y sin bandas definidas de actividad a mayor peso molecular (Fig. 8 a y b).

Debido a que en las maltas D2 y D3 no se lograba observar un patrón de actividad proteolítica definida como en la malta D1, empleamos el GA a 10 μ M, para estimular la actividad de las proteasas y observamos que, utilizando este cofactor, en la malta D3 incubada a pH 4.0 y 5.0 fue detectada una banda muy prominente de actividad proteolítica de 37- 50 kDa (Fig. 8 c y d 3+), esta actividad es muy similar a la tiolproteasa EP-A de cebada malteada.

Koehler y Ho, (1988) purificaron y caracterizaron una cisteinil endoproteasa de la capa de la aleurona inducida durante 96 h con ácido giberélico 1 μ M y visualizada mediante zimogramas nativos empleando hemoglobina como sustrato. La enzima purificada correspondía a la EP-A con un peso molecular de 37 kDa. Este tipo de proteasa está relacionada con la calidad de la malta ya que incrementa su expresión durante el proceso de germinación y es la responsable de degradar a las hordeínas (proteínas mayoritarias de la malta) (Koehler y Ho 1990). Este resultado indica que empleando la malta D3 dará un nivel óptimo de FAN y perfil de aminoácidos, lo que se traduce a una buena fermentación y una cerveza con características deseables. Se puede observar que a pH 7.5 la actividad es inhibida en todas las maltas y controles (Fig. 8e). Esto indica que las maltas poseen actividad de tipo cisteinil proteasas las cuales son inhibidas a este valor de pH incluso con el uso de inductores.

Por otro lado, los ensayos de actividad proteolítica en geles de 2D mostraron que existen diferencias entre las maltas; la M3 fue la que mostró mayor actividad proteolítica al ser incubada a pH 5.0 (Fig. 9). De la zona de actividad de proteasa se cortó un fragmento del gel y se mandó secuenciar a Applied Biomics empleando la técnica de MALDI-TOF/TOF, como se muestra en la figura 11, se obtuvo una secuencia de 14 aminoácidos con un 100% de identidad, con la cual se identificó una proteína hipotética de 1543 aminoácidos de *Hordeum vulgare subsp. vulgare* con un peso molecular aproximado de 177.1 kDa (Takashi *et al.* 2011).

Por otra parte, se mandaron secuenciar otras 4 bandas con actividad proteolítica de las maltas M1, M4 y D3 de Zimogramas de 1D empleando Nano LC-MS/MS, se obtuvieron las secuencias de diferentes tamaños de aminoácidos y la identificación de cada una como se muestra en la figura 11, lo relevante de estos resultados es que la M1 y D3 tienen la

misma secuencia aminoacídica (RAFCGLDAKLGVLLRY), por lo tanto; esta proteasa puede ser candidata para emplearse como marcador de calidad.

Para determinar el tipo de diastasas presentes en las maltas D1 y D3 se realizaron zimogramas en condiciones reductoras empleando almidón de papa como sustrato. Las maltas mostraron una banda muy prominente de actividad de amilasa alrededor de 40-75 kDa. La malta D1 mostró una banda de aproximadamente 20 kDa a pH 5.0 (Fig. 10, flecha verde), esta banda corresponde a una α -amilasa de la familia AMY-2 (Robert *et al.* 2002).

La malta D3 muestra dos bandas de aproximadamente 30-35 kDa a pH 6.0 con alta actividad (Fig. 10, flecha roja), estos resultados son muy similares a los obtenidos por Schmitt y Marinac (2008), ellos mencionan una β -amilasa de 35-59 kDa y como esta enzima se ve afectada cuando se encuentran las proteasas tipo serino principalmente SEP-1 y hordolisina. Además, esta banda coincide con lo reportado por nuestro grupo en otra variedad de malta (Herrera *et al.* 2018), similar a una β -amilasa apoplástica de 25 kDa en hojas de *Avena sativa* reportado Uno-Okamura y cols. (2004). Una posible función de este tipo de enzima es actuar como chaperona molecular de otras enzimas, como β -glucanasas, las cuales tienen relación con el nivel de viscosidad del mosto. Esta banda de actividad de bajo peso molecular podría servir como un indicador de calidad en la malta. Por otro lado, Yin y cols. (2002) mencionan que la variación de la actividad de β -amilasa en la cebada se ve afectada por las condiciones de cultivo y medio ambiente, estos resultados concuerdan con lo observado: la actividad de β -amilasa cambió notablemente con la variedad de cebada y cultivada a diferentes condiciones ambientales (Fig. 10).

