



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

Fecha : 22/02/2017  
Página : 1/1

**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA de la alumna MARIA FERNANDA PEREZ GUERRERO, matrícula 2143802655, quien cumplió con los 140 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veinticuatro de febrero del 2017 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

MALTEO DE LA SEMILLA DE AMARANTO PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 180 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBADO

**JURADO**

**Presidenta**

**Secretario**

DRA. CLARA PELAYO ZALDIVAR

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA

**Vocal**

**Vocal**

MTRA. FRIDA PURA MALPICA SANCHEZ

DR. FRANCISCO RUIZ TERAN



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**División Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Posgrado en Biotecnología**

**MALTEO DE LA SEMILLA DE AMARANTO PARA LA  
ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Presenta:**

**IBI María Fernanda Pérez Guerrero**

**DIRECTOR**

**Dr. José Ramón Verde Calvo**

**ASESOR**

**Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía**

**ASESOR**

**Dr. Francisco Ruíz Terán**

**México, D.F. Febrero 2017**

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

Agradecimiento al CONACYT por la beca de Maestría número 614479.

Iztapalapa, CDMX 24 de febrero de 2017

El jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**MALTEO DE LA SEMILLA DE AMARANTO PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA  
ARTESANAL**

Que presentó:

María Fernanda Pérez Guerrero

Comité tutorial:

Director: Dr. José Ramón Verde Calvo

Asesor: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Asesor: Dr. Francisco Ruíz Terán

Jurado:

Presidente:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Dra. Clara Pelayo Zaldívar

Secretario:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Vocal:

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Mtra. Frida Pura Malpica Sánchez

Vocal:

Universidad Nacional Autónoma de México – C.U.

Dr. Francisco Ruíz Terán

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO 1. AMARANTO</b> .....	<b>4</b>
1.1 TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA .....	7
1.2 AMARANTINA .....	10
<b>CAPÍTULO 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AMARANTO</b> .....	<b>12</b>
2.1 CARBOHIDRATOS.....	12
2.2 PROTEÍNAS .....	12
2.3 LÍPIDOS.....	13
2.4 VITAMINAS Y MINERALES .....	14
<b>CAPÍTULO 3. CERVEZA</b> .....	<b>15</b>
3.1 ELABORACIÓN DE CERVEZA.....	15
3.1.1 REMOJO.....	19
3.1.2 GERMINACIÓN.....	20
3.1.3 SECADO .....	22
3.1.4 MOLIENDA .....	23
3.1.5 MACERACIÓN .....	24
3.1.6 COCCIÓN .....	25
3.1.7 FERMENTACIÓN.....	26
3.1.8 MADURACIÓN.....	28
<b>CAPÍTULO 4. ALMIDÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 5. CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE AMARANTO DURANTE LA GERMINACIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO 6. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN</b> .....	<b>35</b>
6.1 MÉTODOS HIDROLÍTICOS.....	38
6.1.1 HIDRÓLISIS QUÍMICA.....	38
6.1.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	38
<b>CAPÍTULO 7. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 8. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 9. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
9.1 OBJETIVO GENERAL .....	45
9.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
<b>CAPÍTULO 10. METODOLOGÍA</b> .....	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 11. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
11.1 ANÁLISIS DE LA SEMILLA DE AMARANTO .....	47
11.2 OBTENCIÓN DE MALTA DE AMARANTO .....	47
11.3 HIDRÓLISIS DE LA MALTA DE AMARANTO .....	49

11.3.1 NATURAL .....	49
11.3.2 QUÍMICA.....	50
11.3.3 ENZIMÁTICA .....	51
11. 4 ELABORACIÓN DE CERVEZA.....	53
11.4.1 COCCIÓN .....	53
11.4.2 FERMENTACIÓN-MADURACIÓN .....	54
11.5 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DIRECTOS.....	54
11.6 DETERMINACIÓN DE PH .....	55
11.7 DETERMINACIÓN DE ALCOHOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES..	55
11. 8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	56
<b>CAPÍTULO 12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
12.1 ANÁLISIS DE LA SEMILLA DE AMARANTO .....	65
12.1.1 PRUEBA DE VIABILIDAD.....	65
12.2 PRUEBAS DE GERMINACIÓN.....	68
12.3 SACARIFICACIÓN.....	77
12.3.1 NATURAL .....	77
12.3.2 QUÍMICA.....	86
12.3.3 ENZIMÁTICA .....	91
<b>CAPÍTULO 13. PORCENTAJE DE ALCOHOL EN CERVEZAS MADURAS ....</b>	<b>101</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO B. CURVA PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ETANOL PRESENTE EN LAS CERVEZAS DE AMARANTO.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO C. ANOVAS - TUKEY .....</b>	<b>113</b>

## ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Amaranthus hypochoeriacus</i> .....	4
Figura 2. Botanas de amaranto.....	6
Figura 3. Componentes de la planta y semilla de amaranto. ....	7
Figura 4. Estructura transversal y longitudinal de las semilla de amaranto <i>A. cruentus</i> . ....	8
Figura 5. Estructura del ácido betalámico y betalaína.....	10
Figura 6. Estructura de la amarantina (Gins et al., 2002).....	11
Figura 7. Estructura del grano de cebada. ....	16
Figura 8. Esquema del proceso de elaboración de cerveza (Enciclopedia Británica, 2003). ....	17
Figura 9. Cebada germinada (malta de cebada).....	21
Figura 10. Ruta bioquímica de la fermentación.....	27
Figura 11. Estructura química del almidón. ....	30
Figura 12. . Estructura química de la amilopectina y amilosa.....	31
Figura 13. Vista en microscopía electrónica de barrido de los cambios en los gránulos de almidón de quinoa durante 0, 24, 48 y 72 horas de germinación. (Hager et al., 2014). ....	34
Figura 14. Esquema general del trabajo experimental realizado.....	46
Figura 15. Diagrama de elaboración de cerveza.....	53
Figura 16. Semilla de amaranto. ....	65
Figura 17. Reducción Sal de Tetrazolio (López, 2012). ....	66
Figura 18. Semillas de amaranto en sal de tetrazolio y tinción después de la reacción.....	67
Figura 19. Corrosión de cajas de aluminio durante la germinación con NaOH. ....	70
Figura 20. . Estructura cristalina del amaranto.....	70
Figura 21. Día 2, semillas de amaranto germinados con NaOH (Tratamientos A y B).....	71
Figura 22. Día 2, semillas de amaranto germinados con NaOH (Tratamientos C y D). ....	71
Figura 23. Tamaño de las raíces de semillas de amaranto germinadas. ....	72
Figura 24. (1) Vista en microscopio (10 x) de la raíz de la semilla de amaranto (Tratamiento D). (2) Vista en microscopio (10 x) de la raíz de la semilla de amaranto (Tratamiento C). ....	73
Figura 25. Diagrama de flujo para obtener malta de amaranto. ....	75
Figura 26. Maceración escalonada para obtención del mosto. ....	77
Figura 27. Hidrólisis natural en semilla y malta de amaranto. ....	79
Figura 28. Maceración durante 0, 1, 2 y 3 horas de la semilla de amaranto. ....	79
Figura 29. Malta de amaranto macerada durante distintos tiempos.....	81
Figura 30. Hidrólisis natural. Estimación de la intensidad de la fermentación por el CO <sub>2</sub> y espuma generados. ....	84
Figura 31. Cerveza madura de amaranto 100 %.....	85
Figura 32. Hidrólisis química de la malta de amaranto.....	87
Figura 33. Cerveza elaborada por hidrólisis química. ....	90

<i>Figura 34. Efecto de la hidrólisis enzimática Amaranto: Cebada (80:20) en la intensidad de la fermentación juzgada por el CO<sub>2</sub> y espuma desprendida. ....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 35. Efecto de la hidrólisis enzimática Amaranto: Cebada (90:10) en la intensidad de la fermentación juzgada por el CO<sub>2</sub> y espuma desprendida. ....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 36. Enzimas comerciales. ....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 37. Tubos mostrando la reacción con el reactivo DNS.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 38. Cromatograma de la corrida del etanol. ....</i>	<i>111</i>

## ÍNDICE TABLAS

<i>Tabla 1. Descripción de los tratamientos germinativos evaluados. ....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del pH en el mosto. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 3. Tratamientos para la hidrólisis química de la malta de amaranto.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 4. Tratamientos para la hidrólisis enzimática con cebada (Etapa 1). ....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 5. Tratamiento para la hidrólisis con enzimas comerciales (Etapa 2).....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 6. DCA para el análisis de la semilla de amaranto. ....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 7. DCA para la obtención de malta de amaranto.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 8. DCA para la hidrólisis natural de la semilla y malta de amaranto.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 9. DCA para la hidrólisis química de la semilla y malta de amaranto. ....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 10. DCA para la hidrólisis enzimática utilizando cebada (Etapa 1). ....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 11. DCA para la hidrólisis enzimática utilizando enzimas comerciales (Etapa 2). ....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 12. DCA para cuantificar el porcentaje de alcohol en cervezas maduras....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 13. Viabilidad de la semilla de amaranto. ....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 14. Tratamientos germinativos evaluados en la semilla de amaranto. ....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 15. Hidrólisis natural. ....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 16. Tratamiento de hidrólisis natural ajustando el pH.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 17. Tratamientos evaluados en la hidrólisis química. ....</i>	<i>86</i>
<i>Tabla 18. Hidrólisis enzimática con la adición de cebada. ....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 19. Hidrólisis enzimática con enzimas comerciales (Etapa 2). ....</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 20. Porcentaje de alcohol en cervezas maduras.....</i>	<i>101</i>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis natural de la semilla y malta de amaranto.....</i>	<i>82</i>
<i>Gráfica 2. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis química de la semilla y malta de amaranto.....</i>	<i>89</i>
<i>Gráfica 3. Cuantificación de azúcares por hidrólisis enzimática adicionando cebada. ....</i>	<i>92</i>
<i>Gráfica 4. Cinética de extracción de azúcares reductores por enzimas comerciales. ....</i>	<i>96</i>
<i>Gráfica 5. Cinética de hidrólisis enzimática con glucoamilasa. ....</i>	<i>97</i>
<i>Gráfica 6. Cinética de maceración escalonada utilizando glucoamilasa. ....</i>	<i>99</i>



*† En memoria del Dr. Marco Antonio  
Gerardo Ramírez Romero, por su infinito  
apoyo, luz y amistad.*

## **Agradecimientos**

A mi casa abierta al tiempo, UAM, por permitirme continuar mis estudios relacionados a la cerveza, adquirir nuevas bases, conocimientos, experiencias y amistades. A CONACYT por su apoyo durante los estudios realizados.

Al Dr. José Ramón Verde Calvo, por darme la oportunidad y confianza de crecer académicamente. Gracias por su orientación, apoyo, críticas constructivas, paciencia y humor durante la maestría.

Al Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía, por compartirme sus conocimientos con ese humor tan característico y siempre estar presente.

