



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1	RESUMEN/ABSTRACT	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	Concepto, estructura y funcionamiento	2
2.1.1	Concepto	2
2.1.2	Estructura	2
2.1.3	Mecanismos de activación.....	3
2.1.4	Mecanismos de inhibición enzimática.	6
2.2	Historia del uso de las enzimas.	7
2.3	Importancia de las enzimas en la industria de las bebidas.	9
2.4	Clasificación de las enzimas en la industria alimentaria.	9
2.4.1	Clasificación y características de las enzimas en la industria de las bebidas.	10
2.5	Enzimas en la industria de la cerveza.	12
2.5.1	Concepto y producción.	12
2.5.2	Cebada como materia prima.	13
2.5.3	Enzimas comerciales	14
2.6	Cerveza libre de gluten	14
2.6.1	Concepto, sintomatología e incidencia de la enfermedad de la celiaquía.....	14
2.6.2	Legislación de alimentos libres de gluten	14
2.6.3	Composición y estructura del gluten	15
2.6.4	Evolución de la producción de alimentos y cerveza sin gluten	15
2.7	Cerveza “light”	16
3	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	17
4	METODOLOGÍA	18
4.1	Fuentes bibliográficas consultadas.....	18
4.2	Metodología de búsqueda bibliográfica	18
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1	Proceso de elaboración de la cerveza.....	20
5.1.1	Malteado	22
5.1.2	Maceración	25
5.1.3	Mosto	28
5.1.4	Fermentación.....	28
5.1.5	Maduración	29
5.1.6	Acabado.....	30

5.1.7	Enzimas comerciales	30
5.2	Cerveza libre de gluten	32
5.2.1	Evolución del contenido de gluten en el proceso tradicional de elaboración de la cerveza 32	
5.2.2	Técnicas para la elaboración de una cerveza libre de gluten	33
5.3	Cerveza “Light”	35
5.3.1	Glucoamilasa	35
5.3.2	Pululanasa	36
6	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	36
7	VALORACIÓN PERSONAL	37
8	BIBLIOGRAFÍA.....	38

1 RESUMEN

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica que contienen de forma natural los organismos vivos, acelerando de forma selectiva las reacciones bioquímicas necesarias para su mantenimiento vital. Su papel en el sector alimentario es esencial desde hace siglos para la obtención de productos tan básicos como el queso, el vino o el pan. Con el paso del tiempo, su utilización a nivel industrial se ha ido mejorando para optimizar muchos procesos de fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envase, transporte o almacenamiento de los alimentos. La investigación y desarrollo en todos los aspectos de la tecnología enzimática se está desarrollando también con la finalidad de obtener nuevas aplicaciones que permitan un avance tecnológico en los procesos del sector alimentario.

La revisión bibliográfica llevada a cabo en este TFG tiene como objetivo conocer el estado del arte y profundizar en el conocimiento del uso de las enzimas a nivel alimentario, y más concretamente en el sector de las bebidas. En este trabajo se explica de una forma global el concepto, funcionamiento y estructura de las enzimas, y su importancia a lo largo de la historia hasta la actualidad. A lo largo de la memoria, dentro del sector de las bebidas, se ha hecho hincapié en el proceso de fabricación de la cerveza, y cómo estas intervienen en el desarrollo de nuevas propuestas tecnológicas como son el desarrollo de la cerveza sin calorías, o la cerveza sin gluten, como ejemplos actuales.

Para la elaboración de este trabajo se han consultado, además de libros de texto y monografías específicas del tema, bases de datos de artículos científicos, como son *Science Direct*, *SCOPUS* y *Web Of Science*.

ABSTRACT

Enzymes are proteinic nature catalysts that are naturally contained in living organisms, selectively accelerating the biochemical reactions necessary for their vital maintenance. Their role in the food sector has been essential for centuries to obtain such basic products as cheese, wine or bread. Over time, its use at an industrial level has been improved to optimize many processes of manufacturing, transformation, preparation, treatment, packaging, transport or storage of foodstuffs. Research and development in all aspects of enzyme technology is also being developed with the aim of obtaining new applications that will allow technological advances in the processes of the food sector.

The bibliographic review carried out in this TFG aims to know the state of the art and to deepen the knowledge of the use of enzymes at a food level, and more specifically in the beverage sector. This work explains in a global way the concept, functioning and structure of

enzymes, and their importance throughout history until nowadays. Throughout the report, within the beverages sector, the emphasis has been placed on the process of manufacturing beer, and how these intervene in the development of new technological proposals such as calorie-free beer, or gluten-free beer, as current examples.

For the elaboration of this work, in addition to text books and specific monographs on the subject, databases of scientific articles have been consulted, such as *Science Direct*, *SCOPUS* and *Web Of Science*.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Concepto, estructura y funcionamiento

2.1.1 Concepto

Según la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, las enzimas son proteínas que catalizan, acelerando selectivamente las reacciones bioquímicas que ocurren de manera natural en todos los organismos. Se utilizan en la industria alimentaria con un fin tecnológico en muchas de las fases de fabricación, transformación, preparación, tratamiento, envase, transporte o almacenamiento de los alimentos (AECOSAN, 2019).

El uso de las enzimas prácticamente elimina la obtención de subproductos indeseados, ahorrando además mucha energía, lo que supone menores costes de fabricación y una menor emisión de gases de efecto invernadero. Esto es debido a su alta selectividad y a que requieren condiciones de temperatura, presión y pH más suaves que los procesos químicos convencionales. Además, son compuestos biodegradables y ecológicos. Su actividad depende de las condiciones del proceso, lo que facilita su control. Las enzimas después de su uso pueden ser inactivadas fácilmente cambiando el pH y/o la temperatura, por lo que su eliminación se realiza de forma segura (Enderle, 2012).

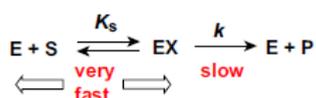
2.1.2 Estructura

Las enzimas son proteínas globulares formadas por largas cadenas de aminoácidos. Cada secuencia individual de aminoácidos crea una única estructura que determinará la especificidad de la enzima y que le atribuirá propiedades concretas. La estructura proteica de las enzimas está condicionada por factores (reguladores), principalmente la temperatura, el pH y la presencia de agente químicos, los cuales pueden provocar cambios de conformación estructural de la proteína (Choudhury y Kumar, 2020). Para llevar a cabo su función, algunas enzimas, denominadas apoenzimas, necesitan la presencia adicional de un grupo no proteínico para que sean activas. A este grupo se le conoce como cofactor. Los cofactores pueden ser de

carácter inorgánico, como algunos cationes metálicos (e.g. Zn^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , K^+ o Na^+), o bien orgánicos, constituidos a partir de una molécula más compleja como son el NAD, FAD, CoA, o algunas vitaminas. La función del cofactor es complementar la estructura tridimensional del complejo “proteína-sustrato”, para maximizar la interacción entre ellos. La unión de la apoenzima con el cofactor, forma lo que se denomina la holoenzima, que es la estructura realmente activa y selectiva (Engelking, 2015).

1.1.1. Mecanismo de activación

El enzima se une de forma específica al sustrato (Esquema 2.1). La unión del sustrato (S) a la enzima (E) forma un complejo intermedio, denominado enzima-sustrato (EX). Según la hipótesis de Michaelis-Menten, (Michaelis and Menten, 1913), esta primera etapa de la reacción ocurre de forma muy rápida y es reversible, siendo K_s la constante de equilibrio de esta reacción.



Esquema 2.1. Mecanismo de activación enzimático. (Daniel-Purich, 2010).

En la segunda etapa, la transición irreversible del complejo EX forma el producto P y recupera el estado inicial de la enzima, E, dejándola lista para el siguiente ciclo de reacción. Esta segunda etapa es mucho más lenta y por tanto es la etapa controlante del proceso global. La constante cinética de esta segunda reacción, k , determina la velocidad máxima de reacción (Engelking, 2015).

Unión sustrato - enzima

- **Modelo de la llave y de la cerradura:** Las enzimas para llevar a cabo la reacción se unen de forma específica al sustrato. Para explicar este fenómeno, H. E. Fischer estableció el modelo llave-cerradura en el cual asemejaba la especificidad de la enzima a la de una llave que sólo es capaz de abrir una cerradura, como se observa en la figura 2.1. Esto implica que cada enzima es específica para unirse a un sustrato, y que esta especificidad dependerá de la propia estructura individual de cada enzima (Daniel-Purich, 2010). El sustrato se une a un sitio concreto del enzima denominado sitio activo, el cual permite dicha unión para que tenga lugar un ajuste perfecto y se pueda llevar a cabo la reacción formándose el complejo enzima sustrato (Choudhury y Kumar, 2020).

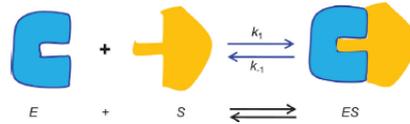


Figura 2.1 Unión de la enzima al sustrato por el modelo de la llave y de la cerradura para formar el complejo enzima sustrato (Shijie, 2020)

- **Ajuste inducido:** Este modelo fue planteado por Koshland (1995) que considera que el sitio activo al que se une la enzima no es rígido, de forma que puede amoldarse al sustrato hasta que la unión quede completamente ajustada. Esto provoca que las cadenas laterales de los aminoácidos que componen el sitio activo se adapten a este, para que la enzima pueda realizar su función catalítica de forma selectiva

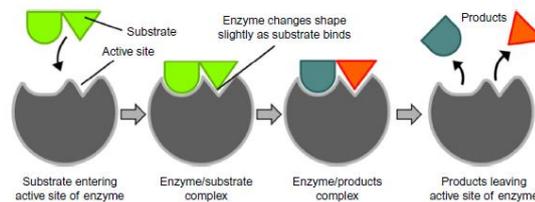


Figura 2.2. Unión enzima-sustrato por el método de ajuste inducido (Yu-Muzin, y Salmi, 2016).

Esto implicaría que las enzimas tienen estructuras flexibles y que el sitio activo es continuamente remodelado por interacciones con el sustrato, causando cambios en la estructura tridimensional de este (figura 2.2). La propuesta de este modelo implicó una mayor flexibilidad en la unión enzima sustrato y una mejor explicación del aumento de la velocidad de reacción (Shijie, 2020).

Cinética enzimática

El mecanismo por el que las enzimas, al igual que el resto de catalizadores, aceleran la velocidad de reacción, implica seguir un camino de reacción (i.e. secuencia de reacciones) con una menor energía de activación que el del proceso no catalizado. La energía de activación es la barrera de energía que hay entre el sustrato y el producto, y que se debe superar para que ocurra la reacción. En cualquier caso, la enzima no modifica la entalpía de reacción, ni la constante de equilibrio, manteniéndose inalteradas al final de la reacción (Papamichael, et al 2019).

La velocidad de reacción depende de las condiciones de operación, principalmente de la concentración de sustrato y de enzima, de la temperatura y del pH. A partir de la hipótesis de Michaelis-Menten, Esquema 2.1, se deduce la relación entre estas variables, expresada en la ecuación 2.1. A esta misma expresión se llega a partir de la hipótesis de estado pseudo-

estacionario, planteada por Briggs y Haldane en 1925. En este caso, se considera que la concentración de sustrato es mayor que la concentración de la enzima, y que la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y aproximadamente constante. En ambos casos se deduce que la velocidad de reacción viene dada por la siguiente expresión:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación 2.1. Modelo cinético de Michaelis-Menten/Briggs-Haldane.

En esta ecuación el término V es la velocidad de reacción, cuyas unidades en el S.I. son ($\text{mol}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$), $[S]$ es la concentración de sustrato, mol/m^3 , K_m es la denominada constante de Michaelis-Menten, mol/m^3 ; y V_{max} es la velocidad máxima de reacción, $\text{mol}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$. La constante de Michaelis-Menten, mide, de forma inversa, la afinidad entre la enzima y el sustrato, de manera que cuanto mayor es K_m , menor es la afinidad y, por tanto, menor es la velocidad de reacción. A partir de la ecuación 2.1 se deduce que cuando la concentración de sustrato es igual a K_m , la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} (Berk, 2018). El valor de V_{max} viene dado por la expresión: $V_{max} = k [E_T]$, donde $[E_T]$ es la concentración de enzima y k es la constante cinética, que varía con el pH y la temperatura de reacción (Engelking, 2015). La representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (velocidad de reacción frente a concentración de sustrato) es una hipérbola, tal como se indica en la Figura 2.3. El valor asintótico de la velocidad corresponde a V_{max} , que corresponde al punto de saturación de la enzima con el sustrato (Palmer y Philip-Bonner, 2007)

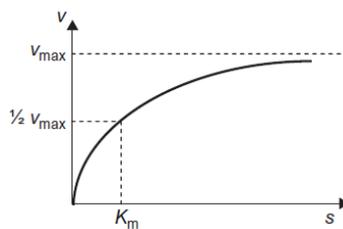


Figura 2.3. Evolución de la velocidad de reacción con la concentración de sustrato (Berk, 2018)

- **Efecto de la temperatura:** La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas aumenta con la temperatura, esto se debe a que un incremento de la temperatura aumenta el movimiento de las moléculas de las enzimas y de los sustratos aumentando la probabilidad de que se produzcan colisiones entre ellas y por tanto su unión. Sin embargo, a partir de un cierto valor de temperatura, las enzimas se desnaturalizan y su actividad disminuye ocasionando un cambio en la estructura de la molécula, modificando el sitio activo (figura 2.4). En esta gráfica, se observa la

presencia de un máximo que corresponde a la temperatura a la cual la actividad de la enzima es máxima y se denomina temperatura óptima y que es característica de cada enzima. La mayoría de las enzimas son desnaturalizadas a temperaturas superiores de 75°C, aunque la extracción de enzimas a partir de microorganismos ha permitido aumentar la termoestabilidad. La parte ascendente de la curva se conoce como zona de activación (Berk, 2018; Daniel y Danson 2013). A partir de la temperatura máxima (zona de desactivación), el aumento de temperatura causa una caída drástica de la velocidad de reacción debido a la desactivación causada por la desnaturalización de la proteína enzimática.

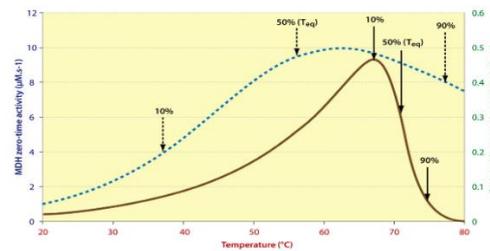


Figura 2.4 Evolución de la actividad enzimática con la temperatura (Daniel y Danson 2013)

- **Efecto del pH:** El efecto del pH en la actividad enzimática es consecuencia de la presencia simultánea del grupo carboxílico ácido (-COOH) y del grupo amino (-NH₃). El grado de ionización de ambos grupos depende del pH. La conformación de la proteína enzimática depende fuertemente de la carga eléctrica y por tanto hay un pH en el que dicha conformación es la óptima para maximizar su actividad. Este pH óptimo suele estar entre 5-9. En definitiva, el valor del pH condiciona la velocidad de reacción, V_{max} , la constante K_m y también la estabilidad de la enzima (Shijie, 2020).