Para determinar el tipo de proteasa se emplearon sustratos sintéticos específicos para la clase de serino, cisteinil y carboxipeptidasa. Las maltas mostraron actividad tipo tripsina y carboxipeptidasa dando unas bandas de alrededor de 70 kDa y quimotripsina y cisteinilproteasa entre 100-150 kDa en condición nativa (Fig. 12), estos resultados se asemejan a lo reportado por Mikola y Pietilä (1972). Ellos mencionan que las carboxipeptidasas de la cebada se asemejan a la tripsina, quimiotripsina y serinoproteasas de las bacterias, por su capacidad para hidrolizar el N-sustituido de ésteres de aminoácidos.

Estos resultados de actividad específica se corroboraron en ensayo de actividad en microplaca como se muestra en la figura 13, donde observamos que todas las muestras de maltas tienen las tres actividades específicas. La malta M1 mostró mayor actividad tipo serinoproteasa (Fig. 13c), esto se corrobora con lo observado en la actividad en soporte (Fig. 12a). Para la actividad tipo cisteinil la malta D3 presento mayor actividad en comparación con la M4 que fue la que presentó menor actividad de ese tipo (Fig 13a). Por último, para

el caso de la actividad específica tipo carboxipeptidasa las maltas D2 y D3 presentaron mayor actividad y de nuevo la M4 fue la que presentó menor actividad (Fig. 13b).

Posteriormente, fue realizada una purificación parcial en cromatografía de intercambio catiónico de las proteínas de la malta empleando la metodología de Zhang y Jones (1996) con algunas modificaciones, para esto primero se tomaron las fracciones de 1 mL de cada muestra, fueron cuantificadas mediante nanodrop para determinar su concentración de proteína soluble total (Fig. 14).

A las fracciones se les determinó la actividad de proteasa total en microplaca empleando azocaseína al 1% como sustrato, fueron seleccionadas las fracciones que dieron mayor actividad de proteasa total y se evaluaron con los sustratos sintéticos específicos para cada tipo de proteasa (Fig. 15). Con la malta D3 logramos obtener el 93% de actividad tipo cisteinilproteasa, mientras que con la M3 solo un 64%. Esta fracción fue corrida en un zimograma de 2D copolimerizado con gelatina al 0.2% en condición reductora y solo se detectó un spot con actividad proteolítica (Fig. 16c), estos resultados concuerdan con los que observamos en la figura 8 cuando a esa malta la estimulamos con GA. La cual corresponde a lo reportado por Koehler y Ho (1988).

Otro punto de vital importancia para la industria cervecera es que las enzimas presentes en las maltas sean termoestables en el proceso de elaboración de cerveza. Dichas enzimas hidrolíticas llevan a cabo el proceso de degradación de las proteínas de reserva; sin embargo, no es deseable que se degraden todas las proteínas de la cebada debido a que estas son las responsables de producir y dar la estabilidad de la espuma en la cerveza como producto final (Gupta *et al.* 2010).

Para el caso de la determinación de la actividad amilácea empleamos las maltas D1, D2, D3 y MC (malta comercial empleada como control). Y observamos que todas las maltas tienen su mayor actividad a 60 °C, a 80 °C su actividad residual se reduce hasta el 20% en D1, 50% en D2, en D3 y MC hasta el 30% (Fig. 17). Esto se corroboró en zimogramas de almidón de papa al 0.2% como sustrato y observamos que la malta D2 incubada a pH 5.0 muestra actividad a 80 °C y una ligera actividad a 100 °C (Fig. 17d). Estos resultados se asemejan a lo reportado por Evans y cols. (2003), ellos encontraron una β -amilasa de cebada malteada termoestable la cual tiene un gran efecto sobre la fermentabilidad del mosto, otra característica importante de esta enzima es que se acumula durante el desarrollo de la semilla y produce aproximadamente el 55% de maltosa (azúcar fermentable).