Al Dr. Gerardo Ramírez Romero, por ser la esencia que guió mi caminar durante la licenciatura y maestría. ¡Gracias por todo!

Al Dr. Sergio Huerta por su paciencia y asesorías a pesar de mis 387 molestias.

A los jurados de este trabajo, gracias por su disposición, tiempo y comentarios.

A mis compañeros y colegas del laboratorio de Enología y Sensorial. Adriana, Daniela, Angélica y Miguel, gracias por compartir y orientarme en técnicas y metodologías durante los análisis. Luis, Aurora, Alfredo y Araceli, gracias por tantas risas y momentos compartidos. Gracias a todos ustedes, por hacer más alegres los días de investigación, comidas y platicas. Los quiero mucho ♥

A mis amigos ultimateros por entender las faltas a los entrenamientos, pero en cancha siempre presente. ¡Up!

A mis queridos nómadas: Paulina, Christian, Kenia, Eduardo, Gerardo, Angélica y Luisa, por compartir momentos de estudio, intensidad, alegrías, tristezas y merequetengue. ¡Los quiero mucho! Fue un verdadero placer coincidir y hacer crecer una amistad que espero dure mucho tiempo más.

A Mauricio, por tu apoyo en todo momento. Te amo. ♥

A mi familia Pérez-Guerrero, por echarme porras a pesar de la distancia. Abuelita Silvia ¡si se pudo!

Y sobre todo, a mis tres pilares: Francisco, Melly y Mónica, porque el universo no encontró mejor lugar para verme crecer física, mental, y profesionalmente. Gracias familia, por amarme tanto y caminar a mi lado en los momentos buenos y malos. ¡Los amo tanto! Este logro es por y para ustedes.

A ti ♥ porque me impulsarás a realizar cosas aún mejores, por ti, por mí y por nosotros.

## Resumen

El malteo de un cereal es un punto clave en la elaboración de las cervezas ya sean industrializadas o artesanales, el uso de otros pseudocereales como el amaranto es un nicho de oportunidad, por lo que el objetivo de este trabajo fue estandarizar el proceso de malteo de la semilla de amaranto para lograr un germinado libre de contaminación, y comparar 3 métodos hidrolíticos del almidón para obtener una concentración de azúcares fermentables para la elaboración de una cerveza artesanal 100 % de amaranto.

La semilla de amaranto contiene una concentración de almidón del 60 %, siendo adecuado para que pueda ser transformado durante la elaboración de una cerveza artesanal. El proceso se inicia con la obtención de malta de amaranto libre de contaminación, aplicando un remojo de 4 horas e hidratando por aspersion con agua cada 3 horas por 3 días a temperatura de 22 °C.

El poder diastásico de la malta de amaranto, corresponde a la cuarta parte del reportado para la cebada, por lo que se sometió el almidón de la malta de amaranto a 3 métodos hidrolíticos para la liberación de azúcares reductores: natural, químico y enzimático. Con el método natural, no se logró extraer más del 4 % de azúcares reductores, obteniendo una cerveza del 1% de alcohol. Realizando la hidrólisis química por 60 minutos, se obtuvo un porcentaje de azúcares reductores del 12.58%, y una cerveza con graduación alcohólica de 2.73% pero con notas saladas, por lo cual no tuvo aceptación sensorial. La hidrólisis mediante las enzimas presentes en la malta de cebada no arrojaron diferencia significativa en el porcentaje de azúcares extraídos, obteniendo una cerveza de 1.53% Alc. Vol. Finalmente, se evaluó la adición de las enzimas comerciales: amilasas y glucoamilasas, resultando el método menos agresivo para la obtención de carbohidratos fermentables presentes en el mosto de la malta de amaranto sin afectar los atributos sensoriales presentes en la cerveza tipo lager, estimando una concentración de azúcares reductores del 16.91 %.

## Capítulo 1. Amaranto

Al mencionar el maíz, el frijol, el tomate, el chile, el aguacate, la calabaza, el cacao, la vainilla, hongos comestibles y el amaranto, se hace referencia a los cultivos alimentarios más importantes para la humanidad en Mesoamérica. Este fue en tiempos prehispánicos, uno de los alimentos básicos de América, casi tan importante como lo eran el maíz y el frijol en el Valle de México, o la papa, el maíz y la quínoa en Sudamérica.

En la actualidad, los niveles de nutrición de la gran mayoría de los pueblos indígenas y campesinos son de insuficiencia, y no cubren los mínimos requerimientos nutricionales. El contenido proteínico de sus dietas resulta uno de los renglones más deficitarios, a pesar que el amaranto fue uno de los pilares de la alimentación balanceada de las culturas prehispánicas.



**Figura 1. Planta de *Amaranthus hypocondriacus*.**

El amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae*, la cual comprende más de 60 géneros y cerca de 800 especies de plantas herbáceas anuales. Existen tres especies que producen grandes inflorescencias repletas de semillas comestibles, y que han sido domesticadas independientemente de las especies arbustivas: *A. hypocondriacus* (Figura 1) y *A. cruentus*, que se cultivan en México y Guatemala, respectivamente, y *A. caudatus*, que se cultiva en Perú mejor conocida como quínoa (Morales, 2009).

El amaranto (huautli o huazontle), palabra proveniente del griego *amaraino* que significa “la que no se marchita”, posee semillas alta resistencia al ambiente sin importar la calidad del suelo donde se cultiven, sobreviviendo a zonas con condiciones climáticas extremas, desde ambientes secos hasta húmedos y desde regiones altas hasta el nivel del mar.

Esta cualidad de resistencia y adaptabilidad a condiciones agronómicas adversas, genera una oportunidad de producción para los pequeños productores rurales, en comparación con los cultivos más comunes en México. Por ejemplo, en un análisis de 1987 a 2014, el amaranto con un promedio del 3.3% de superficie dedicada a su cultivo sufrió algún grado de siniestro, mientras que para el caso de otros cultivos fundamentales en la dieta mexicana como el arroz y el maíz, estas cifras alcanzaron en promedio el 8.7 y 11.4% respectivamente (Martínez Salvador, 2015).

Cuando escuchamos la palabra amaranto, la primera imagen que llega a la mente es “alegría”, la botana con gran aceptación por el consumidor (Figura 2). Sin embargo, el amaranto puede consumirse casi desde la siembra, en forma de germinado, de hojas tiernas en ensalada, o molidas para servirse en forma de sopa. Su digestibilidad es muy alta, alcanzando entre el 80 y el 92% (Hernández *et al.*, 1998).

Puede aportar alimento a la familia a todo lo largo del ciclo de cultivo por su abundante producción de hojas, que son ricas en vitaminas, proteínas y minerales, entre los que destaca el hierro, además del calcio y el fósforo. La hoja de amaranto tiene más hierro que la espinaca, lo que la hace ideal para evitar la anemia que afecta principalmente a mujeres embarazadas y a niños.



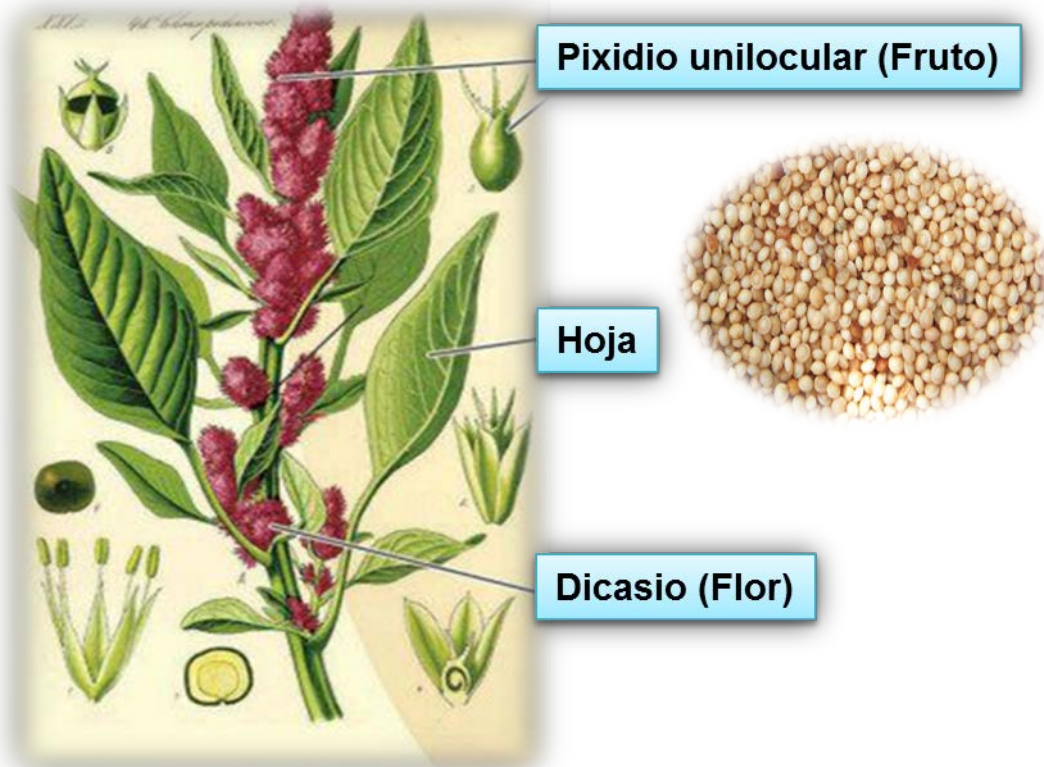
**Figura 2. Botanas de amaranto.**

Pero más allá de ser solamente una botana, esta semilla posee características notables para el área de alimentos y bebidas, en las que no solamente el objetivo es la transformación de la semilla en un producto con valor agregado, sino también que sea un alimento funcional. Huerta *et al.*, y Porr *et al.*, en el 2012, reportan en la semilla la presencia de péptidos bioactivos con funciones hipertensivas, antioxidantes, y promotores en la síntesis de insulina, además de ser una fuente de alimento libre de gluten para las personas con alergia a estas proteínas.

La versatilidad de la semilla de amaranto permite que pueda ser transformada en una amplia variedad de productos para la alimentación y para combatir la desnutrición; también puede transformarse en productos de consumo básico como cereales y barras; harinas para pan, tortillas y galletas; almidones; aceites; colorantes vegetales, bebidas nutricionales, botanas, suplementos alimenticios, leche y leche en polvo e incluso en comida para bebés como fórmulas y papillas.

## 1.1 Taxonomía y Morfología

El amaranto es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, especie anual de crecimiento rápido, herbácea o arbustiva de diversos colores (verde, morado, café o púrpura) que se reproduce mediante la autopolinización, principalmente por la acción del viento.