2.1.3 Mecanismos de inhibición enzimática.

La cinética de activación está influenciada también por la presencia de inhibidores, los cuales son componentes que disminuyen la eficiencia de la enzima. Los inhibidores se pueden dividir en dos grupos en base del tipo de interacciones que se producen entre la enzima y el inhibidor, pudiendo ser irreversibles y reversibles (Yu-Muzin, y Salmi ,2016).

- **Inhibición enzimática irreversible:** Se produce cuando el inhibidor se une al sitio activo de la enzima de forma que cuando este se separa de la enzima ha cambiado su estructura y deja de ser activa. Se denominan inhibidores irreversibles o covalentes porque se unen al centro activo mediante enlaces covalentes (Gail-Clarke, 2013).
- **Inhibición enzimática reversible:** En este caso cuando el inhibidor se separa de la enzima esta recupera su actividad. Dentro de la inhibición reversible hay dos tipos:

- **Inhibición competitiva:** El inhibidor tiene una estructura muy similar a la del sustrato de manera que compite con el sustrato por la enzima, es decir, solo uno de los dos puede estar unido a la enzima en un momento dado. Las moléculas del inhibidor que se unen al centro activo no son convertidas a producto, disminuyendo su actividad. Para evitar su efecto, una solución es aumentar la concentración del sustrato para desplazar al inhibidor. Tal y como se observa en la Figura 2.5, si la concentración de sustrato es lo suficientemente elevada, se puede alcanzar la velocidad máxima pero para valores mayores de la $[S]$. Este aumento de concentración de sustrato produce un aumento de la K_m efectiva (Enderle, 2012).
- **Inhibición no competitiva:** En este caso el inhibidor se une a un lugar diferente de la enzima al que lo hace el sustrato, provocando una modificación en la enzima, efecto alostérico, bloqueando la unión del sustrato al centro activo. El inhibidor se puede unir a la enzima al mismo tiempo que el sustrato formando un complejo enzima-sustrato-inhibidor. De este modo, la reacción no podrá alcanzar la velocidad máxima aunque haya una concentración elevada de sustrato, puesto que habrá parte de las enzimas que estarán afectadas por el inhibidor y que, por tanto, serán inactivas. La V_{max} disminuye y para la misma K_m , la $\frac{1}{2}$ de V_{max} es inferior que en ausencia de inhibidor (Figura 2.6). Por mucho que aumente la concentración de sustrato no se puede recuperar la V_{max} . Es la diferencia entre competitiva y no competitiva (Gail-Clarke, 2013).

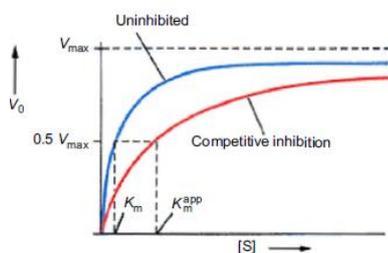


Figura 2.5. Efecto de la inhibición competitiva

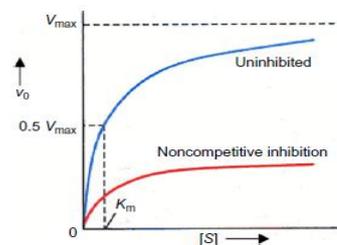


Figura 2.6 Efecto de la inhibición no competitiva

(Yu-Muzin, y Salmi ,2016).

2.2 Historia del uso de las enzimas.

El uso de las enzimas se remonta al año 2.000 a.C., donde ya se utilizaban para la elaboración de productos como el queso, el pan y bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino. Ya se hacía referencia a su uso en textos de Babilonia, Egipto, China e India (Del Moral, Ramirez- Coutiño, García-Gome.,2015).

Los estudios de Lavoiser (1743-1794) fueron claves para determinar que, durante la fermentación alcohólica, la escisión del azúcar en alcohol y dióxido de carbono era llevada a

cabo por una entidad que mantenía la cantidad total de materia a lo largo del proceso y no sufría cambio alguno al añadir la levadura. Posteriormente, Leeuwenhoek descubrió la existencia de células en el fermento. Fue Gay Lussac (1778-1850) el que estableció la estequiometría del proceso, en el que a partir de una molécula de glucosa se obtenían dos moléculas de dióxido de carbono y dos de etanol. En 1837, Schwann, demostró que los organismos responsables de la fermentación eran organismos vivos que actuarían como auténticos reactivos químicos, llevándole a concluir que la levadura era el agente responsable de la fermentación. Este hallazgo fue corroborado por Pasteur en 1872, el cual demostró que la fermentación era correlativa con el desarrollo y multiplicación de la levadura, la cual actúa como un catalizador en el proceso (Aragón, 2009).

Con respecto a la tecnología enzimática en el campo de la alimentación, en el año 1874 Hansen obtuvo la proteína *renina* a partir del estómago de las cabras para la producción del queso (Yoo et al., 2017). Khüne, en 1876 utilizó por primera vez la palabra “enzima”. En el año 1890, Fisher propuso el modelo de la llave y la cerradura ya comentado en la introducción en el apartado 2.1.3. Fue en 1893 cuando Oswald introdujo la definición de catalizador, lo cual supuso un gran avance al establecer su capacidad para aumentar la velocidad de las reacciones (Choudhury y Kumar, 2020). En 1897 Buchner demostró que los estudios de Pasteur sobre la necesidad de la presencia de células vivas para que tenga lugar la fermentación eran erróneos. Fue uno de los descubrimientos más relevantes en el campo de la tecnología enzimática, en el cual supuso que la fermentación alcohólica podía ser llevada a cabo por un extracto de levadura, de esta forma demostró que la fermentación era el resultado de la actividad de un complejo enzimático, que él llamó “zimasa”(Aragón, 2009). Finalmente, en 1926 Summer identificó a las enzimas como proteínas (Yoo et al., 2017).

Desde entonces, se han llevado a cabo grandes avances en la tecnología enzimática, entre ellos destaca la separación de las enzimas provenientes de microorganismos. Aunque su aislamiento es costoso, su uso repetido, su actividad y estabilidad, han permitido desarrollar procesos para su utilización. Por otro lado, a lo largo del siglo XX se desarrolló la tecnología de inmovilización de las enzimas, técnica que permite confinar o localizar a la enzima en una región definida del espacio y obtener formas insolubles, manteniendo la actividad, pudiendo ser fácilmente recuperables y reutilizables. En la actualidad, el avance de la tecnología del ADN recombinante permite obtener una producción más rápida de enzimas y nuevas variantes de las mismas. Esto ha permitido optimizar los procesos industriales, aunque se sigue investigando para conocer mejor su funcionamiento y ampliar su potencial aplicación en el sector alimentario (Yoo et al., 2017).

2.3 Importancia de las enzimas en la industria de las bebidas.

La utilización de enzimas en la industria alimentaria ha despertado un gran interés en los últimos años debido a la gran cantidad de ventajas que aportan. Se utilizan en la alimentación y en este caso, en el sector de las bebidas, con un propósito tecnológico, siendo capaces de mejorar propiedades como el color, la textura, el aroma y los valores nutritivos entre otros, mejorando así la calidad del producto (Singh,2018).

Se ha estimado que en el 2020 el mercado mundial de las enzimas superará los 7 MM€ con una tasa de crecimiento anual del 8.2%. En concreto, en el sector alimentario alcanzará alrededor de 3 MM€ con un crecimiento anual promedio del 7.4%. Las enzimas más utilizadas fueron las proteasas, representando el 27,4% del mercado mundial. Dentro del sector alimentario la industria de las bebidas utiliza el 30% de las enzimas (Palmer y Philip-Bonner, 2007). Aunque los mayores productores de enzimas son Norteamérica (35 %) y Europa (36%), es en Asia (19%) y Latinoamérica (10%) donde la mayor parte van destinadas al sector alimentario, se estima que en pocos años estos países serán los mayores productores mundiales (Del Moral, Ramirez- Coutiño, García-Gome.,2015).

2.4 Clasificación de las enzimas en la industria alimentaria.

El “Comité de la Unión Internacional de la Bioquímica y la Biología Molecular” (IUBMB), ha establecido el sistema para clasificar a las enzimas, basado en el tipo de reacciones que catalizan, denominado “Enzyme Commission number” (EC). Las enzimas se numeran con 4 dígitos basados en la clase y subclase en las que se clasifican. Hay 6 categorías o tipos de enzimas:

1. Oxidoreductasas: Catalizan las reacciones en las que un sustrato dona uno o más electrones a un aceptador de electrones, oxidándose en el proceso (Porto de Souza-Vandenberghe et al., 2020). Estas enzimas pueden clasificarse en diferentes categorías en función del modo de reacción. Las hidrogenasas que actúan directamente sobre el sustrato primario, las oxidasas que requieren un aceptor de electrones intermediario como el H_2O_2 o el H_2O y las oxigenasas que catalizan las reacciones biológicas que implican la adición de moléculas de oxígeno. Algunas oxidoreductasas utilizadas en la industria alimentaria son la *glucosa oxidasa*, la *lipoxigenasa* o la *lacasa* (Patel, Singhanía y Pandey, 2016).

2. Transferasas: Catalizan las reacciones en las que un grupo químico (radicales de metilo, carbonilo, fósforo y nitrógeno) se transfiere de un sustrato donante a un sustrato receptor (Porto de Souza-Vandenberghe et al., 2020). Algunas transferasas utilizadas en la industria

alimentaria son la *transglutaminasa*, la *ciclodextrina*, la *glicosiltransferasa* y la *fructosiltransferasa* (Patel, Singhanía y Pandey, 2016).

3. Hidrolasas: Hidrolizan los enlaces covalentes que se encuentran comúnmente en los compuestos biológicos como los enlaces peptídicos, los enlaces glucosídicos, los enlaces de éster, los enlaces de anhídrido, los enlaces de ácido fosfórico y los enlaces de tioéster (Ravindran y Jaiswal, 2018). Son las más utilizadas en el sector alimentario y de las bebidas destacando las *amilasas*, las *pectinasas*, las *celulasas*, las *papaínas*, las *lactasas*, las *pululanastas*, las *glucanasas* y las *xilanasas* entre otras (Patel, Singhanía y Pandey, 2016).

4. Liasas: Catalizan reacciones no hidrolíticas en las que un grupo químico se elimina del sustrato (Porto de Souza-Vandenberghe et al., 2020). Compuestos como el dióxido de carbono, el agua, aldehídos como el acetaldehído y el formaldehído, aminas, piruvato, ácido ceto, etc. son algunos de los grupos que pueden añadirse o eliminarse del sustrato por medio de las liasas (Ravindran y Jaiswal, 2018). Destaca en la industria alimentaria la *α-acetolacto descarboxilasa* que se utiliza en el procesado del vino y de la cerveza (Patel, Singhanía y Pandey, 2016).

5. Isomerasas: Catalizan las reacciones de isomerización, siendo las más comunes las de racemización y las de epimerización (Ravindran y Jaiswal, 2018). Con aplicación en el sector alimentario destaca la *glucosa isomerasa* que actúa sobre el almidón (Patel, Singhanía y Pandey, 2016).

6. Ligasas o sintetetasas: Catalizan la unión de dos o más moléculas acopladas a la hidrólisis del ATP o de una molécula análoga. Son importantes en la replicación del ADN y en la síntesis de proteínas (Ravindran y Jaiswal, 2018).

1.1.2. Clasificación y características de las enzimas en la industria de las bebidas.

INDUSTRIA DE LOS ZUMOS	AMILASA	Catalizan la hidrólisis de los enlaces α 1-4 glucosídicos presentes en los polisacáridos como el almidón, para extraer dextrinas, oligosacáridos, maltosa y D-glucosa (Patel, Singhanía y Pandey, 2016). El almidón supone un problema en la filtración, aumentando la incrustación, la turbidez y pudiendo llegar a gelificar. Con su hidrólisis se mejora el rendimiento del proceso y se disminuyen los costos (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).
	GLUCOAMILASA	Al igual que las amilasas hidrolizan los enlaces α -1,4 que se encuentran en el almidón para liberar moléculas de glucosa. Estas a su vez actúan sobre los enlaces α -1,6 glucosídicos aunque a un ritmo más lento (Ravindran y Jaiswal, 2018). La actuación de estas enzimas junto con las amilasas mejora la eficacia del proceso para conseguir optimizar pasos como la filtración (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).

	XILANASA	Participan en la ruptura de los enlaces β -1,4 glucosídicos del polisacárido xilano que forma parte de la pared celular de diferentes tejidos vegetales, produciendo su hidrólisis y liberando oligosacáridos (Liu y Kokare, 2017). Su ruptura mejorará el proceso de clarificación de los zumos, pero para mayor eficacia actuará en consonancia con el resto de enzimas (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).
	LACASA	Llevan a cabo una oxidación del compuesto fenólico y reducen el oxígeno a agua. Cuando el sustrato es oxidado por una lacasa pierde un electrón generando un radical libre que puede sufrir una nueva oxidación u otras reacciones no enzimáticas (Liu y Kokare, 2017). En esta industria eliminan los compuestos fenólicos responsables del oscurecimiento de los zumos mejorando el color (Li et al., 2012).
	PECTINASA	Catalizan la degradación de las pectinas que son polisacáridos que están presentes en la mayoría de las frutas en la pared celular (Patel, Singhanía y Pandey, 2016). La presencia de pectinas podría suponer problemas en la turbidez de los zumos originando sustancias en precipitación. Estas enzimas mejoran la textura y la estabilidad de los zumos optimizando la fase de la clarificación (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019). Si actúan en presencias de enzimas como celulasas y xilanasas aumenta su eficacia (Grahame, Bryksa, Yada, 2015).
	CELULASA Y HEMICELULASA	Hidrolizan los enlaces β -1,4 glucosídicos del polisacárido de la celulosa, el cual está presente en la pared vegetal de la mayoría de los vegetales (Liu y Kokare, 2017). Participan en la degradación de otros polisacáridos como las pectinas, facilitando su extracción y disminuyendo así la viscosidad. Con ello se consigue mejorar la textura facilitando los procesos de filtración y clarificación (Patel, Singhanía y Pandey, 2016).
	NARINGINASA Y LIMONASA	La naringina se extrae de la cáscara de algunos cítricos y es un componente que produce amargor. Estas enzimas actúan sobre él y disminuyen el amargor (Li et al., 2012).
INDUSTRIA DEL TÉ	TANASA	Cataliza una reacción de hidrolización actuando sobre los ésteres carboxílicos. Eliminan los taninos del té verde, mejorando la solubilidad, reduciendo la turbidez, mejorando el aroma el sabor y el gusto (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).
	CELULASAS GLUCANASA PECTINASA	Degradan la pared celular de las hojas de té en las que aparece celulosa, pectinas y β -glucanos que dan rigidez. Su eliminación disminuye la turbidez (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).
CAFÉ	PECTINASA HEMICELULOSA CELULASA	Al hidrolizar los enlaces glucosídicos de los polisacáridos de las pectinas y de la celulosa se obtienen monómeros de glucosa que participa en la fermentación de los granos de café (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).
VINO	ANTOCIANASA	Pueden participar en la decolorización del vino, al eliminar las antocianinas que son los pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y aportan el color rojo (Uzuner y Cekmecelioglu, 2019).
	PECTINASA CELULASA HEMICELULOSA	Actúan sobre las pectinas aumentando el nivel de alcohol y facilitando la extracción de los puestos aromáticos (Malakar, Paul y Jolvis Pou, 2020). Reducen el tiempo de filtración, aumentando el volumen del mosto, mejorando la estabilización y disminuyendo la viscosidad. Optimización la clarificación y ayudando en la etapa de prensado (Grahame, Bryksa, Yada, 2015).