Con respecto a la termoestabilidad de las enzimas proteolíticas empleamos las maltas M1, M3, M4 y D3. Todas las maltas mostraron diferente actividad a las temperaturas evaluadas teniendo sus máximas actividades a altas temperaturas. Las maltas M1, M3 y M4 incubadas a pH 5.0 muestran su mayor actividad a 70 °C, mientras que a pH 7.0 la malta M1 su mayor actividad es a 90 °C, las maltas M3, M4 y D3 su mayor actividad es a 100 °C (Fig. 18), esto significa que las maltas tienen proteasas termoestables en un rango de pH de 5.0 a 9.0. Estos resultados se asemejan mucho a lo reportado por Rizvi y cols. (2011), ellos evaluaron dos líneas de maltas canadienses y observaron que las proteasas de estas variedades eran activas a 70 y 90 °C.

Hay muy pocos reportes que indican la presencia de termoestabilidad en las proteasas después de la germinación (Gupta *et al.* 2010). Jones y cols. (2000) mencionan que durante el secado del grano de cebada hay una desnaturalización parcial de las proteasas. Por lo tanto, nuestro trabajo será pionero en demostrar que las proteasas de la malta son activas a temperaturas altas (70-100 °C).

Para relacionar las hidrolasas provenientes de la malta con la calidad del mosto, se prepararon mostos 100% de cebada malteada (Iimure *et al.* 2012) (Fig. 19). La concentración de proteína total soluble fue medida en cada etapa de la maceración (Fig. 20) con el fin de estudiar cambios en el contenido de proteínas presentes durante el proceso.

Los resultados (Fig. 20) muestran que en el mosto D1 no hubo disminución en el contenido de proteínas durante todo el proceso de maceración en comparación con los otros mostos que si disminuyó el 50% de su contenido de proteínas. Steiner y cols. (2011) mencionan que en mostos con 100% de cebada, se pueden encontrar más compuestos proteicos disueltos prevaleciendo incluso en la cerveza. Además, estos compuestos pueden tener una influencia positiva en importantes características, tales como: cuerpo, sensación en la boca, la estabilidad y formación de la espuma.

Otro parámetro analizado fue el amino nitrógeno libre (FAN) importante para el crecimiento de la levadura. El mosto D1 obtuvo un valor más alto 327 mg/ L en comparación con el mosto D2 (244 mg/ L) y el mosto D3 (262 mg/ L), el cual fue similar al valor obtenido con el mosto de malta comercial (269 mg/ L) (Tabla 2). Estos resultados coinciden con las bandas de actividad proteolítica de alto peso molecular encontradas mediante zimogramas en la malta D1.

Los valores FAN deben estar en los niveles adecuados para asegurar la disponibilidad de nutrientes nitrogenados a la levadura y no afectar el proceso de

fermentación (Briggs *et al.* 2004). Los niveles bajos de FAN dan una baja propagación de la levadura, un mal desempeño de la fermentación y se generan subproductos no deseados (diacetilo, compuestos de azufre, etc.). Sin embargo, una muy alta concentración de FAN puede provocar reacciones no deseadas a través de la reacción de Maillard que tienden a producir colores altos en la cerveza (Steiner *et al.* 2011). Hay muy pocos estudios de suplementación con proteasas durante la maceración del mosto como una forma de mejorar el nivel de FAN en la elaboración de cerveza (Alvarez *et al.* 2010; Piddocke *et al.* 2011). Con nuestros resultados demostramos que estas maltas son capaces de dar el nivel óptimo de FAN para obtener una buena fermentación.

Otro parámetro evaluado fue el color en donde el mosto D2 mostró un color más oscuro de 25.5 ± 0.21 en comparación con los otros mostos D1 (20.8 ± 0.57), D3 (20.9 ± 0.14) y mosto control (8.4) (Tabla 2). Guzmán-Ortiz y cols. (2018), reportaron resultados similares con mostos 100% cebada malteada, los cuales presentaron un color tipo melano (16.3 ± 0.19) y tipo chocolate (27.7 ± 0.79), clasificándolas como cervezas tipo Weissbier y Double IPA, respectivamente.

En cuanto al perfil de aminoácidos libres el mosto D1 mostró mayor concentración con respecto a los otros mostos. Lingzhen y cols. (2016), encontraron que la prolina y el ácido glutámico son importantes constituyentes en la formación de turbidez en la cerveza.

En cuanto a los perfiles de azúcares fermentables en los mostos evaluados observamos que se encontraban dentro de los parámetros de calidad establecidos por la Convención Europea de Cervecería, 1998, donde aproximadamente el 60% de los azúcares eran maltosa, seguida de 15-17% de maltotriosa, 12-15% de glucosa y 1.3-1.9% de fructosa (Tabla 2).