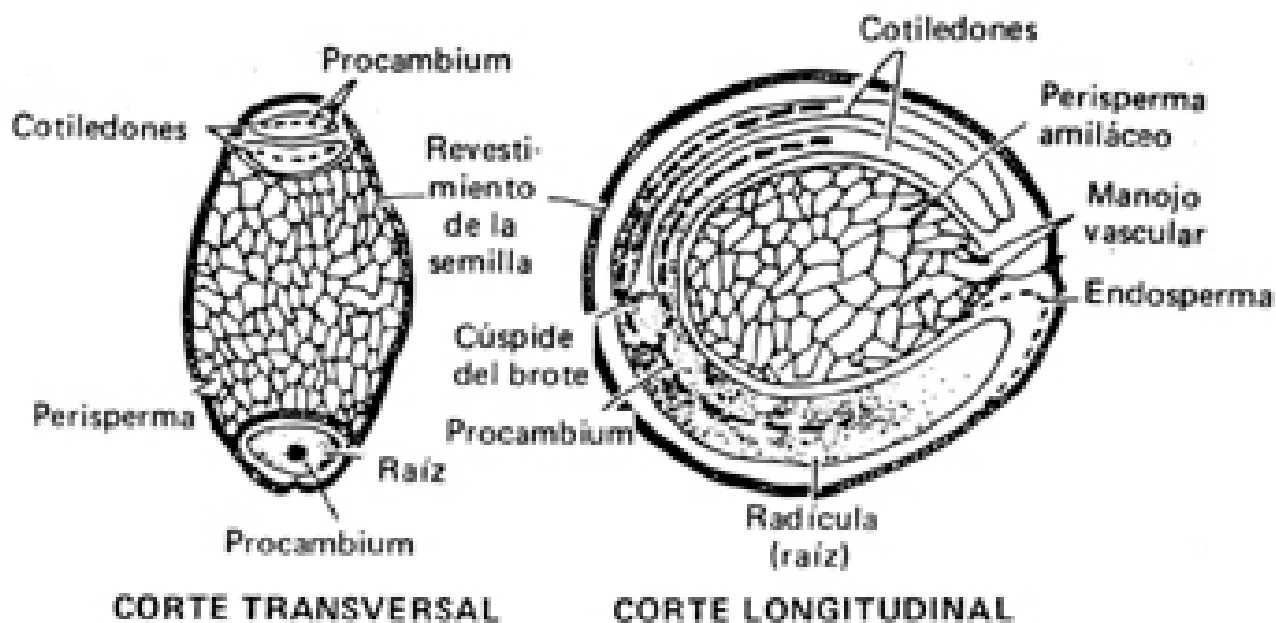
**Figura 3. Componentes de la planta y semilla de amaranto.**

El amaranto está conformado por: un fruto, clasificado como una cápsula pequeña que botánicamente se conoce como pixidio unilocular, el cual durante la madurez de la planta se deja caer, para poner al descubierto la parte inferior llamada urna que contiene las semillas, Figura 3.



Las semillas son pequeñas, lisas, brillantes de alrededor de 1 a 1.5 mm de diámetro; ligeramente aplanadas de forma lenticular, de colores variados como blanco, negro, amarillo, café, dorado, rojo, rosa y púrpura. La flor tiene proporción un color de rojo a violeta característico, atribuido a la presencia de betalaínas, pigmentos hidrosolubles con propiedades antioxidantes (Marañón-Ruiz, 2012).

La semilla se compone de 4 partes: el epispermo, constituido por una capa de células muy finas; el endospermo, que es la segunda capa; el embrión, unido a dos cotiledones y cercano al perispermo, ricos en proteínas y almidones, respectivamente (Figura 4). El embrión es de forma circular con las puntas tocando el extremo de los cotiledones y consiste de un eje radical, hipocotilo y dos cotiledones; el embrión rodea al perispermo y durante el desarrollo utiliza la mayor parte de las reservas contenidas en el endospermo.



**Figura 4. Estructura transversal y longitudinal de las semilla de amaranto *A. cruentus*.**

La reserva de nutrimentos como los lípidos, proteínas, hidratos de carbono, fosfato orgánico y varios nutrimentos inorgánicos están mayoritariamente presentes en la semilla, estas reservas no están almacenadas de manera uniforme en todos los tejidos de la semilla. La mayor parte de las proteínas se encuentran contenidas en cuerpos proteínicos, y los lípidos e hidratos de carbono están presentes dentro de las semillas.

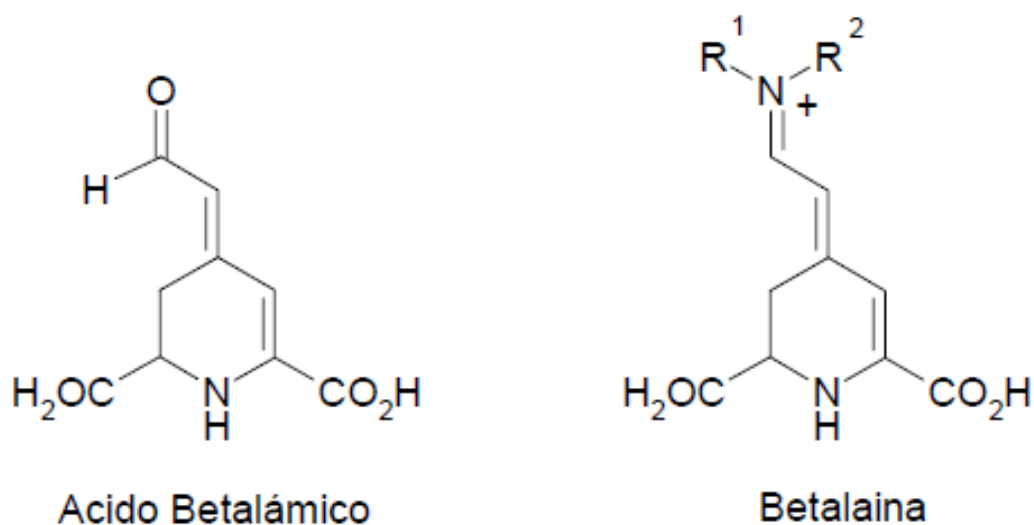
Los hidratos de carbono se almacenan como almidón en los pástidos de las células del perispermo formando una pared de polisacárido; las células de este perispermo almidonoso tienen una pared delgada llena de gránulos de amilosa y amilopectina, los cuales aumentan de volumen con gran facilidad (Morales, 2009).

La raíz es pivotante con abundantes ramificaciones y múltiples raicillas delgadas, que se extienden con rapidez después de que el tallo se comienza a ramificar, lo que favorece la absorción de agua y nutrimentos. Las hojas del tallo y el tallo mismo van de rojo a verde, y contienen clorofila y pigmentos como carotenos y betalaínas (Morales, 2009).

## 1.2 Amarantina

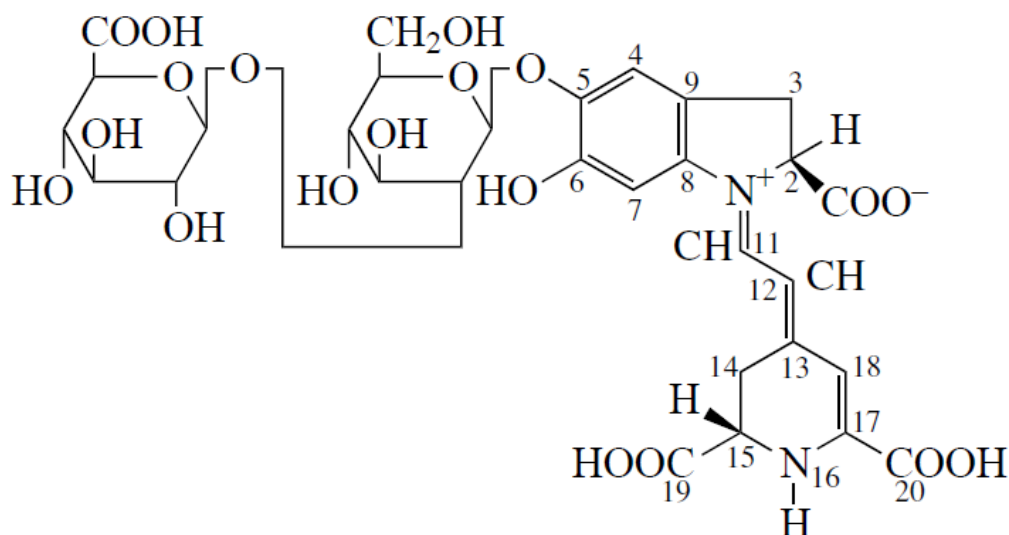
La amarantina es una globulina 11S, proteína de reserva que contiene dos subunidades unidas por un enlace disulfuro, que se encuentra en gran cantidad en las semillas de amaranto. La amarantina es un pigmento con propiedades nutracéuticas de color violeta presente en las hojas de algunas especies de *Amaranthus* (Arano-Varela *et al.*, 2010).

Las betalaínas, pigmentos hidrosolubles que existen como sales en las vacuolas de las células vegetales, están constituidas por dos grupos de estructuras: las betacianinas de color rojo y las betaxantinas de color amarillo. Dichos compuestos son derivados del ácido betalámico (Figura 5), ampliamente utilizado en el área de alimentos como colorante. Son derivados de la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico, los cuales pueden ser leídos dentro de un espectro de absorción de luz que va desde los 480 nm (para las betaxantinas amarillas) hasta los 540 nm (para las betacianinas rojas) (Marañón-Ruiz, 2011).



**Figura 5. Estructura del ácido betalámico y betalaina.**

La amarantina (Figura 6) pertenece a las betacianinas, compuestos heterocíclicos nitrogenados encontrados sólo en plantas del orden *Caryophyllales*. La mayoría de las betacianinas son referidas, usualmente, a nombres derivados de las plantas en donde se encuentran. Por ejemplo, la betaína, la primera en ser aislada de las raíces del betabel (*Beta vulgaris L.*) y la amarantina aislada de las plantas del género *Amaranthus*.



**Figura 6. Estructura de la amarantina (Gins *et al.*, 2002).**

Las betacianinas han sido investigadas recientemente debido a su presencia en diversas plantas, sin embargo aún no se cuentan con técnicas analíticas adecuadas que permitan ampliar su conocimiento en estos pigmentos color rojo-violeta. Una de las especies más investigadas con este pigmento corresponde a la familia de las *Amaranthaceae* y se le atribuyen fuertes propiedades antioxidantes, así como interesantes compuestos naturales quimiopreventivos (Gerold *et al.*, 2014), compuestos naturales, sintéticos o biológicos que previenen, revierten, suprimen o evitan la progresión del cáncer invasivo.

## Capítulo 2. Composición química del amaranto

### 2.1 Carbohidratos

El almidón del amaranto es de tipo granuloso o ceroso, se tiñen de ámbar o púrpura en presencia de yodo y está compuesto por una fracción lineal, la amilosa (2-5%), formada por 500 a 2,000 unidades de  $\alpha$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4; este componente contribuye a las características de la retrodegradación, fenómeno que se define como la insolubilización y precipitación de las moléculas de amilosa. También se encuentra formada por una fracción ramificada, amilopectina (95-98%), constituida por una cadena lineal en la que cada 25 a 30 unidades de  $\alpha$ -D-glucosa, se presentan ramificaciones unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6; esta fracción no gelificante, contribuye a la viscosidad, lo que da consistencia a los alimentos debido a su gran solubilidad. Este glucano, es el principal componente en la semilla de amaranto, se almacena en el perispermo y su concentración oscila entre 48 al 69 % del peso de la semilla (Palma, 2010).