	β -GLUCANASA	Realizan una función parecida a las anteriores, pero actuando sobre los β -glucanos también presentes en la pared celular. Mejora la capacidad de filtración (Malakar, Paul y Jolvis Pou, 2020).
	GLUCOSA OXIDASA	Es una oxidoreductasa que cataliza la oxidación de la glucosa a peróxido de hidrógeno o D-glucono-lactona convirtiendo la glucosa en ácido glucónico (Grahame, Bryksa, Yada, 2015). Al disminuir el contenido de glucosa disminuye el de etanol, siendo muy interesante esto para la producción de vinos con menor contenido alcohólico (Ricardo Adolfo Parra Huertas, 2009).
	β -GLUCOSIDASA	Hidrolizan los enlaces glicosídicos que mantienen unidos las moléculas de los terpenos. Los terpenos son compuestos aromáticos cuya liberación mejorará el perfil del vino (Malakar, Paul y Jolvis Pou, 2020)
	α -ACETOLACTO DESCARBOXILAS A	Durante la fermentación, el α -acetolacto se convierte de forma natural en diacetilo, el cual produce un gusto desagradable desarrollando un cierto aroma a mantequilla. La etapa de maduración lo degrada en acetocina que tiene un sabor neutro. Esta enzima es capaz de degradar rápidamente los precursores de α -acetolacto en los productos secundarios disminuyendo el tiempo de maduración requerido (Parra Huertas, 2009)
INDUSTRI A LÁCTEA	LACTASA	Hidroliza el enlace glucosídico de la D-lactosa para formar D-galactosa y D-glucosa. La lactasa se utiliza para generar leche sin lactosa para aquellas personas intolerantes (Grahame, Bryksa, Yada, 2015).

2.5 Enzimas en la industria de la cerveza.

2.5.1 Concepto y producción.

Según el Real Decreto 678/2016, del 16 de diciembre, por el que se aprueba *La Norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*, la cerveza es un alimento que resulta de la fermentación de las levaduras seleccionadas del mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales. No obstante, la definición de cerveza tiene un carácter cultural. Así, en Alemania ya en 1516 se elaboró “La Ley de Pureza Bávara”, siendo la ley más antigua referida a bebidas y alimentos, considerada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) como una pieza intangible del patrimonio del mundo. En esta, se la definía como una bebida alcohólica hecha únicamente de cereales malteados, agua, lúpulo y levadura (Spier et al., 2016).

Actualmente China es el mayor productor mundial con 492 millones de hectolitros, seguido de Estados Unidos con 256 millones, Brasil con 140 millones y Alemania con 95 millones. España cuenta con una producción de 34,96 millones (Murcia, 2017).

2.5.2 Cebada como materia prima.

La cerveza es elaborada generalmente a partir de cebada. Como se observa en la Figura 2.7 del anexo 1, la cebada (*Hordeum vulgare*), que pertenece a la familia de las gramíneas *Poaceae*, está formada por una cáscara que protege la estructura, por el pericarpio que es el fruto, la testa, una capa de aleurona, el endospermo con el almidón y el embrión (Stewart, 2013).

En cuanto a sus componentes, los principales son:

Carbohidratos: Constituyen entre el 70 y el 80% del peso seco de la cebada, siendo el más abundante el almidón. El almidón es la mezcla de dos polímeros de glucosa cuya función es almacenar energía. Por un lado está formado por amilosa, que es una molécula lineal de D-glucosa que está unida por enlaces α -1,4 glucosídicos y por amilopectina que es una molécula ramificada unida por enlaces α -1,4 y α -1,6 de glucosa (Guerra et al., 2008). La razón por la que se prefiere la cebada para la elaboración de la cerveza es porque contiene enzimas con alto poder diastásico, estas son capaces de degradar el almidón mejor que otros cereales como el arroz, el sorgo y el trigo, y convertirlo en azúcares que participarán en la fermentación. Este poder diastásico es el término para describir la actividad conjunta de las enzimas endógenas de la malta, que son la α -amilasa, la β -amilasa, la *dextrinasa límite* y la α -glucosidasa, las cuales producirán glucosa, maltosa y maltotriosa (Gous y Fox, 2017). El poder diastásico está influenciado por la integridad del grano o la topografía del suelo de cultivo de la cebada (Fox et al., 2019).

Proteínas: Forman parte de la matriz de los granos de cebada y constituyen los tejidos de las células, su contenido oscila entre el 10 y el 17% de su peso seco (Guerra et al., 2008). Son hidrolizadas constituyendo una fuente de nitrógeno y alimento para las levaduras y participan en el sabor, en la formación de espuma, en el color y en la sensación en boca que se produce en la cerveza final. Sin embargo la cebada con alto nivel de proteínas, puede ocasionar una falta de estabilidad y una elevada viscosidad, dando lugar a una cerveza turbia (Vinje, Duke y Henson, 2020).

Lípidos: Su contenido es de un 3%, estos serán degradados durante el proceso por la acción de las *lipasas* y de las *lipoxigenasas*. La actuación de estas enzimas podría ser indeseable afectando al sabor y a la espuma final, sin embargo no es preocupante ya que son desnaturalizadas, debido a su inestabilidad térmica, antes de producir efectos adversos en la cerveza final (Bamforth, 2009).

Polifenoles: Se encuentran en pequeña cantidad, pero gracias a estos la cerveza tiene propiedades antioxidantes. Participan en la formación del color del mosto pero pueden formar complejos junto con las proteínas produciendo turbidez (Bamforth, 2009).

2.5.3 Enzimas comerciales

En esta revisión se describe la optimización del proceso a nivel industrial, en el que las enzimas juegan un papel importante. Aparte de las propias enzimas endógenas de la malta que intervienen en el proceso, la adición de enzimas comerciales está permitida, lo que mejora su rendimiento (Briggs et al., 2004). Aunque la producción de estas enzimas sea costosa, su aplicación ayuda a reducir el uso de agua, de materias primas y de la energía utilizada en el proceso, por lo que contribuye a reducir el impacto ambiental (van Donkelaar et al., 2016).

2.6 Cerveza libre de gluten

2.6.1 Concepto, sintomatología e incidencia de la enfermedad de la celiaquía

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica inmunomediada que afecta al intestino delgado cuando este está expuesto a una dieta con gluten. Se trata de una intolerancia hacia las proteínas del gluten provenientes del trigo, del centeno, de la cebada y probablemente de la avena. Los individuos que padecen esta enfermedad presentan una sintomatología intestinal con diarrea, malnutrición y pérdida de peso (Navalón-Ramon, Juan-García y Pinzón-Rivadeneira, 2015).

La incidencia ha aumentado en un 7.5% durante las últimas décadas (King et al., 2020). Actualmente la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es del 1,4% estando Europa a la cabeza con un 0.8%. La forma más eficaz para acabar con la sintomatología es llevar a cabo una dieta libre de gluten. Debido a que el pronóstico con respecto a esta enfermedad es que seguirá creciendo, el mercado se plantea nuevos horizontes para la creación de alimentos libres de gluten que satisfagan las necesidades de la población. Ya no solo de las personas con celiaquía sino de todas aquellas que por motivos médicos o de creencias llevan una dieta sin gluten. Otro ejemplo lo componen las personas que han sido diagnosticadas con el síndrome del intestino irritable de las que hay una incidencia cercana al 6% (Singh et al., 2018).

2.6.2 Legislación de alimentos libres de gluten

El Codex Alimentarius establece un límite definido para los alimentos libres de gluten. La *Norma relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten* define alimentos sin gluten como aquellos con un nivel de gluten que no excede los 20mg/kg en total. Sin embargo el etiquetado libre de gluten varía en su aplicación. Según la

Administración de Alimentación y Medicamentos (FDA) en EEUU el límite también está en los 20mg/kg. Sin embargo, en Australia y Nueva Zelanda los alimentos sin gluten no deben de tener ningún nivel detectable de gluten (FAO y OMS 2019). La normativa del etiquetado de alimentos en España y en Europa obliga a indicar en los alimentos envasados si contienen cereales que con gluten (trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) (AECOSAN, 2019).

2.6.3 Composición y estructura del gluten

Las proteínas del gluten están presentes en el trigo, en la cebada, en el centeno y en la avena. Se producen en el endospermo almidonado del propio grano suponiendo el 80% del total de las proteínas. Su principal función es servir de suministro de nitrógeno y aminoácidos para el germen. Poseen un contenido en glutamina del 26 al 53% y de prolina del 10 al 29%. Dentro de cada cereal las proteínas reciben un nombre distinto; en el trigo *prolaminas* y *glutelinas*, *secalinas* en el caso del centeno, *prolaminas* en la avena y *hordeínas* en la cebada. Las enzimas gastrointestinales como la *pepsina*, la *tripsina* y la *quimotripsina* son las encargadas de degradar esas proteínas de manera que en el caso de los celíacos estas proteínas son resistentes a las enzimas y provocan la intolerancia. Las estrategias de producción de alimentos sin gluten van enfocadas a la degradación de estas proteínas, en el caso de la cerveza se buscará el método enzimático para la degradación de las *hordeínas* (Scherf, Wieser y Koehler, 2018).

2.6.4 Evolución de la producción de alimentos y cerveza sin gluten

Debido a la incidencia de la enfermedad se ha observado que el porcentaje de los nuevos lanzamientos de productos sin gluten ha aumentado en un 40% en las últimas décadas. Más concretamente, en la cerveza supuso un aumento del 0.6% en 2010 al 2.1% en 2016 (Kerpes et al., 2016). Aunque la cerveza no es considerada un producto de primera necesidad, debido a su alto consumo a nivel mundial, resulta interesante considerar la idea de elaborar cerveza sin gluten.

La legislación establece que una cerveza con un contenido en gluten de 19 ppm sería considerada libre de gluten, la problemática surge cuando no se conoce el nivel de aceptación de consumo al día de gluten por parte de las personas celíacas, estableciendo que podría estar en torno a los 50 mg/ día (Hager et al., 2014). Por esto y por las discrepancias en la legislación a nivel mundial, desarrollar mejoras en la tecnología enzimática para conseguir disminuir lo máximo posible el contenido en gluten, permitirá obtener un producto más competitivo y seguro, respetando la calidad de la cerveza tradicional (Watson et al., 2019).

2.7 Cerveza “light”

Según la Organización Mundial de la Salud llevar una mala alimentación basada en un exceso de calorías en la dieta puede conllevar la aparición de enfermedades como la obesidad o enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio y un aumento de la hipertensión arterial. Según esta organización, 1900 millones de adultos tiene sobrepeso, y esto se considera cuando el índice de masa corporal no corresponde a la relación al peso-altura, siendo mayor del que debería (OMS, 2020).

Resulta por lo tanto interesante la elaboración de productos bajos en calorías como la cerveza. De hecho se ha observado un crecimiento exponencial en el consumo de la cerveza “light” debido a la concienciación de los consumidores de este problema con la búsqueda de alimentos más saludables. Se estima un aumento de la producción en un 20% en 2025, teniendo en cuenta que en algunos países como Estados Unidos el consumo de cerveza “light” representa un 10% del total (White, Oliffe y Bottorff, 2014).

Reducir el número de calorías en una cerveza implica disminuir su contenido en carbohidratos, que además no tienen gran valor nutricional. Sin embargo la mayoría de las calorías provienen del alcohol por lo que las cervezas “light” tendrán a su vez menor contenido en alcohol. Mientras que una cerveza normal tiene un contenido de entre 4,5 y 5% de alcohol, las “light” tienen entre un 2 y un 3% (Blanco et al., 2014)

Según *“Las Declaraciones Nutricionales de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición Española autorizadas en el anexo del reglamento (CE) 1924/2006”* para que un alimento sea considerado de valor energético reducido, tiene que verse como mínimo reducido en un 30% del valor energético total del alimento. Una cerveza de 330 mL de promedio contiene aproximadamente 140 Kcal, mientras que una cerveza “light” tiene aproximadamente 30 kcal por cada 100 gramos (USDA, 2018).

La producción de una cerveza baja en calorías aparte de utilizar métodos físicos como la destilación o la evaporación que reduce el contenido en alcohol, utiliza enzimas comerciales que optimizan el proceso. Estas enzimas son las *amilasas*, las *pululanases* y las *glucoamilasas* las cuales reducen el número de carbohidratos y por lo tanto de calorías (Blanco et al., 2014).

3 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enzimas son moléculas orgánicas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores de reacciones químicas acelerando la velocidad de reacción, de forma que están presentes en todas las reacciones del metabolismo de las células y juegan un papel importante para que estas puedan llevarse a cabo.

Las enzimas intervienen de forma esencial en la industria alimentaria siendo notable su utilización en la industria de las bebidas, pudiéndose distinguir diferentes tipos según la función que desempeñan o la bebida industrial que se vaya a producir. Dentro de la aplicación de las enzimas en la industria de las bebidas, su uso en el sector cervecero es indispensable para conseguir el producto final con las características requeridas. Gracias a las diferentes investigaciones realizadas y el conocimiento que se tiene de ellas, en la actualidad se están investigando el desarrollo de nuevas tecnologías que mejoren la funcionalidad y aplicación de las enzimas para conseguir optimizar el proceso productivo. Estos estudios incluyen el análisis tecno-económico de las posibles ventajas y/o inconvenientes que suponen la incorporación de las enzimas en las distintas etapas del proceso. El avance en el desarrollo de la tecnología enzimática va enfocado a la producción de alimentos con propiedades que satisfagan necesidades actuales del consumidor.

La finalidad de este trabajo es clasificar los diferentes tipos de enzimas que intervienen en el procesado industrial de las bebidas y profundizar en su mecanismo de actuación. De forma más detallada, este trabajo se centra en el sector de la cerveza y cómo afectan los diferentes parámetros del proceso productivo a su actividad.