En base a estos resultados, las condiciones de cultivo no afectan significativamente el perfil de azúcares fermentables porque el mosto preparado con esta variedad produce el perfil óptimo para una buena fermentación y tiene niveles similares al mosto preparado con malta comercial. Sin embargo, el mosto D3 mostró niveles ligeramente más altos de fructosa, maltosa y maltotriosa. Hu y cols. (2013) mencionan que la composición de los azúcares fermentables en el mosto está directamente influenciada en la eficiencia de la fermentación de la levadura y como resultante la calidad de la cerveza.

Con respecto al pH en todos los mostos se observó muy similar el cual osciló entre 5.9 y 6.0 (Tabla 2). Briggs y cols. (2004) mencionan que el pH óptimo para que las enzimas estén activas en el mosto es de 5.5 y si el pH aumenta este influye en la coloración del

mosto, este resultado concuerda con los datos obtenidos con la coloración en nuestros mostos.

Otro parámetro analizado fue la viscosidad en de nuevo el mosto D1 obtuvo la mayor concentración de 1.72 cps con respecto a los otros mostos que caen dentro del parámetro normal, este parámetro está relacionado con el contenido de proteínas el cual concuerda con nuestros resultados y, además, fue el mosto tuvo un tiempo de filtración más largo en comparación con los demás (Tabla 2). Severa y cols. (2009) mencionan que la viscosidad de los mostos 100% malta se encuentran en un rango de 1.75-2.1 cps, por lo tanto, nuestros mostos tienen una viscosidad óptima.

Finalmente monitoreamos las enzimas durante el proceso de maceración mediante zimogramas para el caso de actividad de proteasas, observamos que las principales diferencias entre la malta D1 respecto a las otras maltas, son bandas de actividad presentes entre 25 y 37 kDa observadas principalmente a pH 5.0 y 7.5 (Fig. 21). Una pequeña banda de actividad de ca. 22 kDa fue observada en la etapa de maceración a 70 °C (pH 4.0), la cual está presente solo en esta malta (flecha amarilla). Otra de ca. 33 kDa (pH 7.0) que es más intensa en la malta D1 (flecha rosa). Estas dos bandas podrían estar relacionadas a los resultados descritos anteriormente.

Al analizar mediante zimogramas los patrones de actividad amilolítica, pudimos observar que los mostos preparados con la malta D1 y D2 son prácticamente iguales, sin embargo, el mosto D3 conserva la banda de actividad de aproximadamente 30 a 35 kDa a pH 6.0 (Fig. 18, cuadro verde), observada en los zimogramas de malta. Esta enzima podría estar relacionada a los niveles ligeramente más altos de algunos azúcares fermentables.

9. CONCLUSIONES

1. La actividad tipo amilasas y proteasas dependió del tipo de cebada y, en gran medida de las condiciones de cultivo.
2. De estas actividades dependerán la cantidad de aminoácidos y azúcares disponibles para la levadura durante la fermentación.
3. La malta M1 mostró mayor concentración de hordeínas del grupo B, mientras que la M2 mostró del grupo gamma las cuales están implicadas en la filtrabilidad del mosto.
4. El perfil de amilasas de la malta D1 mostró una banda de actividad similar a la α -amilasa AMY-2 de ca. 16-20 kDa a pH 5.0. La malta D3 mostró una banda de actividad similar a una β -glucanasa de ca. 30 kDa a pH 6.0, relacionada a una buena calidad en la malta y esta actividad se conserva durante las diferentes etapas de maceración del mosto.
5. Por otro lado, las maltas M1 y D1 muestran una proteasa de 150 kDa similar a una metaloproteinasa reportada relacionada con el KI y FAN.
6. La malta D1 presenta niveles superiores de FAN, sin embargo, contiene una mayor cantidad del aminoácido prolina relacionado con la presencia de turbidez en la cerveza. Este resultado se relaciona también con la presencia de mayor actividad proteolítica alcalina.
7. La malta D3 muestra mayor actividad de actividad proteolítica ácida, lo cual se relaciona con un óptimo nivel de FAN y perfil de aminoácidos. Además, presenta una banda tipo tiolproteasa EP-A muy prominente ca. 37-40 kDa inducida con ácido giberélico y parcialmente purificada por cromatografía de intercambio catiónico, principal enzima de digestión de las hordeínas.
8. Los resultados de este estudio muestran que las maltas D1, D2 y D3 presentan buenas características para su uso en la producción de cerveza, teniendo mejores características la malta D3. Además, dan un perfil óptimo de azúcares fermentables y de aminoácidos para que la levadura tenga una buena fermentación.
9. Fueron observadas ligeras pero muy importantes diferencias que se relacionan con el proceso cervecero o con la cerveza como producto final. Esto nos permitirá establecer mejores criterios de selección de maltas para el proceso, mejoramiento en el manejo y programación de preparación de mostos, reducción en los procesos de maceración y asociar la presencia de enzimas con el desempeño de la fermentación o de la cerveza final.