### 2.2 Proteínas

La semilla de amaranto contiene alrededor de 13 a 18 % de proteínas, siendo estas uno de los componentes más estudiados (identificación y cuantificación de los aminoácidos y proteínas presentes). Los análisis de composición señalan que los contenidos de proteínas crudas, lípidos, fibra y cenizas del amaranto por lo general son más altos que los de los cereales, mientras que la proporción de hidratos de carbono es más baja.

Las proteínas del amaranto se encuentran principalmente en el embrión (65 %) a diferencia de los cereales, como el maíz y arroz, o leguminosas, como la soya que tienen 80 % de sus proteínas en el endospermo.

Las fracciones presentes en la semilla de amaranto corresponden en promedio a 20.7 % de albúmina, 19.2 % de globulinas, 2.2 % de prolaminas, 44 % de gluteínas y un residuo de proteína total de 13.4 %.

La globulina es la principal proteína de almacenamiento en el grano, es rica en lisina y soluble en sales; las propiedades nutricionales que se le han atribuido al amaranto se deben a esta proteína. Las albúminas constituyen la otra fracción de proteínas que se encuentra en mayor proporción en la semilla, caracterizada por su solubilidad en agua o en soluciones con baja fuerza iónica. La albúmina contiene de 16 a 18 % de metionina, conjunto de polipéptidos y la composición de aminoácidos derivados muestra una gran proporción de lisina, leucina, treonina, fenilalanina, valina y aminoácidos azufrados (Morales, 2009).

El conjunto de globulinas y prolaminas puede ser una alternativa de péptidos bioactivos, los que se pueden encontrar inactivos en la secuencia de la proteína intacta y pueden ser liberados por la acción de las enzimas proteolíticas durante la digestión gastrointestinal.

## **2.3 Lípidos**

Los contenidos de lípidos de las diferentes especies de amaranto van de 6.1 a 10.9 % y son mayores que en los cereales. La mayor parte de los lípidos del grano se ubica en la fracción testa-embrión, que representa el 25 % del peso de la semilla de amaranto. La fracción de lípidos del grano contiene aproximadamente 77 % de ácidos grasos insaturados, con el ácido linoléico como fracción predominante. La relación de ácidos grasos saturados a insaturados es de 1:3. Se han encontrado en el amaranto varios agentes potencialmente importantes en la reducción del colesterol, tales como la fibra dietética, el escualeno, los tocotrienoles y los isoprenoides (Morales, 2009).

## **2.4 Vitaminas y minerales**

Los nutrientes inorgánicos del grano de amaranto se hallan en el epispermo y el embrión. El contenido de calcio, magnesio, boro, hierro y aluminio es mayor que en las semillas de otros cereales. Entre las vitaminas que contiene el grano de amaranto, la riboflavina se encuentra en mayor proporción que en otros alimentos, como los cereales e incluso que en la leche, y solo es menor que en el huevo. Otras vitaminas que posee el grano de amaranto son tiamina, niacina y ácido ascórbico.

## Capítulo 3. Cerveza

### 3.1 Elaboración de cerveza

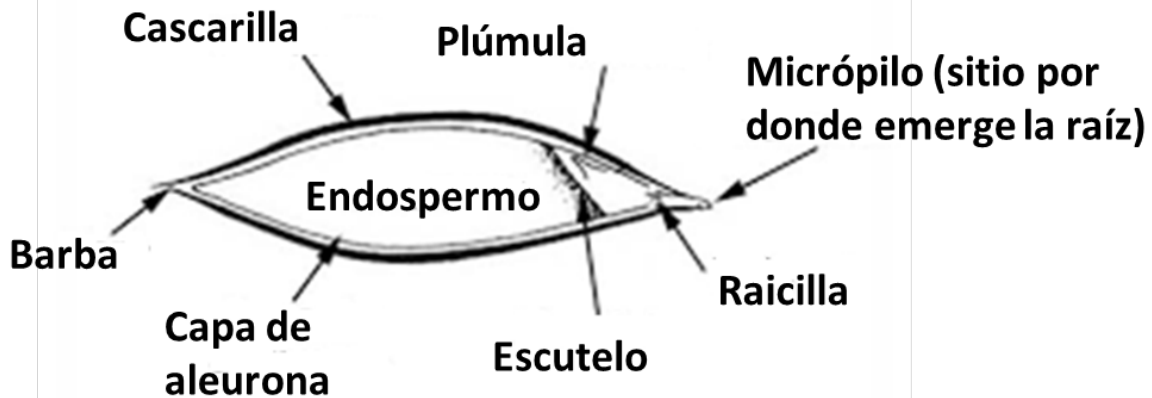
La fabricación de la cerveza se remonta a épocas de los asirios y los egipcios, solo hace aproximadamente 100 años se empezó a estudiar de forma rigurosa. Se considera una industria agrícola, por las materias primas que se emplea, categoría en las que caben las otras industrias de la fermentación (Molina *et al.*, 1989).

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada, elaborada principalmente con agua, lúpulo, *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo responsable de transformar los azúcares de la cebada en alcohol y CO<sub>2</sub>.

La cebada pertenecen a la especie *Hordeum vulgare* miembro de la tribu *Triticeae* de la familia *Gramíneae*. Estas plantas se caracterizan por tener espiguillas unifloras, usualmente provistas de raquilla; en el eje de la espiga salen unas raíces llamadas primarias, que sirven a la joven planta para anclarse al suelo y extraer de éste agua y nutrientes durante la primera semana de vida. Del otro extremo de la semilla sale un órgano delgado y blanquecino que se une a ésta con una estructura situada prácticamente en la superficie del suelo, es el mesocótilo, cuya misión es transportar agua y nutrientes durante los primeros días de germinación (Molina *et al.*, 1989).

El grano maduro de cebada puede variar ampliamente de tamaño, desde 5 a 80 mg de peso seco, aunque lo normal es que oscile entre 35 y 40 mg. De este peso, aproximadamente el 10 % corresponde a las cubiertas protectoras y pericarpio; el 3 % al embrión y el 87 % restante al endospermo, testa, capa de aleurona y demás estructuras del grano (Figura 7) (Molina *et al.*, 1989).





**Figura 7. Estructura del grano de cebada.**

Durante las primeras etapas de la formación del endospermo la velocidad de crecimiento es relativamente lenta, incrementándose progresivamente durante la fase de expansión hasta hacerse casi lineal en función del tiempo. Durante la fase inicial de crecimiento, tiene lugar la acumulación de la mayor parte del almidón en las células del endospermo y el grano crece exclusivamente en anchura, ya que su máxima longitud se alcanza bastante pronto, aproximadamente a los siete días después de la fecundación.

La elaboración de la cerveza consta de operaciones unitarias, mostradas en la Figura 8.

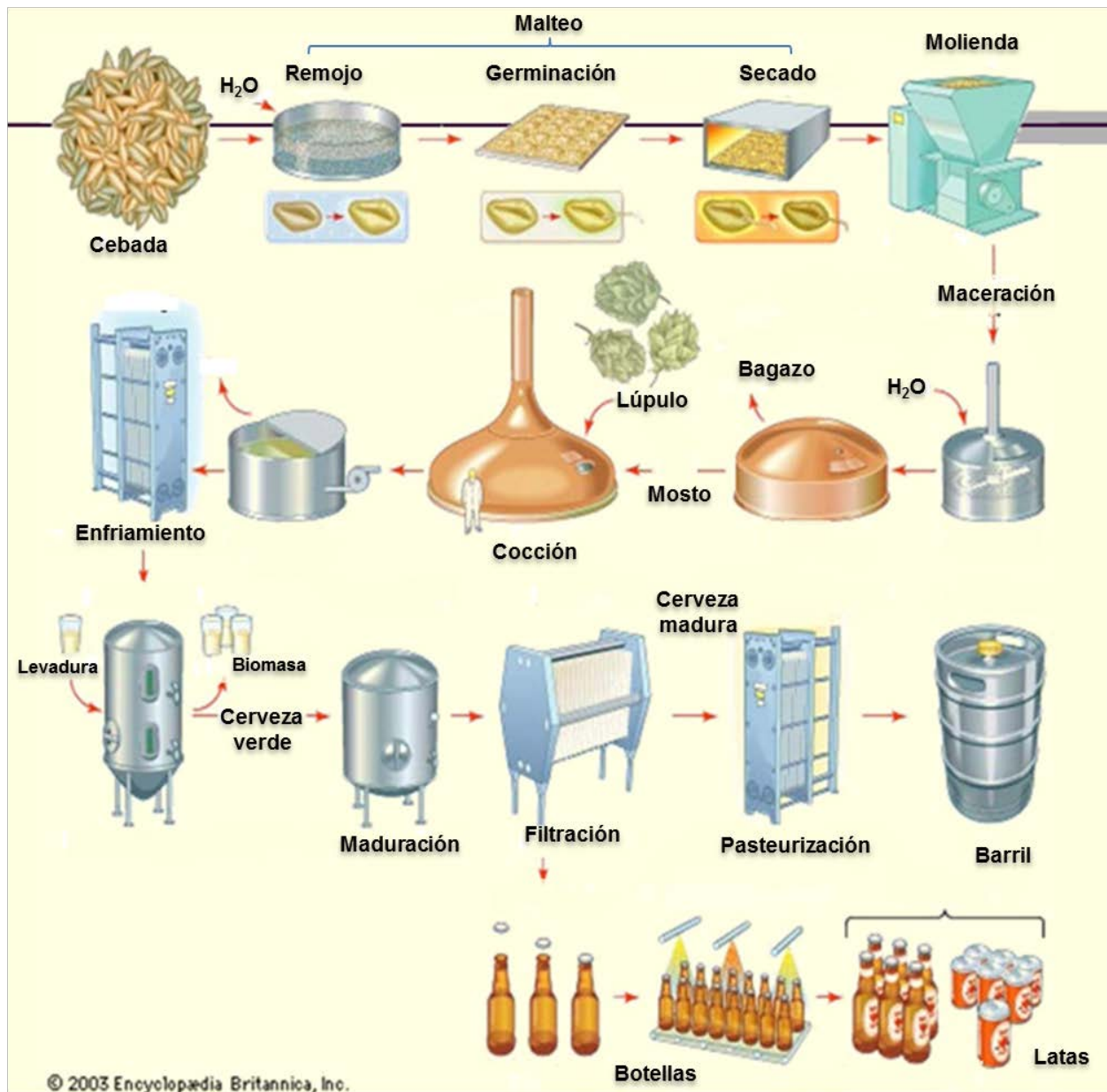


Figura 8. Esquema del proceso de elaboración de cerveza (Enciclopedia Británica, 2003).