Se comenzará por definir el concepto de enzima de forma global explicando su mecanismo de actuación, su estructura, su importancia a lo largo de la historia y en la actualidad. Posteriormente se llevará a cabo una clasificación de los diferentes tipos de enzimas, describiendo el tipo de reacciones que catalizan y qué tipo de enzimas intervienen en la industria de las bebidas.

Se profundizará en el sector de la cerveza para analizar cómo actúan a lo largo de las diferentes etapas del proceso productivo y cómo se ven influenciadas por las condiciones en la que se lleva a cabo dicho proceso. El trabajo analiza cómo la innovación en el campo enzimático en el sector de la cerveza abre la puerta a la comercialización de nuevos alimentos con propiedades que satisfacen las necesidades actuales. En concreto, se analizará cómo las enzimas intervienen en la fabricación de productos como la cerveza sin gluten, o la cerveza baja en calorías.

4 METODOLOGÍA

En un trabajo de revisión bibliográfica una búsqueda detallada y planificada del tema tratado es fundamental para seleccionar la información más relevante en el campo. La selección de esta información debe garantizar que las fuentes utilizadas son fiables y basadas en un conocimiento científico. Para llevarlo a cabo se han seguido una serie de pautas recomendadas en el curso online de “*Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los Alimentos 2019-2020*” (Biblioteca de la Universidad de Zaragoza, 2018), documento aportado por la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria.

4.1 Fuentes bibliográficas consultadas

AlcorZe: Es una herramienta de búsqueda en la cual se accede a partir de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018). Esta base de datos permite acceder a diferentes artículos de revista, tesis doctorales, información jurídica, estadísticas, etc., las cuales están en la colección de la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza en fuentes internas tanto en el catálogo de la biblioteca, como en el repositorio institucional Zaguán.

ScienceDirect: Es un sitio web que proporciona acceso por suscripción a una gran base de datos en investigación científica y médica. Alberga más de 12 millones de contenidos de 3500 revistas académicas y 34000 libros electrónicos. La fecha de lanzamiento fue en marzo de 1997. Los formatos disponibles son libros, publicaciones y revistas académicas. El productor es Elsevier.

Web Of Science: Es una plataforma basada en la tecnología Web que recoge las referencias de las principales publicaciones científicas de cualquier disciplina del conocimiento, tanto científico como tecnológico, humanístico y sociológico desde 1945, esenciales para el apoyo a la investigación y para el reconocimiento de los esfuerzos y avances realizados por la comunidad científica y tecnológica. Permite acceso a las bases de datos más utilizadas por la comunidad científica y tecnológica (Fundación Española para la Ciencia y Tecnología, 2019).

SCOPUS: Según la Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018) es una base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas de áreas de ciencia, tecnología, medicina y ciencias sociales. Esta editada por Elsevier.

4.2 Metodología de búsqueda bibliográfica

La revisión bibliográfica se hizo de forma estructurada y planificada siguiendo una serie de pautas que han permitido organizar la información de forma precisa, para lo que se llevaron a cabo diferentes etapas:

Búsqueda inicial: Esta permite tener una visión más global gracias a una búsqueda general del tema en cuestión. Para ello se consultan en Internet herramientas como *AlcorZe* o el catálogo de ROBLE proporcionadas por la Universidad de Zaragoza. Posteriormente se consultaron las bases de datos *ScienceDirect*, SCOPUS y *Web of Science* las cuales permitían obtener información más detallada. La consulta de algunos organismos como AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) ayudó a recabar datos útiles para esta revisión bibliográfica. Dentro de la búsqueda realizada, algunas de las palabras clave utilizadas fueron “Enzymes” and “kinetics”, “Enzymes” and “Beverage”, “Enzymes” and “Brewing”, “Enzymes” and “gluten free beer”, “Enzymes” and “light beer”. Todas ellas se introdujeron en las bases de datos previamente mencionadas para obtener las publicaciones obtenidas a lo largo del tiempo.

En la figura 4.1 se muestra el número de artículos publicados a lo largo de los años en la base de datos *ScienceDirect* utilizando las palabras claves “Enzymes” and “Beverage”, obteniéndose en total 38.861 resultados. Se hizo lo mismo con otra de las búsquedas claves, en el sector de la cerveza, utilizando las palabras clave “Enzymes” and “Brewing” obteniéndose 13.762 resultados, (Figura 4.2). En ambos casos se observa un crecimiento exponencial en los últimos años.

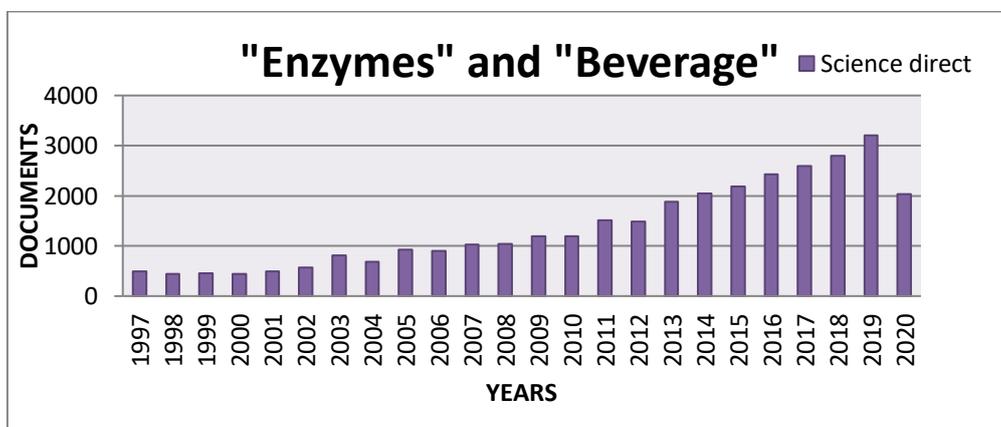


Figura 4.1. Número de publicaciones anuales que incluyen las palabras “Enzymes” and “Beverage” en la base de datos *ScienceDirect*.

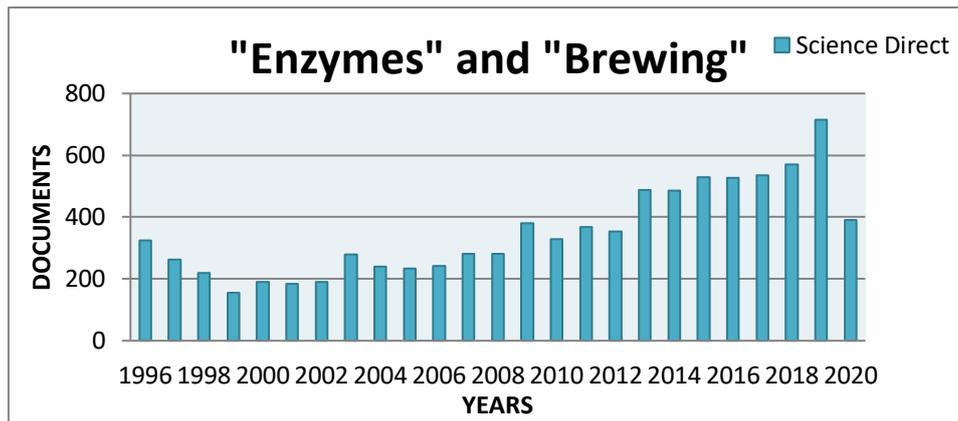


Figura 4.2. Número de publicaciones anuales que incluyen las palabras “Enzymes” and “Brewing” en la base de datos ScienceDirect.

Búsqueda sistemática: Las palabras clave se utilizaron en función de la descripción de los diferentes apartados del trabajo, teniendo en cuenta los conceptos fundamentales en dichas partes. Todas estas palabras clave pueden verse en las tablas 4.1, 4.2 y 4.3 ubicadas en el Anexo 2.

Búsqueda interna: A partir de los artículos encontrados se seleccionó en ellos las citas y la bibliografía más relevantes para realizar una última selección.

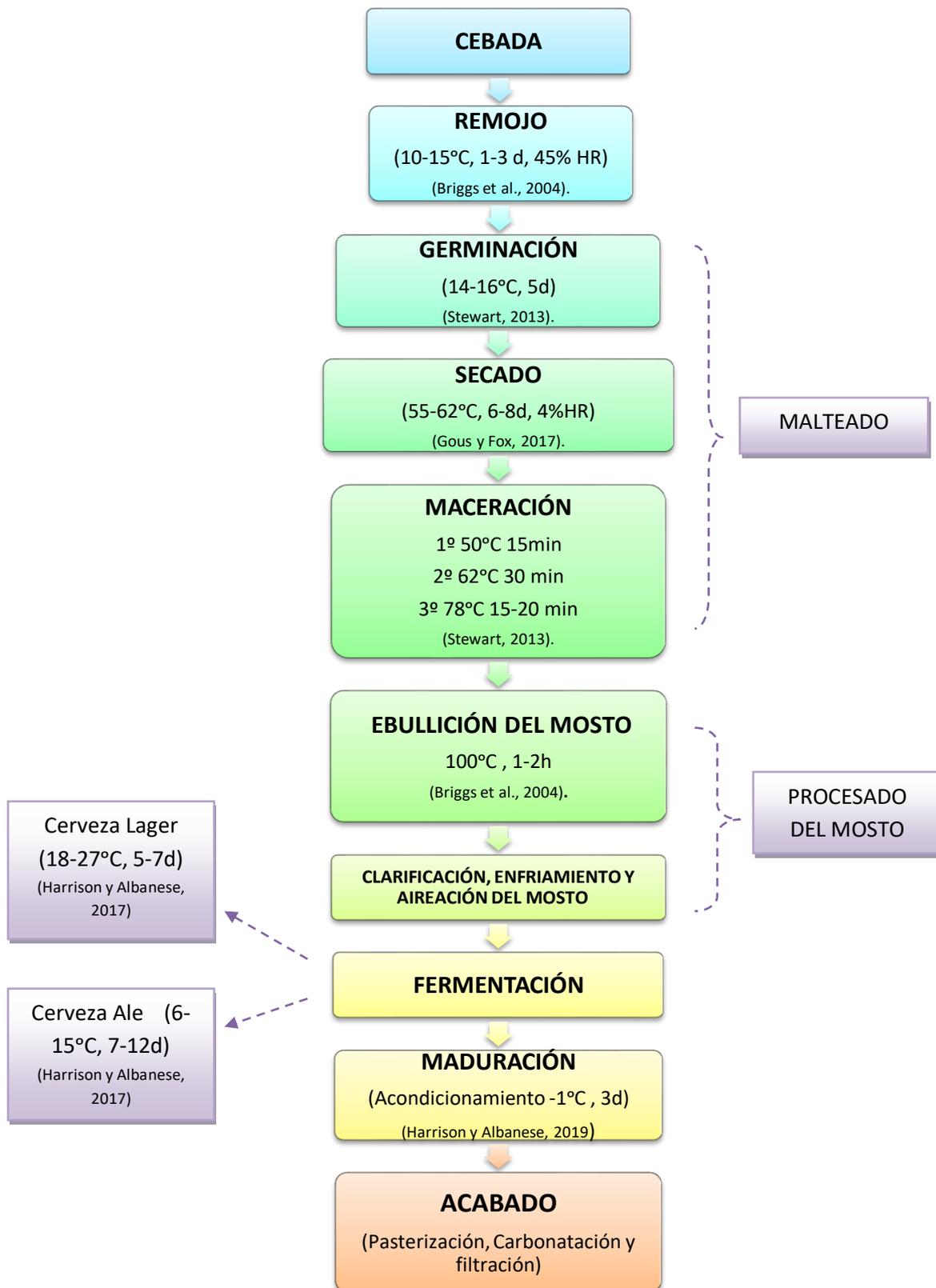
Debido a la gran cantidad de artículos obtenidos en estas bases de datos, se redireccionó la búsqueda para que esta fuera más específica. Para poder acotar la búsqueda se utilizaron una serie de filtros como la selección del tipo de documento, si es un artículo, una revisión o un capítulo de un libro. También se acotó seleccionando la opción de utilizar artículos de acceso abierto o la más utilizada de ellas especificando el rango de años en el que se realiza la búsqueda, siendo de más interés los publicados en la última década. En las tablas 4.1, 4.2, 4.3 ubicadas en el Anexo aparecen las bases de datos *ScienceDirect*, *Web of Science* y *SCOPUS* con las palabras clave y los filtros utilizadas en cada una de ellas. Se utilizó una combinación de las palabras para poder acceder a un mayor número de documentos del tema a tratar.

Cuando todos los documentos fueron leídos y resumidos para un mejor manejo de estos, se utilizó un gestor bibliográfico llamado “RefWorks”. Esta aplicación ha permitido gestionar toda la información obtenida y la organización de dichos documentos en carpetas y facilitando la elaboración de la bibliografía y la creación de citas para la redacción.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Proceso de elaboración de la cerveza

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en cada una de las etapas del proceso de elaboración de la cerveza mostrado en el esquema 5.1.



Esquema 5.1. Diagrama del proceso de elaboración de la cerveza

5.1.1 Malteado

El malteado es el proceso en el que la cebada se convierte en malta. El objetivo de esta etapa es conseguir un espectro adecuado de proteínas y azúcares más sencillos, que será utilizado en el posterior proceso de la fermentación. Para ello, se produce la degradación de las proteínas que constituyen la pared celular del grano y en menor cantidad la degradación de los carbohidratos contenidos en este. Ambos procesos son llevados a cabo por enzimas. El malteado se divide en 3 fases: Remojo, germinación y secado (Espinosa-Ramírez, Pérez-Carrillo y Serna-Saldívar, 2014).

Remojo: Su principal objetivo es la activación del metabolismo enzimático. Para ello, se remoja el grano entre 1 y 3 días a una temperatura de entre 10 y 15°C, con ello aumenta la humedad llegando a ser próxima al 45% (Briggs et al., 2004). La dureza del endospermo va a influir en la absorción del agua, de forma que un endospermo blando permite obtener una humedad más óptima, facilitando así el acceso y acumulación de las enzimas hidrolíticas. La selección del grano de cebada va a ser clave para asegurar la calidad del proceso de malteado, prefiriéndose granos con bajos contenidos en β -glucanos y arabinosilanos presentes en la pared celular, y que constituyen el principal factor de dureza (Gupta, Abu-Ghannam y Gallagher, 2010).

Germinación: Comienza con la aparición de la radícula que es una pequeña raíz que sale del grano. En esta etapa, los granos se distribuyen durante 5 días en bandejas perforadas a una temperatura de entre 14 y 16°C. Se produce un intercambio de aire a través del grano, acompañado de un volteo para que el embrión respire adecuadamente. Durante este periodo la materia glutinosa y mucilaginosa se reduce y se produce la acumulación de enzimas hidrolíticas que producirán un cambio físico en el grano, debilitándolo y reblandeciéndolo aún más (Stewart, 2013). Esta acumulación va a estar condicionada por la aparición del ácido giberílico, el cual es un fitoregulador del crecimiento de acción hormonal que estimula el desarrollo de las plantas y que promueve el crecimiento y la producción de enzimas alrededor del endospermo. Estas hormonas se producen en el embrión y se liberan durante la germinación (O'Brien, Fowkes y Bassom, 2010).