10. PERSPECTIVAS

La información obtenida en este estudio permitirá un mejor control de calidad en la materia prima empleada en el proceso de elaboración de cerveza.

Con el desarrollo del sistema de detección de alguna de las proteínas más importantes, podremos predecir el contenido proteico.

Este trabajo abre camino para el estudio de nuevas variedades de cebadas malteadas para optimizarlas para el uso de elaboración de cerveza.

11. LITERATURA CITADA

1. Alvarez M, Perez-Carrillo, E, Serna-Saldívar SO. 2010. Effect of decortication and protease treatment on the kinetics of liquefaction, saccharification, and ethanol production from sorghum. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **85**:1122–1129.
2. American Society of Brewing Chemists. 1999. *Methods of analysis*. 8th ed. The Society, St. Paul, MN.
3. Axcel B, Murray J. 1980. Diastatic power-its relationship to clipper malt quality. *Proceedings of the 16th Convention of the Institute of Brewing. Australia and New Zealand section*. pp. 71-80.
4. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. 1996. *Protein methods*. 2da edición. Wiley-Liss, Inc. pp. 108-142.
5. Boulton C, Quain D. 2001. *Brewing yeast and fermentation*. Oxford Blackwell Science, Cornwall, UK.
6. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72(1)**: 248-54.
7. Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R. 2004. *Brewing: science and practice*. Publishing W, editor: CRC Press, Cambridge UK.
8. Callejo GMJ. 2002. *Maltería en: Industria de cereales y derivados*. Mundiprensa 1ra edición. Madrid España.
9. Carey D, Grossman K. 2006. *Fermentation and cellar operations*. K. Ockert. Fermentation, Cellaring and Packaging Operations Master Brewers Association of the Americas. pp. 1-45.
10. Duan W, Roddick FA, Higgins VJ, Rogers PJ. 2004. A parallel analysis of H₂S and SO₂ formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **62(1)**:35-41.
11. European Brewery Convention. 1998. *Analytica–EBC*. Verlag Hans Carl Getranke Fachverlag, Nurnberg, Germany.
12. Evans DE, van Wegen B, Ma Y, Eglinton JK. 2003. The impact of the thermostability of α -amylase, β -amylase and limit dextrinase on potential wort fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **61**:210–218.
13. Fahy A, Spencer J. 1999. *Wort Production*. J. McCabe. The practical brewer wauwatosa, wisconsin: Master Brewers Association of the Americas. pp. 99-100.
14. Fang Y, Zhang X, Xue D. 2019. Genetic analysis and molecular breeding applications of malting quality QTLs in barley. *Frontiers in Genetics* **10(352)**:1-11.
15. Fasoli E, Aldini G, Regazzoni L, Kravchuk A, Citterio VA, Righetti PG. 2010. Les Maitres de l'Orge: The proteome content of your beer Mug. *Journal of Proteome Research*. **9**:5262–5269.
16. Fernández Z. October 31, 2013. *Research & production trends in Mexico*. In: AMBA.
17. Grant AP. 1995. *Liquor quality*. *Ferment*. **8**:252-255.