El grano de cebada germinado, mejor conocido como malta, es la principal materia prima para la elaboración de cerveza. Podemos sintetizar al proceso de malteado como una germinación controlada, cuyo objetivo es preparar y transformar las reservas nutritivas del grano a sustratos apropiados para la producción de esta bebida e involucra remojo, germinación y secado.

El malteado, ya que como tal, el grano de cebada no produce un extracto fermentable por la levadura, si se mezcla el grano molido con agua caliente lo único que se obtiene es un engrudo imposible de manipular. Por lo tanto, el grano debe sufrir un cambio en su estructura comenzando con la germinación para que, de esta manera se produzcan enzimas que hidrolicen sustratos contenidos en el grano y permitirán su incorporación al agua (Molina *et al.*, 1989).

Los almidones presentes en la cebada son hidrolizados por la acción de enzimas, principalmente de la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasa, las cuales van a atacar los extremos reductores de los azúcares, dando como resultado dextrinas que le proporcionarán cuerpo y estabilidad a la cerveza, así como maltosa, azúcar fermentable que nos dará como producto final etanol.

### 3.1.1 Remojo

El remojo se realiza con el fin de romper el estado latente de la semilla o grano y así activar las enzimas que se encargan de degradar el almidón y las proteínas en pequeñas estructuras fácilmente consumidas por las levaduras. Para que el grano comience a germinar se deben cumplir las siguientes condiciones: humedad suficiente, temperatura conveniente y presencia de oxígeno (Molina *et al.*, 1989).

Durante el remojo, la absorción de agua al interior del grano es rápida, aunque después desciende gradualmente; la semilla de cebada incrementa su tamaño hasta un 25% y ocurre un ablandamiento de tejidos por hidrólisis de los componentes presentes en las láminas medias y pared celular. La capacidad de hidratación de la cebada depende de la variedad, del tamaño del grano, de la cantidad de la muestra a remojar, de la temperatura y tiempo de remojo, entre otros factores (De Meo *et al.*, 2011)

Durante el proceso de remojo, el agua penetra rápidamente a través de la cascarilla, la cubierta y entra al grano a través del micrópilo. El embrión toma rápidamente agua; el endospermo, en cambio, se hidrata más lentamente. En el embrión ocurre la producción de ácido giberélico (AG) y otras giberelinas que se difunden hacia el endospermo, los cuales estimulan la producción de las enzimas amilasas, proteasas,  $\beta$ -D-glucanasas y lipasas.

El remojo consta de dos fases importantes: los períodos de inmersión (suministro constante de agua) y los períodos de oxigenación (suministro de oxígeno). El oxígeno es necesario porque la respiración del embrión aumenta significativamente lo que crea una demanda importante de este gas en el agua de remojo, además es promotor de la formación de  $\alpha$ -amilasa.

Normalmente se recomienda realizar el remojo a temperaturas próximas a 15 °C con una duración total de 2 a 3 días; el tiempo anterior debe distribuirse de tal manera que cada 6 u 8 h los períodos de remojo sean sustituidos por períodos de oxigenación conocidos como descansos de aire. El remojo se interrumpe por drenaje, a las 12- 24 horas; Una vez remojados los granos se someten a germinación (Hough, 1990).

### **3.1.2 Germinación**

Una vez que el grano ha absorbido la cantidad necesaria de agua, dispone de oxígeno y está a la temperatura conveniente, el embrión pasa del estado latente a un estado de actividad caracterizada por la secreción de enzimas que se difunden por todo el endospermo y, después de disolver las paredes celulares, desdoblan el almidón, las proteínas, los fosfatos orgánicos, las grasas, etc. (Molina *et al.*, 1989).

Completado el remojo, los granos se transfieren al equipo de germinación. En los sistemas tradicionales, los granos se extienden sobre un suelo para el malteado, en una capa uniforme de unos 25 cm de profundidad.

El objetivo de la germinación es la formación de enzimas necesarias para llevar a cabo las transformaciones, ya sea la degradación de parte de las sustancias nitrogenadas y de los fosfatos solubles, o bien desagregar los gránulos de almidón y facilitar su hidrólisis. Tradicionalmente, la germinación se lleva a cabo a temperaturas entre 16 y 20 °C, en este intervalo se obtiene un crecimiento eficiente de las raicillas de la cebada.

El primer signo de la germinación es una protuberancia de la coleorriza o camisa de la raíz, posteriormente producirá raicillas o brotes (Figura 9) en esta fase es donde realmente se estimula la producción de enzimas que hidrolizarán al almidón.

Después de dos días de germinación, finaliza la producción de giberelinas, precisamente la capacidad de las cebadas para producir enzimas hidrolíticas, depende de la cantidad y viabilidad de las giberelinas generadas.



**Figura 9. Cebada germinada (malta de cebada).**

Los granos germinados se traspasan a un horno donde son tratados con temperaturas bajas o altas, dependiendo del tipo de cerveza que se quiera producir o bien una combinación de éstas, para detener la actividad de las enzimas y así evitar una excesiva hidrólisis del almidón, también para reducir la humedad hasta 2-5%, y con ello mantener la estabilidad de la malta durante el período de almacenamiento, así como introducir las características finales de color y sabor a la cerveza (Hough, 1990).

Es imprescindible que al terminar la germinación de la malta el almidón esté completamente desagregado, pues de lo contrario las enzimas no podrán penetrar en las partes en que no esté, y por consiguiente, no se producirán desdoblamientos como el de las materias nitrogenadas, lo que conlleva una cerveza imperfecta de gusto e inestable (Molina *et al.*, 1989).

### **3.1.3 Secado**

El secado se caracteriza por manejar temperaturas que no provoquen daño a las enzimas desarrolladas durante la germinación ( $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas,  $\beta$ -glucanasas y proteasas), las cuales son muy sensibles a las altas temperaturas. Puede tener una duración de 2 a 4 horas. Durante esta etapa la eliminación del agua resulta difícil y lenta ya que se trata de agua estructural o ligada a moléculas. Después del secado se enfría la malta hasta una temperatura de 24 °C o menos, mediante el paso de aire para prevenir posteriores daños enzimáticos.

El secado es un proceso que requiere un riguroso control y comúnmente, se inicia a bajas temperaturas (35-50 °C), las cuales se van incrementando hasta llegar a temperaturas próximas a 75 °C para la elaboración de maltas claras y temperaturas menores a 100 °C para obtener maltas oscuras.

La deshidratación comienza a temperaturas de 50 a 60 °C en el área de secado que calientan el lecho del grano. Más adelante las capas superiores del lecho comienzan a deshidratarse y el contenido de agua de la cebada empieza a descender progresivamente desde el fondo a la superficie del lecho del grano.

En esta etapa de deshidratación libre, se extrae sin restricciones el agua de la cebada, se ajusta el flujo de aire de manera que su humedad relativa sea del 90-95 % en el extremo de salida. Cuando se ha eliminado aproximadamente el 60 % del agua, la deshidratación subsiguiente se ve dificultada por la naturaleza ligada del agua residual. Llegado este punto se sube la temperatura del aire de entrada y se reduce el flujo.

La estabilidad térmica de las enzimas es ahora mayor que cuando la malta contenía más agua. Cuando el contenido de agua llega a 12 % toda el agua que permanece en el grano es ligada, por lo que entonces es cuando se sube la temperatura de entrada a 65-75 °C y se reduce aún más la velocidad de flujo. Finalmente, a una humedad de 5-8 %, dependiendo de la variedad de cebada, la temperatura del aire de entrada se eleva 80-100 °C, hasta que se alcanza el color y la humedad requeridos.

Son numerosos los factores que afectan la velocidad de deshidratación del grano; cabe citar entre ellos: (i) el volumen de aire que pasa a través del lecho del grano, (ii) la profundidad del lecho, (iii) el peso de agua a ser eliminado del lecho del grano, (iv) la temperatura del aire utilizado para la deshidratación, (v) la humedad relativa y (vi) el carácter higroscópico de la malta (Hough, 1990).

#### **3.1.4 Molienda**

La molienda tiene por objeto triturar la malta para disminuir el tamaño de partícula y así facilitar el contacto entre el almidón y las enzimas,  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas. Es necesario que la cáscara permanezca lo más entera posible, pero asegurar que el endospermo se muele a un tamaño de partícula que permita la liberación del extracto, evitando que se triture de más, ya que no serviría como filtro durante la recuperación del mosto.



### 3.1.5 Maceración

La malta previamente molida se coloca en un depósito, también llamado macerador, en donde se hidratará la harina de malta con agua a una temperatura de 62 a 67 °C. Manejar estas temperaturas durante el proceso, permite que las enzimas ataquen a las reservas nutritivas de la malta, parcialmente degradada volviéndola altamente vulnerable a la fermentación.

Las enzimas responsables de este ataque son la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas, las cuales actúan coordinadamente en la amilosa y amilopectina para liberar dextrinas no fermentables y los azúcares fermentables, respectivamente. La  $\beta$  amilasa es más termoestable que la  $\alpha$  amilasa, de tal manera que si se manejan temperaturas de 67 °C por un periodo de 30 a 120 minutos, se favorece la acción de la  $\beta$  amilasa. Es necesario que las amilasas sean suficientes para asegurar una hidrolización rápida y eficaz de todo el almidón.

Además de la acción amilolítica, el ataque proteico se produce a una temperatura óptima de 50 °C. Las proteasas son exoenzimas que operan mejor a pHs 5.3 y 5.7 y cortan restos de aminoácidos de las cadenas proteicas; se puede controlar la proteólisis, si se desea atenuar se recomienda reducir la temperatura, utilizar un pH relativamente bajo y prolongar los tiempos de maceración (Hough, 1990).

### 3.1.6 Cocción

La coagulación de las proteínas durante la ebullición se ve fuertemente influida por la presencia de taninos y el efecto combinado de la temperatura, el pH y los iones multivalentes como el calcio y los metales pesados. El calentamiento conduce a la pérdida de la compleja estructura de las proteínas; éstas se desenrollan y sufren ruptura de puentes moleculares para producir derivados más pequeños como los polipéptidos (Hough, 1990).

El objetivo principal de la cocción es estabilizar y aromatizar el mosto; la estabilización es biológica, pues destruye cualquier microorganismo presente; bioquímica, porque se destruye la amilasa residual que de otra manera proseguiría su acción; coloidal, al eliminar la proteínas coloidales inestables mediante coagulación térmica, y organoléptica, por eliminación de compuestos ácidos volátiles y formación de compuestos reductores que contribuyen a la estabilidad del sabor de la cerveza (Molina *et al.*, 1989).

### 3.1.7 Fermentación

Es necesario enfriar y airear el mosto lo más rápido posible para terminar de coagular las proteínas y demás compuestos insolubles, pero sobre todo para poder inocular el mosto cocido con *Saccharomyces cerevisiae* para llevar a cabo la oxidación de los azúcares presentes; simultáneamente la levadura comenzara a excretar compuestos como etanol, dióxido de carbono, alcoholes primarios y ésteres como resultado del metabolismo celular.