Secado: Tras la germinación el grano aún fresco se pasa al horno, en esta etapa la humedad inicial del 45% se reducirá a un 4% con el objetivo de estabilizar la malta reduciendo la probabilidad de crecimiento microbiano. Para ello, se lleva a cabo un secado gradual a una temperatura de entre 55 y 62°C durante 6 y 8 días, en función del tipo de malta requerido. Es importante controlar la temperatura, ya que la malta aún no es fermentable por las levaduras y la hidrólisis debe continuar en la siguiente etapa, de manera que un tratamiento intenso puede provocar su desnaturalización e impedir su actividad (Gous y Fox, 2017). Durante el

secado, el aire asciende a través de los granos y tras esto adquirirán una coloración marrón debido a la reacción de Maillard. Por último la malta se enfría y se eliminan las raíces (Spier et al., 2016).

- **Enzimas que intervienen en el proceso de malteado**

Enzimas que actúan sobre las proteínas del grano

Conocidas como proteasas, hidrolizan las proteínas convirtiéndolas en péptidos y aminoácidos libres. Durante la germinación y el secado de la malta la actividad de las proteasas aumenta en 5 y 6 veces, produciéndose la mayor parte de los procesos proteolíticos durante el malteado (Benešová et al., 2017).

Las enzimas proteolíticas pueden ser *endopeptidasas* y *exopeptidasas*. Las *endopeptidasas* catalizan la ruptura de los enlaces peptídicos internos C-N, mientras que las *exopeptidasas* descomponen los aminoácidos simples de los extremos de las proteínas. La hidrólisis de las proteínas se produce en una serie de fases, primero actúan las *endopeptidasas* sobre grandes moléculas de proteínas como albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas dando lugar a la mayor producción de aminoácidos durante esta fase. Las primeras proteínas degradadas son aquellas que constituyen el escutelo y la aleurona. Tras esto las proteasas contribuyen a la degradación de las paredes celulares de los gránulos de almidón en el endospermo, actuando sobre las hordeínas y las glutelinas que son las proteínas de reserva. Sobre estas actúan las llamadas *proteasas de cisteína*, que son consideradas las *endoproteasas* más importantes de la malta, donde el 90% de su actividad radica en la malta seca (Benešová et al., 2017).

En la siguiente fase actúan las enzimas *exopeptidasas*, las cuales se pueden dividir en *aminopeptidasas* y *carboxipeptidasas*. Las *aminopeptidasas* están presentes en la malta y actúan sobre los extremos amino de los aminoácidos de las proteínas, mientras que las *carboxipeptidasas* se desarrollan durante el remojo y atacan a los extremos carbonilo. De todas las enzimas proteolíticas de la malta, las *exopeptidasas* son las más termorresistentes con una temperatura óptima de entre 45 y 50°C e inactivándose a temperaturas superiores de 70°C y con un pH óptimo de entre 3.9 y 5.5 (Bamforth, 2009)

En el malteado, la degradación de las proteínas va a constituir la principal fuente de nitrógeno soluble, produciendo alrededor de un 35-40% del total, el cual servirá a la levadura como nutriente contribuyendo en el proceso de fermentación (The Brewer International, 2002). El contenido de proteínas degradadas en el mosto va a influir sobre la formación de espuma, de forma que un contenido de proteínas de cebada por encima del 11% mejora el poder de formación de espuma, mientras que por debajo del 9,5 %, la reduce. La degradación de las

proteínas va a afectar al sabor de la cerveza y al cuerpo final que va a tener. Sin embargo una insuficiencia proteolítica puede causar problemas de filtrabilidad y originar turbidez en la cerveza final (Benešová et al., 2017).

Enzimas que actúan sobre la pared celular del grano

Estas enzimas son hidrolasas que van a actuar sobre la pared celular del grano de cebada. Este está constituido por polisacáridos sin almidón como son los β -glucanos, la celulosa y los arabinosilanos. Su acción conduce a la movilización del almidón, lo que permite que la segunda categoría de enzimas hidrolicen el almidón en dextrinas, maltosa y glucosa (Cornaggia et al., 2019).

Las *β -glucanasas* junto con las proteasas son las primeras enzimas en actuar degradando la pared celular del endospermo del almidón, la cual está constituida por un 75% de β -glucanos (Guerra et al., 2008). Estas enzimas van a actuar sobre los enlaces β -1,4 y β -1,3 que mantienen unidos los β -glucanos. Una falta de la degradación de los β -glucanos puede ocasionar problemas posteriormente como una menor recuperación del extracto, alta viscosidad en el mosto, problemas de filtración y de turbidez (Cornaggia et al., 2019).

Las *xilanasas* actúan sobre los arabinosilanos que constituyen al igual que los β -glucanos la pared del endospermo. Sin embargo estos constituyen un menor porcentaje que los anteriores, de forma que se considera la *β -glucanasa* la enzima más responsable de la degradación de las paredes celulares. Para una hidrólisis completa actuarán la *β -glucanasa* y la *xilanasa* en conjunto (Hu et al., 2014). Ambas actúan a una temperatura óptima de 56°C y un pH óptimo de 6.0 (The Brewer International, 2002).

Enzimas que actúan sobre el almidón

Estas enzimas tienen alto poder diastásico. Durante el malteado estas enzimas hidrolíticas causan la erosión tan solo superficial de los granos de almidón, siendo mucho más notable su actividad en la siguiente etapa de maceración. Durante el remojo y los dos primeros días de germinación, la *α -amilasa* se sintetiza en la capa de aleurona del grano germinado, produciéndose los mayores cambios de los granos de almidón en el proceso de malteado, apareciendo microperforaciones. Sin embargo, al final de este proceso, el grano se mantiene casi intacto y la principal aportación es la acumulación de estas enzimas hidrolíticas, que actuarán en las etapas posteriores. (Contreras-Jiménez et al., 2019).

La cebada ya malteada contiene un 70-85% de carbohidratos totales, 10.5-11% de proteínas, 2-4% de materia inorgánica, 1.5-2% de grasa y 1-2% de otras sustancias (Steiner, Becker y Gastl, 2010).

5.1.2 Maceración

La maceración es un proceso físico, cuyo objetivo es completar la hidrólisis del almidón para extraer azúcares fermentables que posteriormente utilizará la levadura durante la fermentación. Para llevar a cabo esto, primero se tritura el grano de cebada, de forma que el endospermo queda expuesto facilitando el acceso de las enzimas hidrolíticas. Como resultado se obtiene una fracción soluble mucho mayor a la obtenida en el proceso de malteado, la cual contiene carbohidratos fermentables y no fermentables, proteínas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos. Esta fracción soluble obtenida al final del proceso de malteado se denomina mosto (Sammartino, 2015).

Durante la maceración se produce un incremento de la temperatura, el cual puede realizarse de diferentes formas, pero es el denominado “programa de infusión” uno de los más utilizados. A lo largo de este programa se aumenta la temperatura y se mantiene constante durante ciclos establecidos (Figura 5.1). Esto se lleva a cabo con la finalidad de alcanzar la temperatura óptima para cada una de las enzimas (Stewart, 2013). Además, mediante este método de infusión se produce mayor cantidad de azúcares fermentables con respecto a otras técnicas de maceración utilizadas, optimizando el proceso (Fox et al., 2019).

A parte del control de la temperatura, para conseguir un buen rendimiento se debe de controlar el pH, siendo el pH óptimo de 5.0-5.7 para la mayoría de enzimas que participan en esta etapa. Se mide el pH con un pH-metro, de forma que si sale un valor demasiado alto se puede controlar añadiendo ácido fosfórico, ácido láctico o ácido cítrico. (Sammartino, 2015).

Programa de infusión

Como se observa en la figura 5.1 el programa de infusión se lleva a cabo en diferentes fases que son descritas a continuación:

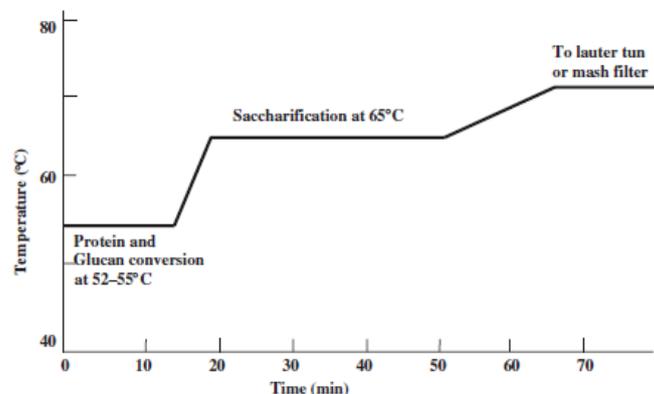


Figura 5.1 Programa de infusión típico, con incrementos de temperatura establecidos en la maceración (Stewart, 2013).

1º 50°C – La mezcla se calienta para llegar a la proteólisis

Durante este periodo las *proteasas*, *carboxipeptidasas*, *aminopeptidasas*, *glucananasas* y *xilanasas* provenientes de la malta alcanzan su temperatura óptima a 50°C. Estas enzimas que empiezan a realizar su función durante el malteado, continúan actuando en la maceración. Degradan las proteínas del endospermo, las cuales son indeseables porque pueden precipitar y causar problemas de filtración, prestando principal atención a la presencia de β -glucanos. Esta temperatura se mantiene durante 15 minutos aproximadamente, ya que una degradación excesiva de las proteínas puede reducir el nivel de espuma en la cerveza final (Stewart, 2013).

2º 65°C – Gelatinización, licuefacción del almidón y sacarificación

En esta etapa la mezcla se calienta hasta una temperatura de 62°C, a la cual se gelatiniza el almidón (Spier et al., 2016). El tamaño de los gránulos de almidón que se han formado después del malteado va a influir, de forma que los gránulos pequeños se gelatinizan antes que los grandes a altas temperaturas, esto es debido a que tienen más relación superficie-volumen. Esta etapa va a durar 30 minutos cuando se alcanza la temperatura óptima de las enzimas amilolíticas (Gupta, Abu-Ghannam y Gallagher, 2010). Estas enzimas que se habían sintetizado previamente durante la etapa de germinación, comienzan a realizar su función hidrolizando el almidón que ha quedado expuesto tras la degradación de las proteínas y de los β -glucanos (Stewart, 2013). Se denomina sacarificación porque se producen los azúcares fermentables que darán lugar a un mosto más dulce.

- **Enzimas amilolíticas que participan:**

- **α -amilasa:** Es una enzima que comienza a hidrolizar de forma aleatoria los enlaces α -1,4 glucosídicos de la amilosa dando lugar a glucosa y maltosa (Figura 5.2). La aleatoriedad del ataque de estas enzimas en el almidón hace que se produzca de forma relativamente rápida (Stewart, 2013).
- **β -amilasa:** Es una enzima que hidroliza los enlaces α -1,4 glucosídicos de los extremos no reductores de la cadena de Amilosa (Figura 5.2). Se libera el disacárido fermentable de la maltosa, otros no fermentables como la maltotriosa y oligosacáridos no fermentables llamados dextrinas (Spier et al., 2016). La β -amilasa es la principal enzima que degrada el almidón y tiene el mayor poder diastásico (Vinje, Duke y Henson, 2020).

Sin embargo entre estas dos enzimas la temperatura óptima varía. La temperatura óptima de la β -amilasa es de 62°C mientras que la de la α -amilasa es de 67°C. Esto quiere decir que durante esta etapa es fundamental encontrar un equilibrio, de forma que la α -amilasa actuará

a una temperatura menor a su temperatura óptima, por lo que no alcanzará su actividad máxima. Un aumento de temperatura podría provocar la desnaturalización de la β -amilasa. Llegar al equilibrio entre la α -amilasa y la β -amilasa en la maceración es un reto para producir productos iguales, de forma que una buena opción sería utilizar una temperatura de 65°C (Sammartino, 2015).

- **α -glucosidasa:** Esta enzima hidroliza los enlaces α -1,4 de los extremos no reductores para producir glucosa (Figura 5.2). Sin embargo, esta enzima es más termolábil, por lo que su actividad está más limitada durante la maceración y no contribuye en gran medida a la degradación del almidón (Hu et al., 2014).
- **Dextrinasa límite (LD):** Provoca la hidrólisis de los enlaces α -1,6 de las dextrinas de la *Amylopectina* (Figura 5.2). Sin embargo aparece de forma inactivada porque está unida a un inhibidor que se encuentra en el endospermo, solo cuando se separa del inhibidor es cuando se promueve la digestión del almidón y aumenta la formación de azúcares fermentables. La mejor técnica para eliminar el inhibidor es por la acción de otra proteasa exógena. Un contenido de dextrinas excesivo puede provocar problemas de filtración ya que las dextrinas no serán fermentables por las levaduras. Tiene un pH óptimo de 5,5 y una temperatura óptima de 50 °C y es desnaturalizada a 62 °C por lo que actúa en menor medida (Gous y Fox, 2017).

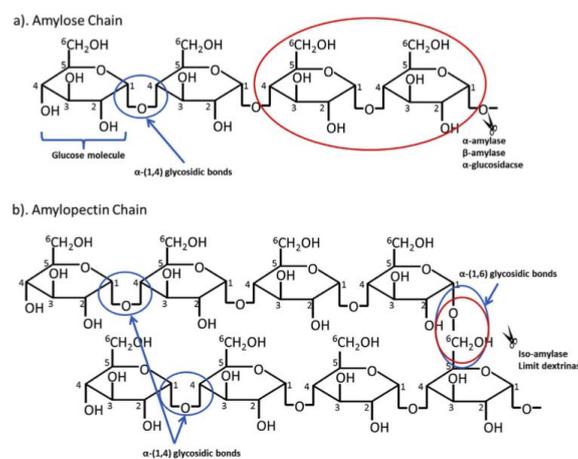


Figura 5.2 Actuación de las enzimas hidrolíticas sobre los enlaces de las cadenas de *Amylosa* y *Amylopectina* (Gous y Fox, 2017).

3º 78°C –Inactivación de las enzimas del malteado

En la última etapa se calienta la mezcla a una temperatura de entre 75 y 80 °C con la finalidad de asegurar la inactivación de todas las enzimas que han participado durante el macerado, ya que si su actuación continua, podría tener efectos negativos en la calidad de la cerveza (Stewart, 2013).

5.1.3 Mosto

1. Separación y ebullición

El primer mosto obtenido es turbio pero se filtra a través de un lecho de partículas para que se vuelva brillante, y se mantiene a 76°C. Este mosto dulce se traslada a un recipiente donde se hervirá junto con el lúpulo durante 1 o 2 horas (Briggs et al., 2004). El lúpulo es una planta que contiene un 2% de monosacáridos y un 15% de proteínas y se añade a la cerveza con la finalidad de aportar el amargor y los aromas característicos. Tras la ebullición se manifiestan estos cambios y se produce la coagulación de las proteínas. Además con esta etapa se asegura la destrucción de los microorganismos (Kirkpatrick y Shellhammer, 2018).