18. Greenwood CT, MacGregor AW. 1965. The isolation of α -amylase from barley and malted barley, and a study of the properties and action-patterns of the enzymes. *Journal of the Institute of Brewing*. **71**:405-417.
19. Grudkowska M, Lisik P, Rybka K. 2013. Two-dimensional zymography in detection of proteolytic enzymes in wheat leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*. **35**:3477-3482.
20. Guo B, Luan H, Lin S, Ly C, Zhang X, Xu R. 2016. Comparative proteomics analysis of two barley cultivars (*Hordeum vulgare L.*) with contrasting grain protein content. *Frontiers in Plant Science*. **7**:542.
21. Gupta M, Abu-Ghannam N, Gallagher E. 2010. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **9**:318-328.
22. Guzmán-Ortiz FA, Soto-Carrasquel A, López-Perea P, Román-Gutiérrez AD. 2018. Valuation and use of a new variety of barley for brewing craft beer. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*. **11**:81-95.
23. Hazelwood LA, Daran JM, Van Maris AJ, Pronk JT, Dickinson JR. 2008. The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**:2259-2266.
24. Heggart HM, Margaritis A, Pikington H, Stewart RJ, Dowhanick TM, Russell I. 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *MBAA Technical Quarterly*. **36**:383-406.
25. Herrera-Gamboa JG, López-Alvarado CB, Pérez-Ortega E, Damas-Buenrostro LC, Cabada-Amaya JC, Pereyra-Alfárez B. 2018. Proteomic analysis of two malting barleys (*Hordeum vulgare L.*) and their impact on wort quality. *Journal of Cereal Science*. **80**:150-157.
26. Hornsey I. 1999. *Elaboración de cerveza (Microbiología, Bioquímica y tecnología)*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. pp. 15-29.
27. Hu S, Yu J, Dong J, Evans DE, Liu J, Huang S, Huang S, Fan W, Yin H, Li M. 2013. Relationship between levels of diastatic power enzymes and wort sugar production from different barley cultivars during the commercial mashing process of brewing. *Starch – Stärke*. **66**:1-9.
28. Iimure T, Nankaku N, Kihara M, Yamada S, Sato K. 2012. Proteome analysis of the wort boiling process. *Food Research International*. **45**:262-271.
29. Jin Z, Mu YW, Sun JY, Li XM, Gao XL, Lu J. 2013. Proteome analysis of metabolic proteins (pI 4–7) in barley (*Hordeum vulgare*) malts and initial application in malt quality discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**:402–409.
30. Jones BL. 2001. Interactions of malt and barley (*Hordeum vulgare L.*) endoproteases with their endogenous inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**:5975-5981.
31. Jones BL, Budde AD. 2005. How various malt endoprotease classes affect wort soluble protein levels. *Journal of Cereal Science* **41**:95–106.
32. Jones BL, Marinac L. 2002. The effect of mashing on malt endoproteolytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**:858–864.

33. Jones BL, Marinac LA, Fontanini D. 2000. Quantitative study of the formation of endoproteolytic activities during malting and their stabilities to kilning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**:3898-3905.
34. Kendall NT. 1995. *Handbook of brewing/* edited by William A. Hardwick. Dekker.
35. Koehler S, Ho THD. 1988. Purification and characterization of gibberellic acid-induced cysteine endoproteases in barley aleurone layers. *Plant Physiology*. **87**:95-103.
36. Koehler S, Ho THD. 1990. A major gibberellic acid-induced barley aleurone cysteine proteinase which digests hordein. *Plant Physiology*. **94**:251-258.
37. Kramer P. 2006. "Barley, malt, and malting." *Raw Materials and Brewhouse Operations*. Vol. 1, edited by Karl Ockert. St. Paul, Minnesota, USA: Master Brewers Association of the Americas. pp. 15-16.
38. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-683.
39. Lewis MJ, Young TW. 1995. *Brewing*. London, UK: Chapman & Hall.
40. Li X, Jin Z, Gao F, Lu J, Cai G, Dong J, Yu J, Yang M. 2014. Comparative proteomic analysis of Dan'er malts produced from distinct malting processes by two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis (2D-DIGE). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **62**:93106.
41. Lingzhen Y, Yuqing H, Mei L, Chengdao L, Guoping Z. 2016. The chemical components in malt associated with haze formation in beer. *Journal of the Institute of Brewing* **122**:524-529.
42. López-Alvarado CB, Herrera-Gamboa JG, Damas-Buenrostro LC, Pérez-Ortega E, Pereyra-Alfárez B. 2016. Evaluation of protease activity from two brewing malts. *International Biotechnology Color Journal* **4**:23-29.
43. Mikola J, Pietilä K. 1972. Hydrolysis of ester substrates of trypsin and Chymotrypsin by barley carboxypeptidase. *Phytochemistry*. **11**:2977-2980.
44. Moll M, Flayeux R, Lipus G, Marc A. 1981. Biochemistry of mashing. *MBAA Technical Quarterly*. **18**:166-173.
45. Moll MM. 1995. Water. In Hardwick, W.A. (ed). *Handbook of Brewing*. Marcel Dekker. NY. pp. 133-156.
46. Moralejo-Vidal MA. 1993. Cebadas dísticas españolas (*Hordeum vulgare* L.): filogenia, bioquímica y aplicación potencial en programas de mejora. Tesis Doctoral, Universitat Politecnica de Catalunya.
47. Munroe JH. 1995. Fermentation: Hardwick WA (2nd edition) *Handbook of brewing*. 1st Edition Marcel Dekkar, New York. pp. 323-353.
48. NMX-FF-043-SCFI-2003. Norma Mexicana. Productos Alimenticios no Industrializados para consumo humano-cereal-cebada maltera (*Hordeum vulgare* y *Hordeum distichum*). Especificaciones y métodos de prueba.
49. Oliveira HM, Pinheiro AQ, Fonseca AJM, Cabrita ARJ, Maia MRG. 2019. Flexible and expeditious assay for quantitative monitoring of alpha-amylase and amyloglucosidase activities, *MethodsX*. **6**:246-258.