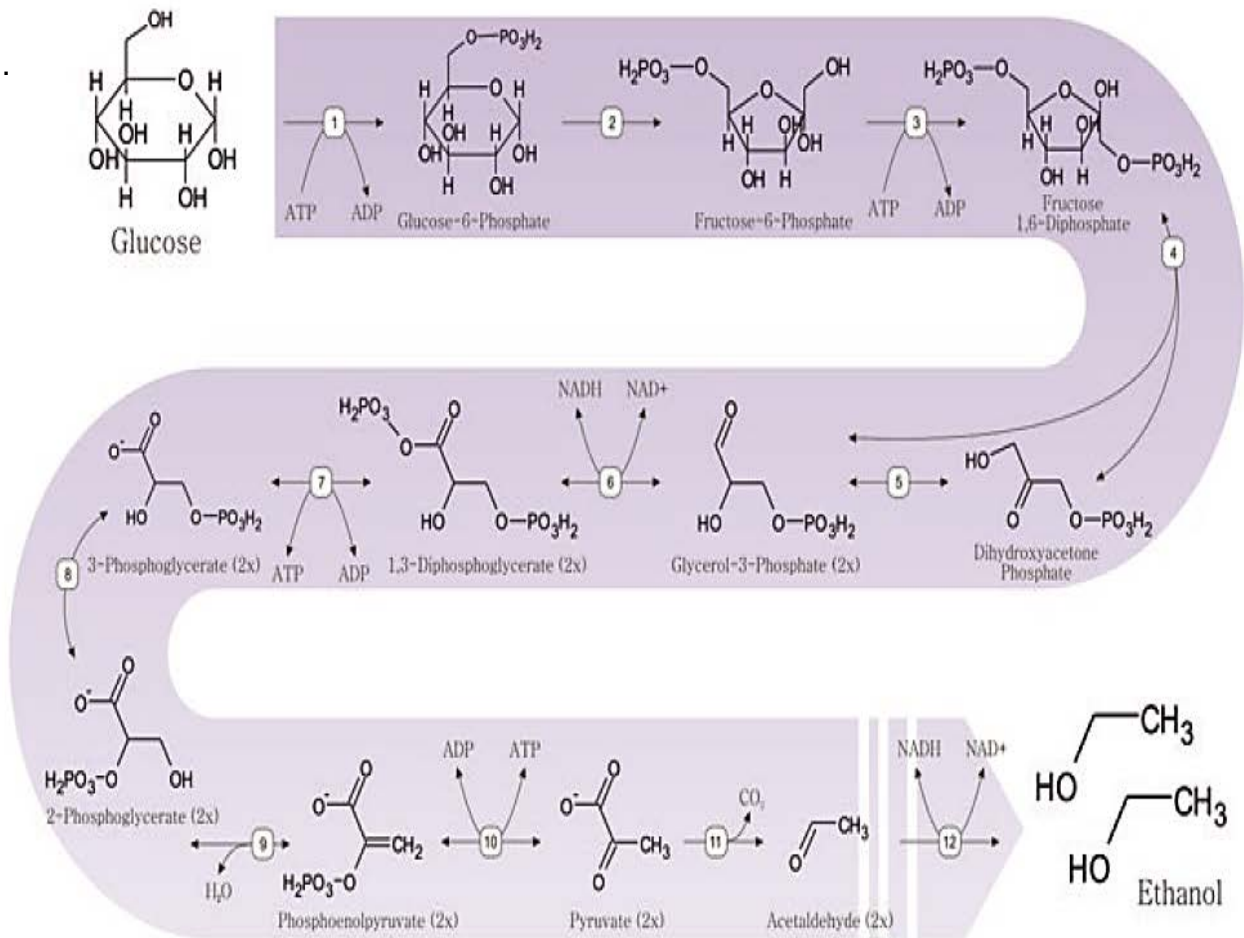
El mosto obtenido es una solución compleja la cual incluye principalmente carbohidratos, aminoácidos, péptidos, vitaminas y minerales. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus* solamente pueden asimilar y metabolizar pequeñas moléculas como la sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y maltotriosa. Por ejemplo, con ayuda de la enzima invertasa la cual hidroliza el almidón en los correspondientes azúcares, estos son transportados al citoplasma en donde continúan su metabolismo.

La asimilación de carbohidratos se da de manera ordenada comenzando con la glucosa y fructosa, las cuales compiten con la misma permeabilidad en la membrana plasmática de la célula, sin embargo, la glucosa es la que presenta mayor afinidad obstaculizando el pasaje para la fructosa; por último se absorben la maltosa y la maltotriosa (Pires *et al.*, 2015).

Las sustancias que son liposolubles llegan a la membrana plasmática rápidamente, en cambio las hidrosolubles y las no liposolubles demoran más tiempo. Una vez que se encuentran los compuestos dentro de la célula, no son utilizados inmediatamente; la glucosa y fructosa se consumen con gran rapidez, seguidos por la maltosa y por último la maltotriosa. Los aminoácidos se absorben secuencialmente en grupo: primero el glutamato, la asparagina y serina, después la histidina y leucina, y finalmente la glicocola y el triptófano.

Debido a la represión que sucede en la ruta bioquímica aeróbica, el metabolismo de la levadura se desvía hacia un estado fermentativo pese que también tiene la capacidad de llevar a cabo la respiración aerobia, la levadura elige producir etanol conocido como el “Efecto Cabtree”. Una de las ventajas de ser un microorganismo que excreta etanol, es el evitar que otros microorganismos compitan por los nutrientes presentes en el medio.

Después de que en el citoplasma ocurren una serie de reacciones mediante la que la glucosa es descompuesta en dos moléculas de piruvato (ruta de Embden–Meyerhof–Parnas) conocida también como la glucólisis, en el siguiente paso ocurre una descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído liberando moléculas de  $\text{CO}_2$  y finalmente, el acetaldehído es convertido a etanol por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (Figura 10).



**Figura 10. Ruta bioquímica de la fermentación.**

La molécula de glucosa-6-fosfato entra a ruta glicolítica para convertirse en dos moléculas de piruvato mediante la acción de distintas enzimas (1) glucoquinasa (2) glucose-6-phosphate isomerasa; (3) 6-phosphofructoquinasa; (4) aldosa fructosa difosfato (5) triosafofosfato isomerasa (6) gliceraldehído-3-phosphate deshidrogenasa; (7) fosfogliceratoquinasa; (8) fosfoglicerato mutasa; (9) fosfopiruvato hidratasa (10) piruvatoquinasa. Finalmente el piruvato es descarboxilado por (11) piruvato descarboxilasa, librando una molécula de CO<sub>2</sub> y formando acetaldehído, el cual es reducido por (12) la alcohol deshidrogenasa a etanol.

### **3.1.8 Maduración**

La maduración es el período, más o menos largo, durante el cual la cerveza sufre un reposo prolongado con la finalidad de clarificarla mediante un proceso físico de separación y precipitación de las aglomeraciones proteínicas residuales de la malta, los adjuntos y el lúpulo conduciendo todo esto a la mejora de las condiciones organolépticas del producto que será entregado al consumidor final.

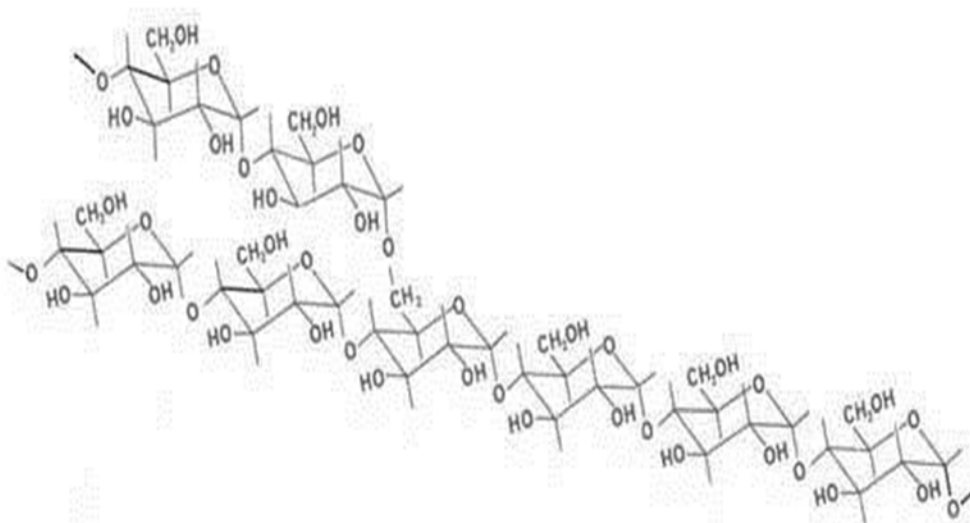
Durante esta etapa, se utilizan los azúcares residuales para formar CO<sub>2</sub>, que a su vez ayuda a la eliminación de sustancias volátiles no deseadas como son los aldehídos y compuestos azufrados. El parámetro principal que determina el estado de maduración es la eliminación de diacetilo formado durante la fermentación primaria.

Aunque este proceso puede durar varias semanas, cervecerías modernas pueden utilizar cepas específicas de levadura y temperaturas elevadas para acelerar la eliminación de las sustancias volátiles no deseadas. Después que la concentración de diacetilo cae por debajo de umbral de percepción ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ), se disminuye la temperatura entre  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $3^{\circ}\text{C}$  para aclarar y estabilizar la cerveza. A partir de entonces, la cerveza está lista para pasar a etapas de procesamiento finales, que pueden incluir todas o sólo algunas de las siguientes operaciones: filtración, estabilización coloidal, envasado y pasteurización.