2. Clarificación, enfriamiento y aireación del mosto

Al final de la ebullición el mosto contiene flóculos debido a la composición del lúpulo, por ello se filtra para obtener un mosto más claro. Se enfría y aparecen complejos de proteínas y polifenoles junto con algunos lípidos asociados. Por último el mosto se airea para proporcionar oxígeno a la levadura en las etapas iniciales de la fermentación (Briggs et al., 2004).

5.1.4 Fermentación

En esta etapa las levaduras actúan como catalizadores en la fermentación pero sin formar parte del producto final. Las levaduras mediante una respiración anaeróbica, utilizan los azúcares generados en las etapas anteriores para liberar energía en forma de ATP y producir etanol con un contenido final de un 4-5%. Primero se utiliza el monosacárido de la glucosa y una vez consumido este se utiliza la maltosa, el cual es el disacárido más abundante en el mosto, descomponiéndose en las dos moléculas de glucosa que lo forman. Por último participa el trisacárido de la maltotriosa, sin embargo este fermenta tan sólo parcialmente y más lentamente que los anteriores (Harrison y Albanese, 2017).

Las levaduras necesitan azúcares fermentables y un contenido de nitrógeno de tipo amino soluble (FAN) que les sirva de alimento. El parámetro FAN es la suma de todos los aminoácidos individuales, iones de amonio y pequeños péptidos presentes en el mosto. Se necesita un contenido de 160 mg/L para realizar la fermentación (Curtis Steve, 2002).

La actuación de las levaduras está condicionada por parámetros como la tasa de inoculación, el nivel de contaminación microbiana, la humedad del mosto, la temperatura de transición, el diseño del fermentador y si la fermentación es en lotes o continua, siendo la continua más rápida y reduciendo problemas de manejo (Harrison y Albanese, 2017).

La levadura que se utiliza para realizar la fermentación de la cerveza es *Saccharomyces*, sin embargo la cepa utilizada va a depender del tipo de cerveza que se vaya a producir, clasificándolas en dos tipos. La cerveza de tipo “ale” se produce a partir de una fermentación superficial a una temperatura de entre 18 y 27°C durante 5 y 7 días realizada con *S. cerevisiae*. Mientras que en la de tipo “lager” se produce una fermentación profunda a una temperatura de 6 y 15°C durante 7 y 12 días, y realizada por *S. pastorianus*. La fermentación se realiza en condiciones de temperatura y humedad controladas en tanques de acero inoxidable cerrados disminuyendo el riesgo de contaminación. Durante esta etapa, las levaduras tienden a asentarse en la parte inferior del tanque y pueden reutilizarse para futuras fermentaciones. (Harrison y Albanese, 2017).

Existen diferencias entre las cervezas “ale” y “lager”. Las cepas de *S.pastorianus* utilizan la maltotriosa más eficientemente que las cepas de *S.cerevisiae*, mientras que la fermentación de la maltosa no depende del tipo de cepa cervecera. Sin embargo las levaduras no van a poder hidrolizar determinados compuestos como las dextrinas y los β -glucanos. En la tabla 5.1 del anexo 1 se explica la diferencia de densidad de los flóculos formados en una cepa y otra, el rango de temperatura óptimo para el crecimiento de ambas o la habilidad para esporular.

5.1.5 Maduración

Al final de la fermentación la “cerveza verde” se separa del sedimento y se transfiere a un depósito de madera, de acero revestido o de vidrio. La cerveza se almacena entre 0 y 2°C pero las cervezas “lager” son maduradas durante periodos ligeramente más largos que las “ale”. Este paso proporciona a la cerveza el desarrollo del color, aroma y de las características de cuerpo finales. Sin embargo, muchos cerveceros añaden un periodo de acondicionamiento después de la fermentación, este acondicionamiento se hace a temperaturas de -1°C durante al menos 3 días, permitiendo un mejor desarrollo de las características organolépticas finales. La maduración puede durar en algunos casos hasta 5 años pero depende siempre del resultado que se quiere conseguir (Harrison y Albanese, 2017).

Durante la maduración se presta atención al diacetilo formado en la fermentación. El diacetilo es un subproducto del metabolismo de los aminoácidos que se forma por la descarboxilación oxidativa del α -acetolacto durante la fase de crecimiento exponencial de la levadura. Es un producto desagradable en la mayoría de los casos ya que aporta sabor a mantequilla o a caramelo (Sammartino, 2015). Sin embargo controlando las condiciones de temperatura durante la fermentación y la maduración, el diacetilo es reducido a acetoína la cual no causa ningún efecto sobre el sabor de la cerveza (Krogerus y Gibson, 2013).

5.1.6 Acabado

1. Pasterización

La pasterización es un proceso optativo pero recomendable para aumentar la vida útil. Se puede llevar a cabo a 62°C durante 20 minutos, aunque también se utiliza la pasterización rápida a 71-75°C durante 15-30 segundos. La pasterización puede afectar a la pérdida del sabor, por lo que si se decide no pasterizar, la cerveza será almacenada a temperaturas de refrigeración. Las cervezas industriales tienen fecha de consumo preferente de aproximadamente un año (Harrison y Albanese, 2017).

2. Carbonatación

El nivel de dióxido de carbono se ajusta entre un 0.45% y un 0.52%. El método más común de carbonatación que se basa en la adición de dióxido de carbono al producto, con lo que se puede producir una fermentación secundaria de forma natural (Harrison y Albanese, 2017).

3. Filtración o clarificación

La filtración es el proceso en el que se eliminan las partículas que quedan en suspensión en la cerveza (Pinguli et al., 2018). La turbidez se forma a partir de varios componentes: proteínas (40-75%), polifenoles (en combinación con proteínas) y en menor proporción los carbohidratos (2-15%). Se ha demostrado que son las proteínas ricas en prolina las que más van a causar los problemas de turbidez. Los glucanos pueden influir en la formación de precipitados si no se degradan durante el malteado o durante la maceración (Steiner, Becker y Gastl, 2010).

Dentro de los procesos para controlar la filtración están la sedimentación, la centrifugación, la estabilización y la adición de floculantes y clarificantes. La centrifugación es un buen método pero es caro, además aumenta el riesgo de contaminación y oxidación al mismo tiempo. Si la cerveza tiene una gran viscosidad se recomienda utilizar enzimas comerciales que controlen la cantidad de carbohidratos y proteínas (Pinguli et al., 2018).

5.1.7 Enzimas comerciales

Aparte de promover las condiciones ideales para que se desarrollen las enzimas endógenas de la malta, una ayuda para mejorar el rendimiento del proceso es mediante la adición de enzimas exógenas. Las enzimas se añaden generalmente de forma libre y provienen de fuentes como bacterias, hongos y plantas. En función de la fuente proveniente tendrán unas características u otras y se utilizarán para funciones diferentes, tal y cómo se describe en la Tabla 5.2 (Briggs et al., 2004).

Tabla 5.2 Enzimas comerciales que se utilizan durante el proceso de elaboración de cerveza

ENZIMA	FUENTE	Tª (°C)	pH	FUNCIÓN
<i>α</i>-Amilasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	75-92	5-6	Hidroliza los enlaces α -1,4 de la amilosa y de la amilopectina. Se añade durante la maceración y tiene mayor temperatura de desnaturalización que el resto, por lo que continuará hidrolizando los carbohidratos durante más tiempo produciendo menor turbidez. Ayudará a producir mayor cantidad de azúcares fermentables (Okolo et al., 2020).
	<i>Aspergillus spp</i>	55-60	5,0-6,5	Si se utilizan cereales que no se van a maltear, esta enzima se añade con la finalidad de degradar el almidón en las primeras etapas del proceso, o en el caso de que la cebada tuviera menos enzimas hidrolíticas (Briggs et al., 2004).
	<i>Bacillus subtilis de amylo-liquefaciens</i>	70	5,7-5,9	Es estable a mayor temperatura, se añade durante el macerado y tiene la capacidad de licuar el 35- 40% del almidón. Actúa a una temperatura de hasta 85-90°C (Briggs et al., 2004).
<i>β</i>-glucanasa	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus spp</i>	50-65	5,0-6,5	Hidrolizan los enlaces β -1.4 y β -1.3 que mantienen unidos los β -glucanos. Durante el proceso de elaboración estos pueden no haber sido hidrolizados por completo de forma que producen problemas en la filtración, causando turbidez en la cerveza final. Para evitar esto se añade esta enzima en la etapa de maceración la cual reducirá la viscosidad un 9.6 % y el tiempo de filtración un 34,5% (Liu et al., 2020).
Proteasa	<i>Bacillus subtilis</i>	45-53	5.5-6.0	Estas enzimas se añaden durante el malteado y la maceración para producir la hidrólisis de las proteínas que constituyen el grano de cebada. Estas son responsables de problemas de filtración y de causar turbidez. Además en mostos con un bajo contenido en FAN producen mayor cantidad de grupos de nitrógeno libres que serán esenciales para las levaduras durante la fermentación. (Okolo et al., 2020).
Xilanas	<i>H. Insolens</i>	45-53	5,5-6,0	Se añaden durante la maceración junto con <i>β-glucanasas</i> para degradar los arabinoxilanos que forman la pared celular. Estos también son responsables, aunque en menor cantidad, de producir problemas de turbidez. La adición de esta enzima es interesante cuando se utilizan cereales diferentes a la cebada, como el trigo que es más rico en estos compuestos (Bamforth, 2006).
<i>α</i>-Acetolacto descarboxilasa	<i>Bacillus spp</i> <i>Brevibacterium acetylicum</i>	50	5,5-6,0	Cataliza la vía no oxidativa de descarboxilación del diacetilo y su paso de α -acetolacto a acetoína la cual no produce efectos indeseables en el sabor y en el aroma de la cerveza. Sin embargo una vez formado el diacetilo en alta cantidad esta enzima no actuará (Bamforth, 2006).
Papaína	<i>Carica papaya</i>	50	3-6	Se añade durante el almacenamiento y elimina los polipéptidos que producen turbidez mejorando la estabilización de la cerveza (Bamforth, 2006).
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger, P. chrysogenum</i>	50	5,5-6	Se añade durante el almacenamiento de la cerveza para eliminar el oxígeno del espacio de cabeza, y evitar oxidaciones que pueden alterar el sabor y el aroma de esta (Briggs et al., 2004).

5.2 Cerveza libre de gluten

5.2.1 Evolución del contenido de gluten en el proceso tradicional de elaboración de la cerveza

A lo largo del proceso de elaboración de la cerveza las hordeínas van a degradarse de forma natural debido a la actividad de las proteasas provenientes de la propia malta (Fanari et al., 2018).

Tal y como se observa en la Figura 5.3, las hordeínas se degradan de forma notoria durante el proceso de malteado. En este, las proteasas actúan sobre las proteínas que conforman la pared celular, entre las que se encuentran las hordeínas, provocando cambios trascendentales en la estructura del grano. Sin embargo la degradación de las hordeínas continúa a lo largo de las siguientes etapas. En la etapa de maceración tras la formación y enfriado del mosto, se produce la precipitación de parte de estas proteínas ricas en prolina, siendo aún alto su contenido tras la maduración. Aunque tras la filtración el contenido de gluten se ha reducido en un 40% es todavía insuficiente para considerar a la cerveza final como libre de gluten (Di Ghionno et al., 2017).

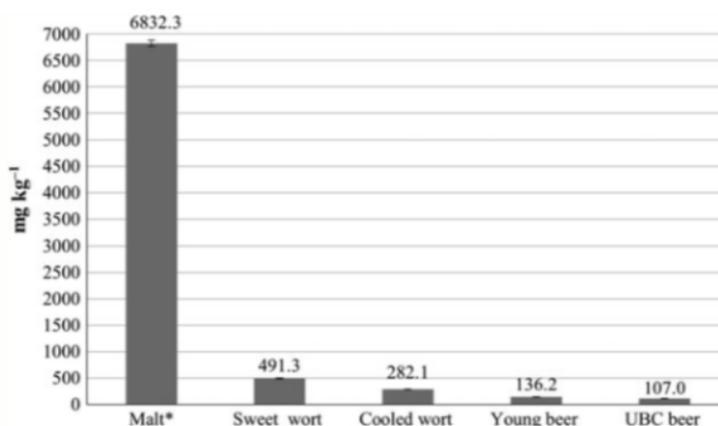


Figura 5.3 Evolución del contenido de hordeínas durante el proceso de elaboración de la cerveza (Di Ghionno et al., 2017)

La actividad de estas proteasas endógenas está condicionada por los parámetros de germinación, en un principio se planteó la idea de aumentar el tiempo de germinación hasta 8 días para maximizar la actividad de estas enzimas. Sin embargo este aumento no consiguió que la cerveza final tuviera un contenido de hordeínas por debajo de los 20 ppm requeridos en la legislación, y además provocó una mayor pérdida de extracto de la malta (Taylor et al., 2018).

5.2.2 Técnicas para la elaboración de una cerveza libre de gluten

Tras comprobar que la degradación de las hordeínas durante la elaboración tradicional de la cerveza era insuficiente para obtener un producto libre de gluten, se han desarrollado otras estrategias:

Elaboración a partir de otros cereales que no contengan gluten

Actualmente la tendencia es la elaboración de estas cervezas a partir de cereales como el arroz, el mijo, el sorgo, el maíz o pseudocereales como la quínoa, el alforfón y el amaranto los cuales son libres de gluten por naturaleza (Hager et al., 2014). Sin embargo la elaboración a partir de este tipo de cereales presenta algunas desventajas. Entre ellas destaca la dificultad en la adaptación de estas especies a las instalaciones tradicionales de elaboración de cerveza, ya que el tamaño de los granos varía con respecto a los de la cebada. Los parámetros de malteado cambian, se necesitan mayores tiempos de germinación o incluso mayor temperatura para la gelatinización del almidón. Además el poder de las enzimas diastásicas es menor y el nivel de alcohol que se va a producir también es menor (Kerpes, Fischer y Becker, 2017). Sin duda, la principal desventaja es la calidad de la cerveza final, la cual discierne mucho con respecto a la tradicional. En esta los aromas son planos, los colores pálidos y disminuye el contenido de lípidos y de grupos nitrógeno libres, reduciendo la producción de espuma (Ceccaroni et al., 2019)

Utilización de la endopeptidasa de prolina procedente de *Aspergillus Niger*

La adición de enzimas exógenas, más concretamente de la Prolil endopeptidasa, procedente de *Aspergillus Niger* (AN-PEP), se convierte en una buena estrategia para reducir el contenido de gluten. Esta enzima descompone la fracción de prolamina rica en prolina del gluten. Actúa hidrolizando las proteínas desde el extremo carboxílico de los residuos de prolina, pudiendo hidrolizar péptidos de hasta una longitud mínima de 3 aminoácidos (Knorr, Wieser y Koehler, 2016).