50. Østergaard O, Finnie C, Laugesen S, Roepstorff P, Svendsen B. 2004. Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (pl 4-7). *Proteomics*. **4**:2437-47.
51. Ouda SA, Gaballah MS. 2007. Effect of using stabilizing agents on increasing yield and water use efficiency in barley grown under water stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **1(4)**:571–577.
52. Padmakar B, Madhavalatha P, Ramakrishna V. 2005. Purification of alkaline protease from cotyledons of germinating Indian bean (*Dolichostylis L. var. lignosus*) seeds. *Biotechnology*. **4(4)**:365-369.
53. Picariello G, Bonomi F, Lametti S, Rasmussen P, Pepe C, Lilla S, Ferranti P. 2011. Proteomic and peptidomic characterisation of beer: Immunological and technological implications. *Food Chemistry*. **124**:1718–1726.
54. Pidocke MP, Fazio A, Vongsangnak W, Wong ML, Heldt-Hansen HP, Workman C, Nielsen J, Olsson L. 2011. Revealing the beneficial effect of protease supplementation to high gravity beer fermentations using “-omics” techniques. *Microbial Cell Factories* **10**:1–27.
55. Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho, RT, Alves, CR. 2007. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. *Veterinary Parasitology*. **145**:326–331.
56. Rizvi SMH, Beattie AD, Rosnagel B, Scoles G. 2011. Thermostability of barley malt proteases in western canadian two-row malting barley. *Cereal Chemistry*. **88**:609-613.
57. Robert X, Gottschalk TE, Haser R, Svendsen B, Aghajari N. 2002. Expression, purification and preliminary crystallographic studies of α -amylase isozyme1 from barley seeds. *Acta Crystallographica*. **D58**:683–686.
58. Schildbach R. 1999. Malting barley worldwide. Proceedings 27th European Brewery Convention Congress, Cannes, in press. pp. 299-312.
59. Schmitt MR, Marinac L. 2008. Beta-amylase degradation by serine endoproteinases from green barley malt. *Journal of Cereal Science*. **47**:480-488.
60. Secades P, Guijarro JA. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:3969–3975.
61. Severa L, Los J, Nedomová Š, Buchar J. 2009. On the rheological profile of malt wort during processing of substrate for lager beer. *Journal of Food Physics*. **22**:5–16.
62. Sidor L. 2006. Hops and Preparation of Hops. Ockert, K. (Ed.). *MBAA Practical Handbook for the Specialty Brewers (Vol.1)*. St Paul, Minnesota, USA: Master Brewers Association of the Americas. pp. 73-74.
63. Siebert KJ. 2009. Haze in beverages. *Advances in Food and Nutrition Research*. **57**:53-86
64. Smith DB, Lister PR. 1983. Gel-forming proteins in barley grain and their relationships with malting quality. *Journal of Cereal Science*. **1**:229-239.
65. Steiner E, Auer A, Becker T, Gastl M. 2011. Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **92**:803–813.