## Capítulo 4. Almidón

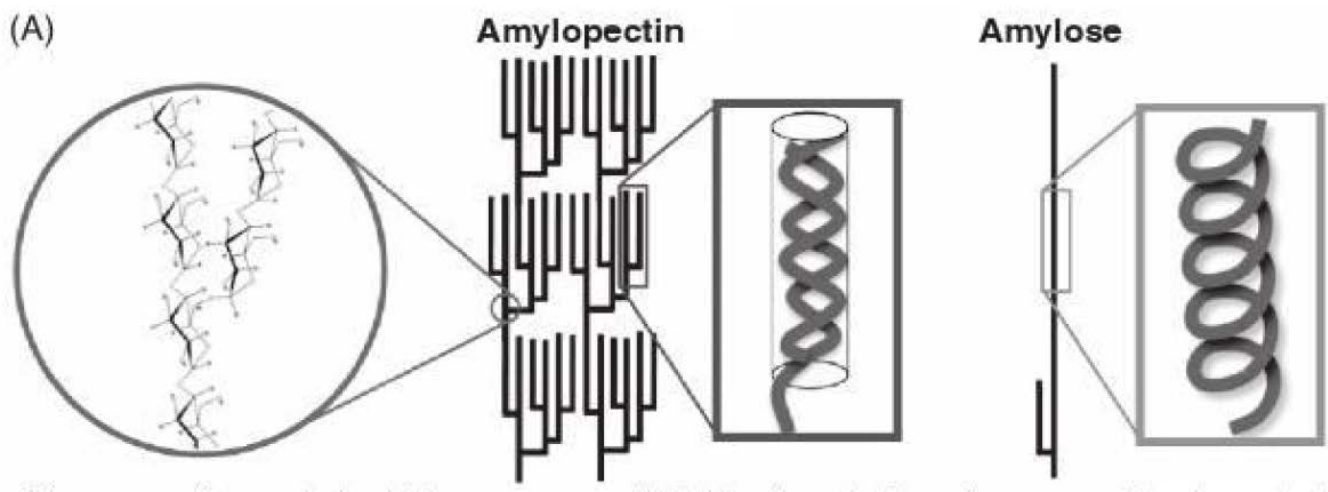
El almidón (Figura 11) es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas, se le encuentra en diversos órganos incluyendo las semillas, frutos, tubérculos y las raíces (Palma *et al*, 2010). El papel fisiológico del almidón es proporcionar una fuente de energía, por ejemplo a la semilla durante la germinación. Sus principales productos de hidrólisis son maltosa y sus oligosacáridos, los cuales eventualmente son hidrolizados en glucosa que proveerá energía para la planta joven y así poder iniciar la fotosíntesis. Posteriormente, se convertirá en hexosas fosfatadas para poder ser utilizadas durante el metabolismo celular (Ross, 2012).

Para poder aprovechar el almidón presente en los alimentos, Ross (2012) señala que es de suma importancia conocer cómo y dónde se encuentra, su composición química, tipo de gránulo que forma y tamaño, los métodos por los cuales puede ser modificado, así como su comportamiento reológico en presencia de agua. En forma natural se encuentra organizado en forma de gránulos insolubles de la amilosa y amilopectina, donde las cadenas de glucosa presentan un empaquetamiento denso y altamente ordenado.



**Figura 11. Estructura química del almidón.**

Dependiendo de la relación de amilosa/amilopectina (Figura 12) que contenga el almidón, se le confieren propiedades fisicoquímicas y funciones particulares como: temperatura y entalpía de gelatinización, susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, cristalinidad, solubilidad e hinchamiento (Bello-Pérez *et al.*, 2005). Así mismo, la relación amilosa: amilopectina va a definir la clase de almidón, normal y ceroso.



**Figura 12. . Estructura química de la amilopectina y amilosa.**

El almidón ceroso prácticamente no contiene nada de la fracción de amilosa, favoreciendo su modificación química y reduciendo la tendencia a recrystalizarse después de haberse sometido a un proceso térmico de calor a frío; siendo la amilosa responsable de que las cadenas se recrystalicen.



De manera práctica y visual, con ayuda de yodo y el complejo almidón-yodo que se forma, se puede estimar cuál de las dos fracciones de almidón se encuentra en mayor proporción. Si adquiere una tonalidad rojiza, la amilopectina se encuentra en mayor proporción ya que el complejo absorbe a una longitud de onda entre 530-550 nm; si adquiere una tonalidad azul oscuro la concentración de amilosa es mayor, pues el complejo con yodo absorbe a una longitud de onda entre 640-660 nm (Ross, 2012).

La morfología, el tamaño y la distribución de los gránulos de almidón también varían de acuerdo al origen botánico (Bello-Pérez, 1995). De este modo podemos encontrarlos en formas variadas: esféricas, redondas, ovales, polihédricas y de formas irregulares, algunas veces con protuberancias. En cuanto al tamaño estos gránulos se han clasificado en ( $>25 \mu\text{m}$ ), medianos ( $10-25 \mu\text{m}$ ), pequeños ( $5-10 \mu\text{m}$ ) y muy pequeños ( $< 5 \mu\text{m}$ ) (Lindeboom y col., 2004).

## Capítulo 5. Cambios en la estructura de la semilla de amaranto durante la germinación

Balasubramanian *et al.*, (1989) reportan que la actividad enzimática de la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas se encuentra ausente en el amaranto sin germinar pero aumenta durante la imbibición de la semilla en el agua, obteniendo el máximo de 18.6 mg maltosa  $h^{-1}$ ; la actividad de la  $\alpha$  amilasa decrece después de 96 h de germinación, después de este periodo no se detectó actividad alguna.

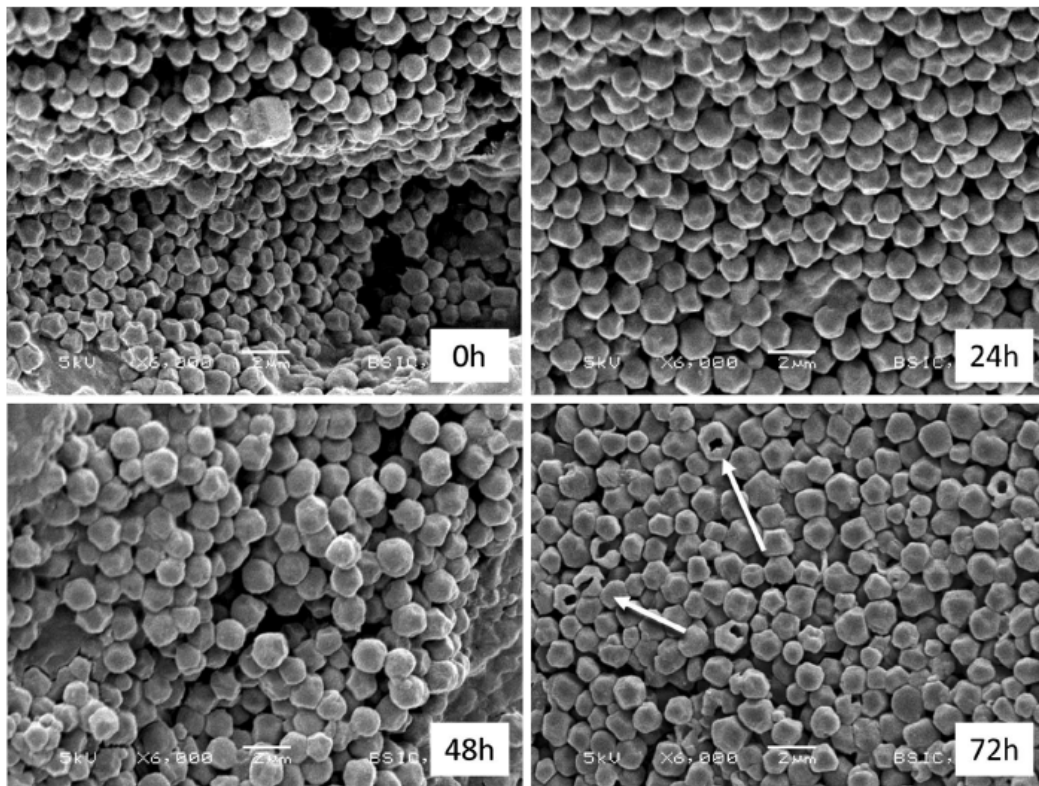
La actividad máxima de la  $\beta$  amilasa fue estimada a las 48 horas con una velocidad de 10.4 a 144.8 mg de maltosa  $h^{-1}$ , observando la disminución después de 72 horas. Es necesario para la  $\beta$  amilasa trabajar junto con la  $\alpha$  amilasa, ya que por sí sola no le es posible atacar los granos, tomando el almidón soluble previamente hidrolizado por la  $\alpha$  amilasa.

Por otra parte, la concentración de carbohidratos solubles aumenta después de 48 horas de germinación debido a la hidrólisis del almidón, pero comienza su degradación pasado ese tiempo. La mayoría de los carbohidratos estaban presentes como azúcares no reductores, estimando a las 48 h una concentración del 18.6 %; debido a que el producto de hidrólisis del almidón es la sacarosa, la cual será utilizada para el desarrollo de la raíz y hacer crecer los tejidos.

La cantidad de nitrógeno proteico no varió significativamente durante la germinación, teniendo un incremento estimado del 2.2 %; Folkes y Yemm (1958) reportan el mismo comportamiento en la cebada. Sin embargo, la cantidad de aminoácidos libres aumenta 13 veces más después de 120 horas de germinación, siendo sus estimadores 0.35 y 4.7 mg de leucina/g.

La concentración de lisina incrementó en 31 % después de 24 horas de germinación, estimándose en 4.46 g/16 g de nitrógeno total. Durante la germinación, la proteína soluble incremento del 15.6 % en la semilla sin germinar, a 21.6 % después de 24 horas de germinación. Dado que la albumina es una proteína enzimática, se sintetiza durante la germinación y esta es la razón por la cual su incremento es tan notorio (Balasubramanian *et al.*, 1989).

Hager en el 2014, observó por microscopía electrónica de barrida (Figura 13) como cambiaba la estructura de los gránulos de almidón presentes en la semilla de quinoa durante la germinación, los cuales se localizan en el centro del perispermo. Durante las 48 horas de germinación no observó cambios de estructura, pero a partir de las 72 horas algunos túneles (flechas) aparecen lo que indica el cambio de estructura de algunos gránulos.



**Figura 13. Vista en microscopía electrónica de barrido de los cambios en los gránulos de almidón de quinoa durante 0, 24, 48 y 72 horas de germinación. (Hager *et al.*, 2014).**

## Capítulo 6. Hidrólisis de Almidón

En realidad, el ser humano no consume almidón en forma cruda, aunque esta idea debería ser considerada dado que es de esta manera que se consume el almidón de la forma más resistente al cual se le atribuyen propiedades para prevenir el cáncer colon-rectal.

Generalmente, tendemos a cocinar los alimentos almidonosos antes de su consumo, ocupando generalmente agua, de esta manera se favorece una alteración en la estructura granular del almidón al verse afectada la estructura interna del gránulo. A la par de este fenómeno, los gránulos se hinchan varias veces más de su tamaño original, favoreciendo que la amilosa, se filtre por las cadenas de la amilopectina dada la baja miscibilidad que existe entre ambas macromoléculas del almidón.

Este fenómeno conduce a la ruptura y ablandamiento de las regiones amorfas, de un estado duro, vítreo y cristalino a un estado maleable caracterizado principalmente por el aumento de sus estructuras moleculares debido a la combinación de temperatura e hidratación que el agua le confiere.

Una vez que el almidón se encuentra de manera gelatinizada, si se le somete a un enfriamiento la viscosidad tenderá a incrementar significativamente, dado que existe un estado de ordenamiento más organizado, pero no el estado inicial del gránulo, debido a la insolubilidad de la amilosa en agua fría, así como por su tendencia a formar agregados cuando los puentes de hidrógeno entre las moléculas se vuelven más rígidos, teniendo una cinética de recristalización rápida y fuerte. Por otro lado la amilopectina tienden a asociarse pero su grado de recristalización es más lento y débil que el de la amilosa.