Esta enzima se aplicó de forma libre durante la etapa de germinación. El contenido final de hordeínas tras 5 días de germinación en la cerveza tratada con la endopeptidasa de prolina era de 15 mg/kg mientras que en la cerveza sin tratar era de 28mg/kg (Figura 5.4). La degradación era mayor al final del día 5 que en el día 3, esto es debido a que a medida que avanza la etapa de malteado y las paredes celulares se descomponen, se facilita la penetración de la enzima en el grano de cebada. Aunque la reducción era mayor que en la cerveza sin tratar, los valores

que se obtuvieron de gluten eran todavía altos para poder denominarla como cerveza libre de gluten (Taylor et al., 2017).

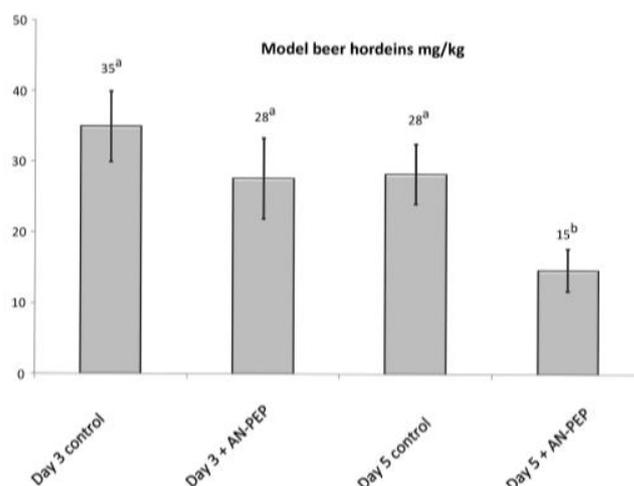


Figura 5.4 Contenido de hordeínas durante la germinación en una cerveza tratada con AN-PEP y en otra sin tratar (Taylor et al., 2017).

Ya que el contenido final de hordeínas obtenido tras la actuación de la enzima aún era elevado, se utilizó un tratamiento adicional de filtración junto con un gel de sílice. Este gel de sílice es un estabilizador coloidal cuya superficie está formada por grupos silanol (SiOH) que interactúan con los grupos carbonilo de las proteínas y los péptidos. Las hordeínas que se encuentran en la cebada son ricas en prolina, de forma que el gel se une a esta prolina disminuyendo su contenido y estabilizando la cerveza. Se aplica en forma de polvo blanco en los barriles en los que se deposita la cerveza tras haber sido filtrada (Taylor, Jacob y Arendt, 2015). Esta combinación consiguió el 99% en la reducción del contenido de gluten, consiguiendo un contenido menor a 10 ppm (Watson et al., 2019).

Se utilizó la enzima en otras etapas del proceso, comprobando que cuando se añadía al mosto tras la maceración, las condiciones de fermentación influían en su actividad. De esta forma se encontraron diferencias entre una fermentación realizada a 22°C y una realizada a 12°C. Mientras que en la primera se obtenía una reducción de hasta el 67% en el contenido de gluten final, en la segunda tan solo se obtenía un 16%. La enzima tiene una temperatura óptima de 50°C por lo que su actividad disminuía con la temperatura, siendo por lo tanto menos eficaz en la elaboración de cervezas ale (Watson et al., 2019).

Para optimizar este proceso, se investigó la aplicación de la inmovilización enzimática. Esta técnica permite reutilizar la enzima durante varios ciclos de elaboración, reduciendo los costes

de elaboración y generando menos subproductos, lo que ayuda en la sostenibilidad del medio ambiente. Mediante el uso de un soporte, en este caso de perlas de quitosano A, se confina la enzima en un reactor de lecho fluidizado continuo obteniendo una elevada superficie catalítica. Tras esto se alcanzó una concentración final de gluten 15mg/kg después de 10 horas de tratamiento. A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos, la adaptación de esta técnica al proceso tradicional de cerveza aún es complicada, por lo que se necesitarán mucho más estudios al respecto (Benucci et al., 2020).

Las características sensoriales obtenidas en la cerveza final son las que van a determinar la aceptación del consumidor, por lo que es importante garantizar la calidad de factores como la espuma, el aroma y la sensación en boca. La espuma está compuesta por gas carbónico procedente de la fermentación alcohólica. Debido a la tensión superficial del líquido no se deshacen rápidamente gracias a elementos como las proteínas y los ácidos del lúpulo. La *endopropil peptidasa* actúa degradando las proteínas, por lo que se pensaba que su adición afectaría a la estabilidad de la espuma, sin embargo se demostró que tras el uso de esta enzima no se observaban alteraciones con respecto a la tradicional. La razón era porque a pesar de que las proteínas ayudan a la estabilización de la espuma, las proteínas con residuos de prolina, que son las que degradan esta enzima, no participan en dicha estabilización. (Fanari et al., 2018). El resto de características organolépticas como el aroma y la sensación en boca, no se veían alteradas tras su aplicación. El uso de esta enzima permitió obtener unas características organolépticas similares a una cerveza con gluten. (Watson et al., 2019)

5.3 CERVEZA “Light”

Para conseguir una cerveza “light” o baja en calorías el principal objetivo es la reducción del contenido de carbohidratos presentes, ya que estos van a formar parte de las calorías de la cerveza final. Para este propósito hay diferentes enzimas que se pueden añadir al proceso y que pueden ser útiles:

5.3.1 Glucoamilasa

Esta enzima metaboliza los carbohidratos residuales, más concretamente las dextrinas, transformándolos en subproductos fermentables. Las dextrinas pueden encontrarse en un 20-25%. Esta enzima proveniente de *Aspergillus Niger*, *Aspergillus awamori* y *Rhizopus oryzae*, tiene un pH óptimo de 3.5-4.5 y una temperatura óptima de 60°C. Se añade durante la maceración e hidroliza a su vez los enlaces glucosídicos α -1,4 de los residuos de glucosa, produciendo principalmente glucosa e hidrolizando las dextrinas. Se añade durante la maceración para que pueda desnaturalizarse, ya que si se añade en la fermentación como son

estables al calor continuaría actuando una vez embotellada la cerveza, dando lugar a fermentaciones no deseadas y a un sabor más dulce (Blanco et al., 2014)

5.3.2 Pululanasa

Se añade durante la maceración e hidroliza los enlaces que mantienen unidas las dextrinas. Las dextrinas no son capaces de ser fermentadas por las levaduras de forma que pueden aparecer residuos en la cerveza final causando problemas de turbidez y de filtración (Bilal y Iqbal, 2019). Actúa sobre el enlace α -1,4 y α -1,6 hidrolizando la unión presente en la Amilopectina. Estas enzimas se obtienen de *Klebsiella planticola* y *Bacillus spp* y tienen una temperatura óptima 45-55°C y un pH óptimo de 5.5-6.6 (Singh, Singh y Pandey 2019)

Evaluación sensorial de las cervezas “light”

Sin embargo los carbohidratos y el alcohol participan en las características sensoriales en la cerveza final, de forma que en estas cervezas se produce una falta de cuerpo y de sensación en boca dando lugar a una falta de plenitud, afectando por lo tanto a la percepción de los consumidores. Presentan menos estabilidad en la formación de la espuma dando lugar a una sensación acuosa. (Blanco et al., 2014)

6 CONCLUSIONES

Tras hacer un estudio en profundidad del término “enzima” así como de su mecanismo de reacción y de su papel en el mantenimiento vital y en el medio ambiente, se observa un creciente interés de su aplicación en el sector de las bebidas.

Tras analizar cómo influyen las enzimas en la elaboración de la cerveza, apartado 5.1, se concluye que su función es esencial e insustituible para la obtención de un producto final de alta calidad. Además, la aplicación de enzimas comerciales permite optimizar este proceso, obteniendo mejores rendimientos en la producción, minimizando además la aparición de problemas ambientales derivados de este proceso.

El desarrollo de la tecnología enzimática permite crear nuevos productos complementarios a la cerveza tradicional. En el caso de la elaboración de la cerveza sin gluten, la utilización de la Prolil endopeptidasa proveniente de *Aspergillus Niger*, acompañada de una tecnología específica de filtración, ha permitido obtener un producto con un contenido en gluten menor a 20 ppm, tal y como está establecido en la legislación. Además, gracias a esta tecnología, se obtiene un producto final con una calidad similar a la cerveza tradicional, presentando unas características organolépticas muy similares. En el caso de la cerveza “light”, mediante la

aplicación de las enzimas *glucoamilasa* y *pululanasa* se consigue hidrolizar las dextrinas disminuyendo el contenido de residuos no fermentables. Estas enzimas permiten reducir el contenido de carbohidratos en la cerveza final y por lo tanto, el de calorías de la bebida.

CONCLUSIONS

Following an in-depth study of the term "enzyme" as well as its reaction mechanism and its role in life support and the environment, there is growing interest in its application in the beverage sector.

An analysis of the influence of enzymes on beer production, section 5.1, leads to the conclusion that their function is essential and irreplaceable for obtaining a high-quality end product. Furthermore, the application of commercial enzymes allows this process to be optimized, obtaining better production yields and also minimizing the appearance of environmental problems arising from this process.

The development of enzyme technology makes it possible to create new products that complement traditional beer. In the case of gluten-free beer production, the use of Prolyl endopeptidase from *Aspergillus Niger*, accompanied by specific filtration technology, has made it possible to obtain a product with a gluten content of less than 20 ppm, as established by legislation. Furthermore, thanks to this technology, a final product is obtained with a quality similar to that of traditional beer, presenting very similar organoleptic characteristics. In the case of "light" beer, by applying the enzymes *glucoamylase* and *pululanase*, dextrins are hydrolyzed, reducing the content of non-fermentable residues. These enzymes make it possible to reduce the content of carbohydrates in the final beer and, therefore, that of calories in the drink.

7 VALORACIÓN PERSONAL

El desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado me ha resultado una experiencia gratificante y enriquecedora, la cual me ha permitido desarrollar aptitudes que pueden ser útiles para complementar los estudios de este grado y de cara al futuro. Durante la elaboración de este, he aprendido a utilizar bases de datos con rigor científico así como aprender a seleccionar y gestionar dicha información. Esto me ha permitido poder madurar intelectualmente y a nivel personal, siendo más consciente de mi capacidad para trabajar de forma autónoma y de organizarme. He podido disfrutar de adquirir mayor conocimiento sobre aspectos de la enzimología y descubrir como su investigación abre puertas a nuevas posibilidades, en este caso tratadas en el sector de la cerveza. Dar respuesta a las necesidades del consumidor,

como la demanda de una cerveza sin gluten o baja en calorías, mediante esta tecnología eficiente y sostenible me despierta un gran interés en el tema.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (2019) *Enzimas alimentarias (2019)*. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enzimas_alimentarias.htm [Consultado: 12 – 04 – 2020].
- Enderle, J.D. (2012) "Chapter 8 Biochemical Reactions and Enzyme Kinetics". *Introduction to Biomedical Engineering*. pp. 447-508.
- Choudhury,R., y Kumar,A.(2020). "Chapter 4 Introduction to enzymes". *Sustainable Technologies for Fashion and Textiles*. pp. 75–90. DOI: 10.1016/B978-0-08-102867-4.00004-9
- Engelking, L.R. (2015). "Chapter 6- Enzyme Kinetics". *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (3ed)* pp.32-38. DOI: 9443/10.1016/B978-0-12-391909-0.50006-2
- L. Michaelis and M.L. Menten, (1913) *Kinetik der Invertinwirkung*. *Biochem. Zeitschrift* 49.pp. 333–369
- Daniel-Purich, L. (2010). "Chapter 5 Initial-Rate Kinetics of One-Substrate Enzyme-Catalyzed Reactions".*Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*. Elsevier Inc, pp. 287-334.
- Shijie, L. (2020) "Chapter 7 Enzymes "En: *Bioprocess Engineering (3ed)*. Elsevier Inc, pp. 229–290.DOI: 10.1016/B978-0-12-821012-3.00007-5
- Koshland, D.E., (1995)."The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33,pp.2375-2378
- Yu-Muzin, D., y Salmi, T. (2016). "Chapter 6-Enzymatic Kinetics". *Catalytic Kinetics (2ed)*. Elsevier Inc, pp. 281-343.DOI: 10.1016/B978-0-444-63753-6.00006-3
- Briggs, G.E., y Haldane J.B.S.(1925)."A note on the kinetics of enzyme action".*Biochem. J.*, vol. 19, pp. 338-339
- Papamichael, E. M., Stamatis, H., Stergiou, P.-Y., Foukis, A., & Gkini, O. A. (2019). "Chapter 3 Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems". *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier Inc, pp.71-104 DOI: 10.1016/B978-0-444-64114-4.00003-0
- Berk, Z. (2018). "Chapter 4-Reaction kinetics". *Food Process Engineering and Technology (3ed.)* Elsevier Inc, pp. 127-140. DOI: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00004-X
- Palmer, T., y Philip-Bonner L. (2007). "Chapter 7- Kinetics of Single-Substrate Enzyme-Catalysed Reactions". *Enzymes*. (Second Editioned.) Elsevier Inc, pp. 105-125.
- Daniel, M., y Danson M.J. (2013); "Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding", *FEBS Letters* 587 pp.2738–2743. DOI:10.1016/j.febslet.2013.06.027
- Gail-Clarke, K., (2013). "Chapter 6 - Enzymes as biocatalysts". *Bioprocess Engineering*. Elsevier Inc, pp. 75-96. DOI: 10.1533/9781782421689.75
- Aragón, J.J. (2009). "Un recorrido por el nacimiento de la enzimología y los orígenes de la bioquímica actual". *Encuentros Multidisciplinares*, pp. 3-8
- Yoo, Y.J., Feng, Y., Kim, Y. y Yagonia, C.F.J. (2017). *Fundamentals of Enzyme Engineering*. DOI: 10.1007/978-94-024-1026-6
- Singh S.B. (2018) "Enzyme Catalysis and Its Role in Food Processing Industries". In: Kuddus M. (eds).*Enzymes in Food Technology*. Springer Nature Singapore, pp.143-165.DOI: 10.1007/978-981-13-1933-4_8
- *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (2020).Enzyme Commission number*. Disponible en: <https://enzyme.expasy.org/>[Consultado: 1 – 06 – 2020].
- Ravindran R., y Jaiswal, A.K. (2018). *Enzymes in Bioconversion and Food Processing*. In: Kuddus M. (eds) *Enzymes in Food Technology*. Springer, Singapore, pp.19-40. DOI: 10.1007/978-981-13-1933-4_2
- Porto de Souza Vandenberghé, L., Grace Karp, S., Binder Pagnoncelli, M.G., von Linsingen Tavares, M., Libardi Junior N., Valladares Diestra K., Aparecida Viesser J., y Ricardo Soccol C.(2020) "Chapter 2- Classification of enzymes and catalytic properties". *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Elsevier, pp.11-30. DOI:10.1016/B978-0-12-819820-9.00002-8
- Patel, A.K., Singhania, R.R. y Pandey, A. (2016). "Novel enzymatic processes applied to the food industry". *Current Opinion in Food Science*, 7, pp. 64-72.DOI: 10.1016/j.cofs.2015.12.002
- Uzuner, S., y Cekmecelioglu, D. (2019) "Chapter 3 Enzymes in the Beverage Industry". *Enzymes in Food Biotechnology*, pp. 29-43. DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00003-7