66. Takashi M, Tsuyoshi T, Hiroaki S, Naoki A, Hiroyuki K, Kanako K, Ari K, Kozue K, Mayu Y, Hiroshi I, Nobuyuki F, Kiyosumi H, Takeshi I, Kazuhiro S. 2011. Genome analysis comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries1[W][OA]. *Plant Physiology*. **156**:20-28.
67. Uno-Okamura K, Kouichi S, Kazuyuki W, Seiichiro K, Takayuki H. 2004. Purification and properties of apoplastic amylase from oat (*Avena sativa*) seedlings. *Plant Physiology* **121**:117-123.
68. Van den Berg R, Muts GC, Drost BW, Graveland A. 1981. Proteins from barley to wort. Proceedings 18th European Brewery Convention Congress Copenhagen (DK). **47**:461-469.
69. Vinokurov KS, Oppert B, Elpidina EN. 2005. An overlap technique for post electrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. *Analytical Biochemistry*. **337**:164-166.
70. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. **9**:244–52.
71. Wrobel R, Jones BL. 1992. Electrophoretic study of substrate and pH dependence of endoproteolytic enzymes in green malt. *Journal of the Institute of Brewing*. **98**:471-478.
72. Yin C, Zhang GP, Wang JM, Chen JX. 2002. Variation of beta-amylase activity in barley as affected by cultivar and environment and its relation to protein content and grain weight. *Journal of Cereal Science*. **36**:307-312.
73. Zhang N, Jones BL. 1996. Purification and partial characterization of a 31-kDa cysteine endopeptidase from germinated barley. *Planta*. **199**:565-572.
74. Zheng X, D'Amore T, Russell I, Stewart GG. 1994. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **52**:41–47.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Claudia Berenice López Alvarado

Candidato para el Grado de
Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: DETECCIÓN Y SELECCIÓN DE PROTEÍNAS COMO MARCADORES DE CALIDAD EN EL PROCESO CERVECERO

Campo de estudio: Microbiología industrial y Proteómica

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 11 de octubre de 1983, hija de Refugio López García y Blanca Lilia Alvarado Monsiváis.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009 y Maestría en ciencias con especialidad en Microbiología en 2014.

Experiencia Profesional: Profesor de asignatura de la unidad de aprendizaje de Microbiología general, Microbiología de alimentos, Inocuidad alimentaria, Análisis sanitario de alimentos y Química inorgánica en la Facultad de Agronomía desde 2017.

Submission no: **YJCRS_2019_777**

Submission title: EFFECTS OF THE CULTIVATION CONDITIONS ON THE PRODUCTION OF HYDROLASES IN TWO BREWING MALTS

Corresponding author: Dr Benito Pereyra-Alfárez

Listed co-author(s): Dr Claudia Lopez, Dr Jessica Giselle Herrera-Gamboa, Ms Esmeralda Pérez-Ortega, Dr Luis Cástulo Damas-Buenrostro

Dr Pereyra-Alfárez **has submitted a manuscript to Journal of Cereal Science** and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/YJCRS?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach07335210%23%2FYJCRS%2Fsubmission%2FYJCRS_2019_777

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Journal of Cereal Science

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evise.com/co-author/#/YJCRS/unsubscribe/clopez1983@hotmail.com/ptWxQC5DOPQw1axR0isexGeS2qVA0dJn0LqHtpcj5QrfIIW-ozIIA53cFoLC_u9ouRRUaE2VrAIMZisZGpoyA

Evaluation of Protease Activity from Two Brewing Malts

Claudia Berenice López-Alvarado ¹, Jessica Giselle Herrera-Gamboa ¹, Luis Cástulo Damas-Buenrostro ², Esmeralda Pérez-Ortega ², and Benito Pereyra-Alfárez ^{1,†}*

¹ Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, NL. 66455. México.

² Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma. Ave. Alfonso Reyes 2202 Nte. Col. Bella Vista. Monterrey, NL. 64442. México.

†email: bpereyra@gmail.com benito.pereyraal@uanl.edu.mx

Received: May 12th, 2016 Accepted: June 20th, 2016. Chief Editor: *Juán J. Zúñiga Aguilar*

corresponding author's personal copy

ABSTRACT

Journal of Cereal Science 80 (2018) 150–157



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cereal Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcs



Proteomic analysis of two malting barleys (*Hordeum vulgare* L.) and their impact on wort quality



Jessica Giselle Herrera-Gamboa ^a, Claudia Berenice López-Alvarado ^a,
Esmeralda Pérez-Ortega ^b, Luis Cástulo Damas-Buenrostro ^b, Juan Carlos Cabada-Amaya ^b,
Benito Pereyra-Alfárez ^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, CP 66450, Mexico

^b Laboratorio de Investigación y Desarrollo, Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma S. A. de C. V. Alfonso Reyes Norte Col, Bella Vista, 2202 Monterrey, Nuevo León, Mexico