- Liu, X. y Kokare, C. (2017). "Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry". *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier Inc, pp. 267-298. DOI: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. y Wang, X. (2012). "Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering". *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), pp 1-10. DOI: 10.5936/csbj.201209017.
- Grahame, D.A.S, Bryksa B.C, Yada, R.Y (2015). "Chapter 1 Introduction". *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*, pp.1-9. DOI 10.1016/B978-1-78242-285-3.00001-6
- Malakar, S., Paul, S.K. y Jolvis Pou, K.R. (2020). "1 - Biotechnological Interventions in Beverage Production". *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, 19, Elsevier Inc, pp. 1-37. DOI 10.1016/B978-0-12-816678-9.00001-1
- Real Decreto 678/2016, del 16 de diciembre, por el que se aprueba *La Norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta (BOE-A-2016-11952)*.
- Spier, M.R., Nogueira, A., Alberti, A., Gomes, T.A. y Dhillon, G.S. (2016). "Chapter 11 - Potential Applications of Enzymes in Brewery and Winery". *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production*. Elsevier Inc, pp. 261-278. DOI: 10.1016/B978-0-12-802392-1.00011-3
- Murcia, J.L. (2017). "La cerveza artesana revoluciona el mercado mundial". *Distribución y consumo*, 3(148), pp. 71-73
- Stewart, G.G. (2013). "Chapter 7 - Biochemistry of Brewing". En: *Biochemistry of Foods*. (3ed) Elsevier Inc, pp. 291-318.
- Guerra, N.P., Torrado-Agrasar, A., López-Macías, C., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, S., Simal-Gándara, J. y Pastrana-Castro, L.M. (2008). "10 - Use of Amylolytic Enzymes in Brewing". En: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc, pp. 113-126.
- Gous, P.W. y Fox, G.P. (2017). "Review: Amylopectin synthesis and hydrolysis – Understanding isoamylase and limit dextrinase and their impact on starch structure on barley (*Hordeum vulgare*) quality". *Trends in Food Science & Technology*, 62, pp. 23-32. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.11.013.
- Fox, G.P., Staunton, M., Agnew, E. y D'Arcy, B. (2019). "Effect of varying starch properties and mashing conditions on wort sugar profiles". *Journal of the Institute of Brewing*, 125(4), pp. 412-421. DOI: 10.1002/jib.585.
- Vinje, M.A., Duke, S.H. y Henson, C.A. (2020). "De novo Expression of β -amylase2 (Bmy2) in Barley Grains During Micromalting". *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(2), pp. 126-135. DOI: 10.1080/03610470.2019.1705104
- Bamforth, C.W. (2009). "Current perspectives on the role of enzymes in brewing". *Journal of Cereal Science*, 50(3), pp. 353-357. DOI: 10.1016/j.jcs.2009.03.001.
- Briggs, D.E., Brookes, P.A., Stevens, R. y Boulton, C.A. (2004). "An outline of brewing". *Brewing Science and Practice*. Woodhead Publishing, pp. 1-10.
- van Donkelaar, L.H.G., Mostert, J., Zisopoulos, F.K., Boom, R.M. y van der Goot, A. (2016). "The use of enzymes for beer brewing: Thermodynamic comparison on resource use". *Energy*, 115(1), pp. 519-527. DOI: 10.1016/j.energy.2016.09.011
- Navalón-Ramon, E., Juan-García, Y. y Pinzón-Rivadeneira, A. (2015). "Prevalencia y características de la enfermedad celíaca en la fachada mediterránea peninsular". *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 42(8), pp. 514-522. DOI: 10.1016/j.semerg.2015.09.016.
- King, J.A., Jeong, J., Underwood, F.E., Quan, J., Panaccione, N., Windsor, J.W., Coward, S., deBruyn, J., Ronsley, P.E., Shaheen, A., Quan, H., Godley, J., Veldhuyzen van Zanten, S., Lebowl, B., Ng, S.C., Ludvigsson, J.F. y Kaplan, G.G. (2020). "Incidence of Celiac Disease Is Increasing Over Time: A Systematic Review and Meta-analysis". *The American journal of gastroenterology*, 115(4), pp. 507-525. DOI: 10.14309/ajg.0000000000000523
- Singh, P., Arora, A., Strand, T.A., Leffler, D.A., Catassi, C., Green, P.H., Kelly, C.P., Ahuja, V., Makharja, G.K. (2018) "Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis". *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16, pp. 823-836. DOI: 10.1016/j.cgh.2017.06.037
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Celíacos (2019). Disponible en: http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/celíacos.htm [Consultado: 28-04 – 2020].
- Tema 8 del Programa conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y de la Organización Mundial de la Salud (2019). *Normas alimentarias comité del Codex sobre etiquetado de los alimentos*. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shproxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-714-45%252Fdocuments%252Ffl45_08s.pdf . [Consultado: 25 – 04 – 2020].

- Organización Mundial de la Salud (2020). *Alimentación Sana*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet> [Consultado: 3 – 05 – 2020].
- White, C., Oliffe, J.L., Bortorff, J.L. (2014). "The marketing of better-for-you health products in the emergent issue of men's obesity". *Health Sociology Review*, 23(2), pp. 113-124 DOI: 10.1080/14461242.2014.11081966.
- U.S Department of Agriculture (2019). *Alcoholic beverage, beer, light*. Disponible en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168749/nutrients> [Consultado: 8– 05 – 2020].
- Reglamento (CE) N°1924/2006
- Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
- Biblioteca de la Universidad de Zaragoza (2018). Guía de herramientas y pautas para un buen TFG: Ciencia y Tecnología de los alimentos 2018-19. Disponible en: <https://moodle2.unizar.es/add/course/view.php?id=26154> [Consultado 07-04-2019].
- ELSEVIER (2019). Science Direct. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/> [Consultado: 12 – 06 – 2019].
- Fundación Española para la Ciencia y Tecnología (2019). Web of Science. Disponible en: https://apps.webofknowledge.com/WOS_GeneralSearch_input.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&SID=F5SBR7lBwRG7sYmH7F1&preferencesSaved= [Consultado: 12 – 06 – 2019].
- Fundación Española para la Ciencia y Tecnología (2019). Web of Science. Disponible en: <https://www.fecyt.es/es/recurso/web-science> [Consultado: 12 – 06 – 2019].
- ELSEVIER (2019). SCOPUS. Disponible en: <https://www.scopus.com/home.uri?zone=header&origin=NO%20ORIGIN%20DEFINED> [Consultado: 12 – 06 – 2019].
- Espinosa-Ramírez, J., Pérez-Carrillo, E. y Serna-Saldívar, S.O. (2014). "Maltose and glucose utilization during fermentation of barley and sorghum lager beers as affected by β -amylase or amyloglucosidase addition". *Journal of Cereal Science*, 60(3), pp. 602-609. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.07.008
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. y 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(3), pp. 318-328. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x.
- O'Brien, R., Fowkes, N. y Bassom, A.P. (2010). "Models for gibberellic acid transport and enzyme production and transport in the aleurone layer of barley". *Journal of Theoretical Biology*, 267(1), pp. 15-21. DOI: 10.1016/j.jtbi.2010.07.030
- Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R. y Svoboda, Z. (2017). "Activity of Proteolytic Enzymes During Malting and Brewing". *Kvasny Prumysl*, 63(1), pp. 2-7. DOI: 10.18832/kp201701
- "The function of enzymes in brewing" (2002). *The BREWER International*, 2(9). Disponible en: <https://www.ibd.org.uk/learn/resources/publications/> [Consultado: 30 – 03 – 2020].
- Curtis Steve (2002). "The function of enzymes in brewing ". *The BREWER International*, 2(9)
- Cornaggia, C., Evans, D.E., Draga, A., Mangan, D. y McCleary, B.V. (2019). "Prediction of potential malt extract and beer filterability using conventional and novel malt assays". *Journal of the Institute of Brewing*, 125(3), pp.294-309. DOI: 10.1002/jib.567.
- Hu, S., Dong, J., Fan, W., Yu, J., Yin, H., Huang, S., Liu, J., Huang, S. y Zhang, X. (2014). "The influence of proteolytic and cytolytic enzymes on starch degradation during mashing". *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), pp. 379-384. DOI: 10.1002/jib.172
- Contreras-Jiménez, B., Del Real, A., Millan-Malo, B.M., Gaytán-Martínez, M., Morales-Sánchez, E. y Rodríguez-García, M.E. (2019). "Physicochemical changes in barley starch during malting". *Journal of the Institute of Brewing*, 125(1), pp. 10-17. DOI: 10.1002/jib.547
- Steiner, E., Becker, T. y Gastl, M. (2010). "Turbidity and Haze Formation in Beer — Insights and Overview". *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), pp. 360-368. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00787.x.
- Sammartino, M.(2015). "Enzymes in Brewing". *Master Brewers Association of the Americas*, 52(3), pp. 156-164.DOI: 10.1094/TQ-52-3-0818-01
- Hu, S., Yu, J., Dong, J., Evans, D.E., Liu, J., Huang, S., Huang, S., Fan, W., Yin, H. y Li, M. (2014). "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(7-8), pp. 615-623. DOI: 10.1002/star.201300152
- Kirkpatrick, K.R. y Shellhammer, T.H. (2018). "Evidence of Dextrin Hydrolyzing Enzymes in Cascade Hops (*Humulus lupulus*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(34), pp. 9121-9126. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03563
- Harrison, M. A., & Albanese, J. B. (2017). "Beer/Brewing" *Reference Module in Life Sciences*. DOI:10.1016/b978-0-12-809633-8.13014-6

- Krogerus, K. y Gibson, B.R. (2013). "125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation". *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), pp. 86-97. DOI: 10.1002/jib.84
- Pinguli, L., Malollari, I., Troja, R., Manaj, H. y Dhroso, A. (2018). "Controlling beer filtration process through implementation of enzymatic and microbiological techniques". *The EuroBiotech Journal*, 2(3), pp. 165-170. DOI: 10.2478/ebtj-2018-0021
- Okolo, B.N., Amadi, O.C., Moneke, A.N., Nwagu, T.N. y Nnamchi, C.I. (2020). "Influence of malted barley and exogenous enzymes on the glucose/maltose balance of worts with sorghum or barley as an adjunct". *Journal of the Institute of Brewing*, 126(1), pp. 46-52. DOI: 10.1002/jib.598
- Liu, X., Jiang, Z., Ma, S., Yan, Q., Chen, Z. y Liu, H. (2020). "High-level production and characterization of a novel β -1,3-1,4-glucanase from *Aspergillus awamori* and its potential application in the brewing industry". *Process Biochemistry*, 92, pp. 252-260. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.01.017
- Bamforth, C.W. (2006). "1 - New brewing technologies: setting the scene". *Brewing*. Elsevier Ltd, pp. 1-9.
- Fanari, M., Forteschi, M., Sanna, M., Zinellu, M., Porcu, M.C. y Pretti, L. (2018). "Comparison of enzymatic and precipitation treatments for gluten-free craft beers production". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 49, pp. 76-81. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.07.017
- Di Ghionno, L., Marconi, O., Sileoni, V., De Francesco, G. y Perretti, G. (2017). "Brewing with prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*: the impact of enzymatic treatment on gluten levels, quality attributes and sensory profile". *International Journal of Food Science & Technology*, 52(6), pp. 1367-1374. DOI: 10.1111/ijfs.13375
- Taylor, J.P., Zannini, E., Jacob, F. y Arendt, E.K. (2018). "A study on malt modification, used as a tool to reduce levels of beer hordeins". *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), pp. 143-147. DOI: 10.1002/jib.482
- Kerpes, R., Fischer, S. y Becker, T. (2017). "The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases". *Trends in Food Science & Technology*, 67, pp. 129-138. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.07.004.
- Ceccaroni, D., Sileoni, V., Marconi, O., De Francesco, G., Lee, E.G. y Perretti, G. (2019). "Specialty rice malt optimization and improvement of rice malt beer aspect and aroma". *LWT*, 99, pp. 299-305. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.09.060.
- Knorr, V., Wieser, H. y Koehler, P. (2016). "Production of gluten-free beer by peptidase treatment". *European Food Research and Technology*, 242(7), pp. 1129-1140. DOI: 10.1007/s00217-015-2617-5.
- Taylor, J.P., Jacob, F., Zannini, E. y Arendt, E.K. (2017). "Reduction of Hordein Content in Beer by Applying Prolyl Endoprotease to the Malting Process". *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3), pp. 262-268. DOI: 10.1094/ASBCJ-2017-3072-01
- Taylor, J.P., Jacob, F. y Arendt, E.K. (2015). "Fundamental study on the impact of silica gel and tannic acid on hordein levels in beer". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31, pp. 177-184. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.07.007.
- Benucci, I., Caso, M.C., Bavaro, T., Masci, S., Keršienė, M., Esti, M., (2020) "Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* immobilized on a food-grade carrier for the production of gluten-reduced beer". *Food Control*, 110. DOI 10.1016/j.foodcont.2019.106987
- Scherf, K.A., Wieser, H. y Koehler, P. (2018). "Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products". *Food Research International*, 110. pp. 62-72. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.021
- Kerpes, R., Knorr, V., Procopio, S., Koehler, P. y Becker, T. (2016). "Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation". *Journal of Cereal Science*, 68, pp. 93-99. DOI: 10.1016/j.jcs.2016.01.004
- Hager, A., Taylor, J.P., Waters, D.M. y Arendt, E.K. (2014). "Gluten free beer -A review". *Trends in Food Science & Technology*, 36(1), pp. 44-54. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.01.001
- Watson, H.G., Vanderputten, D., Van Landschoot, A. y Decloedt, A.I. (2019). "Applicability of different brewhouse technologies and gluten-minimization treatments for the production of gluten-free (barley) malt beers: Pilot- to industrial-scale". *Journal of Food Engineering*, 245, pp. 33-42. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2018.09.015
- Bilal, M. y Iqbal, H.M.N. (2019). "State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in food sector - current status and future trends". *Critical reviews in food science and nutrition*, , pp. 1-15. DOI: 10.1080/10408398.2019.1627284
- Singh, R.S., Singh, T., Pandey, A. (2019) "Microbial Enzymes – An Overview". *Advances in Enzyme Technology*, pp. 1-40. DOI. 10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7