Existen dos etapas durante la gelatinización del almidón, la primera ocurre cuando la amilosa se une para formar un gel débil, la segunda cuando la amilopectina comienza a asociarse para formar un gel más resistente, la cual puede durar horas incluso días.

La hidrólisis del almidón, de acuerdo a Cruz (2012) comprende 3 etapas sucesivas:

- Gelatinización

Cuando el almidón es calentado en agua en exceso, cae en una fase de transición, asociada a difusión de agua dentro del gránulo y posterior región amorfa, hidratación e hinchazón radial, pérdida de birrefringencia, pérdida del orden de región cristalina y lixiviación de la amilosa y amilopectina.

Durante el proceso de hidrólisis, especialmente a inicios de éste, el factor que contribuye al aumento de viscosidad es el hinchamiento de los gránulos, el cual sucede a temperaturas superiores a los 60 °C. Este aspecto puede notarse al momento en que se somete a cocción una pasta pues ocurre un incremento de tamaño después de su cocción, debido a la relación amilosa: amilopectina presente en el grano, entre mayor sea la concentración de amilopectina mayor será su capacidad de hinchamiento (Wrolstad, 2016).

- Licuefacción o dextrinización

Es el proceso mediante el cual a partir de un almidón gelatinizado se obtiene una rápida disminución de la viscosidad en virtud de una hidrólisis parcial. En esta etapa se producen polisacáridos de longitud intermedia (malto dextrinas con 5 a 10 unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de polisacáridos de alto peso molecular, como también algunos de bajo peso molecular (glucosa, maltosa entre otros).

- Sacarificación

A partir de las malto dextrinas obtenidas previamente, se completa la hidrólisis total del almidón a glucosa. En la digestibilidad de almidones como materia prima, muchos factores como el tamaño de partícula, relación de amilosa: amilopectina, extensión de la asociación molecular entre los componentes del almidón, grado de cristalinidad, longitud de la cadena de amilosa y presencia de complejos lípidos-amilosa, juegan un papel importante en la degradación hidrolítica.

## **6.1 Métodos hidrolíticos**

### **6.1.1 Hidrólisis química**

La modificación química por hidrólisis ácida es una herramienta alternativa para producir almidones con mayor cristalinidad, porque el ácido (clorhídrico o sulfúrico) hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6. La hidrólisis ocurre preferente en las regiones amorfas de los gránulos permaneciendo las cristalinidades relativamente intactas (Palma, 2010). Sin embargo, el tamaño del gránulo, la relación amilosa/amilopectina, así como otras características del gránulo pueden tener influencia en este tipo de modificación.

### **6.1.2 Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática es de suma importancia en la tecnología aplicada en el almidón, desde las enzimas involucradas en la licuefacción (reducción de viscosidad), a las enzimas de sacarificación (para la obtención de carbohidratos fermentables).

Cabe resaltar que la catálisis enzimática únicamente afecta el almidón gelatinizado, dado que los carbohidratos presentes en algunos alimentos son muy resistentes a la hidrólisis de enzimas. De esta forma, se puede concluir que la resistencia por forma y encapsulado de los gránulos de almidón pueden ser los responsables de la baja digestibilidad y resistencia al ataque enzimático, requiriendo ser gelatinizados para poder ser degradados por enzimas (Wang *et al.*, 2006). Por ejemplo, observaciones microscópicas revelan que los gránulos de ciertos alimentos tienen una forma irregular con superficies lisas, además de esto los gránulos de almidón podrían estar atrapados en una pared residual.

El proceso de conversión de almidón gelatinizado a un jarabe glucosado generalmente consta de 2 etapas: licuefacción y sacarificación. La licuefacción se presenta cuando se emplea la enzima  $\alpha$ -amilasa (durante o después de gelatinizar el almidón), cortando las cadenas de los polímeros amilosa y amilopectina en cadenas de tamaño regular, dando como resultado dextrinas, maltosa, maltotriosa y maltopentosa. Para la producción de glucosa, se requiere de una segunda etapa consecutiva a la licuefacción denominada sacarificación, adicionando la enzima amiloglucosidasa (AMG).

Las amilasas, divididas en 3 grupos, son enzimas extracelulares distribuidas ampliamente en la naturaleza con un peso molecular que va de 40,000 a 50,000 Da; estas enzimas son las principales responsables de generar cadenas más pequeñas de carbohidratos al atacar los enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) de la cadena de almidón, con una actividad enzimática que oscila entre 53-129 U/L (Peralta, 2010).

#### **6.1.2.1 $\alpha$ - amilasas**

Conocidas como  $\alpha$ -1,4glucanohidrolasas, con un peso molecular reportado de alrededor de los 60kDa, enzimas provenientes de *Bacillus Licheniformis*. Estas enzimas se asignan al grupo de licuefacción, las cuales rompen en el interior del sustrato (endoamilasas) al azar los enlaces  $\alpha$ -(1,4) glicosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina menos en las proximidades de los puntos de ramificación, dado a que su velocidad es más lenta en esas regiones. Esta hidrólisis produce la disminución de la viscosidad en las dispersiones de este polímero, el producto de esta hidrólisis son dextrinas, maltosa y glucosa, por lo que el poder reductor de las dispersiones de almidón aumenta considerablemente.



Tanto en las industrias cerveceras, como en las del pan se utilizan las enzimas amilasas en un proceso fermentativo realizado por una levadura del género *Saccharomyces* que carece de capacidad amilolítica. En la fabricación tradicional de cerveza, el almidón del grano de cebada se digiere por acción de la actividad de  $\alpha$ -amilasas sintetizadas por el propio grano al germinar (malta), pero la adición de amilasas es una práctica generalizada en la mayoría de las industrias cerveceras.

#### **6.1.2.2 $\beta$ -amilasas**

Enzima exoamilasa, la cual hidrolizan el almidón atacándolo únicamente por su extremo no reductor y produce moléculas de maltosa y dextrinas básicamente; debido a que no hay una inmediata destrucción de la estructura polimérica del almidón, la  $\beta$ -amilasa reduce la viscosidad de las dispersiones de almidón en forma muy lenta.

Wang *et al.* (2006) reportan que la velocidad de hidrólisis es más lenta en los enlaces cercanos a los puntos de ramificación. La hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por 4 o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces  $\alpha$ -1,6 provenientes de las uniones glucosídicas de la estructura original, llamadas dextrinas de límite.

### 6.1.2.3 Amiloglucosidasa (AMG)

Conocida como glucoamilasa o amiloglucosidasa EC: 3.2.1.3, empleada en la producción de jarabes glucosados, ya que tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4 de extremos no reductores de polisacáridos para la formación de glucosa. También posee la capacidad de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -1,6 a más baja velocidad, pudiéndose completar la hidrólisis de almidón con la combinación de las tres enzimas  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y amiloglucosidasa de manera completa.

La glucoamilasa (glucano 1,4- $\alpha$ -glucosidasa) es una enzima fúngica, extracelular, producida comercialmente con *Aspergillus niger* o *Rhizopus sp.*, que libera unidades de d-glucosa de los extremos no reductores del almidón y de oligosacáridos como las malto dextrinas. Esta habilidad de degradación del almidón a glucosa tiene una gran aplicación industrial en el proceso de producción de jarabes de glucosa, materia prima en panadería, en la industria de bebidas y en infinidad de procesos biotecnológicos de los cuales los más representativos son la producción de fructosa y etanol (1).

El peso molecular de la AMG puede variar dependiendo de su fuente. Existen dos tipos de AMG, tipo I y II. Las AMG tipo I poseen pesos moleculares cercanos a 60kDa. Las AMG tipo II tienden a tener un peso molecular mayor a los 100kDa.

#### **6.1.2.4 Pululanasa**

También conocida como pulalan-6-glucanohidrolasa, EC: 3.2.1.41, con un peso molecular reportado entre 70 y 110kDa. Esta enzima hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 en el pululano y tiene como producto principal la maltotriosa y maltosa. Enzima usada como complementaria para la hidrólisis de amilopectina junto con la  $\alpha$ -amilasa. Existen dos tipos de pululanasa: la de tipo I, la cual únicamente hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,6 del pululan; y la pululanasa de tipo II, que hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,6 y  $\alpha$ -1,4 de otros polisacáridos.

## Capítulo 7. Justificación

Buscar alternativas de uso de la semilla de amaranto que no se dirija a una botana como el caso de las alegrías o palanquetas, no solo fomentará el cultivo y producción de la semilla de amaranto sino el consumo de un cultivo benéfico y de alto contenido nutricional que forma parte de la cultura y tradiciones prehispánicas por lo que continuaríamos con la tradición de consumir este alimento.

La cerveza es una bebida fermentada no destilada elaborada principalmente con agua, cebada y lúpulo, en la cual con ayuda de *Saccharomyces cerevisiae* se transforman los azúcares presentes en el mosto en a etanol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Esta reconocida bebida al ser de la más consumida por la población, ha permitido que la elaboración de cervezas artesanales ofrezca variedades de nuevos sabores, olores y sensaciones.

Utilizar distintos sustratos para la elaboración de cerveza, en este caso la semilla de amaranto, ayudaría a recuperar la importancia que tiene en la dieta de los mexicanos, obteniendo un producto que no se encuentra en el mercado. Existen “cervezas de amaranto”, sin embargo, esta materia prima sólo es utilizada como adjunto (semilla reventada y sin germinar).

Siendo de suma importancia proponer estrategias de seguridad alimentaria que incluyan la producción de cultivos nativos en situación de disponibilidad y autosuficiencia, como el amaranto, el cual posean un amplio potencial nutricional, agronómico y productivo. Es por ello que maltear la semilla de amaranto podría proporcionar una fuente de carbohidratos alterna para la elaboración de una bebida alcohólica considerada como alimento funcional.

## Capítulo 8. Hipótesis de trabajo

- Hipótesis 1

Al someter la semilla de amaranto a remojo con solución alcalina, se favorecerá la obtención de una malta libre de contaminación durante el proceso de la germinación.

- Hipótesis 2

La concentración de azúcares reductores presentes en el mosto, estará en función de las diferentes condiciones de hidrólisis del almidón aplicadas en las semillas de amaranto (natural, química y enzimática).

## **Capítulo 9. Objetivos**

### **9.1 Objetivo General**

Estandarizar el proceso de malteo de la semilla de amaranto para lograr un germinado libre de contaminación, y comparar 3 métodos hidrolíticos del almidón para obtener una concentración de azúcares fermentables para la elaboración de una cerveza artesanal 100 % de amaranto.

### **9.2 Objetivos Particulares**

- Estandarizar el proceso de malteo de la semilla de amaranto para la elaboración de un germinado libre de contaminación para la obtención de una malta base de amaranto.
- Comparar los resultados de la sacarificación de la malta de amaranto por 3 métodos hidrolíticos: natural, químico y enzimático.
- Elaborar cervezas a partir del mosto obtenido bajo los distintos métodos hidrolíticos.

## Capítulo 10. Metodología

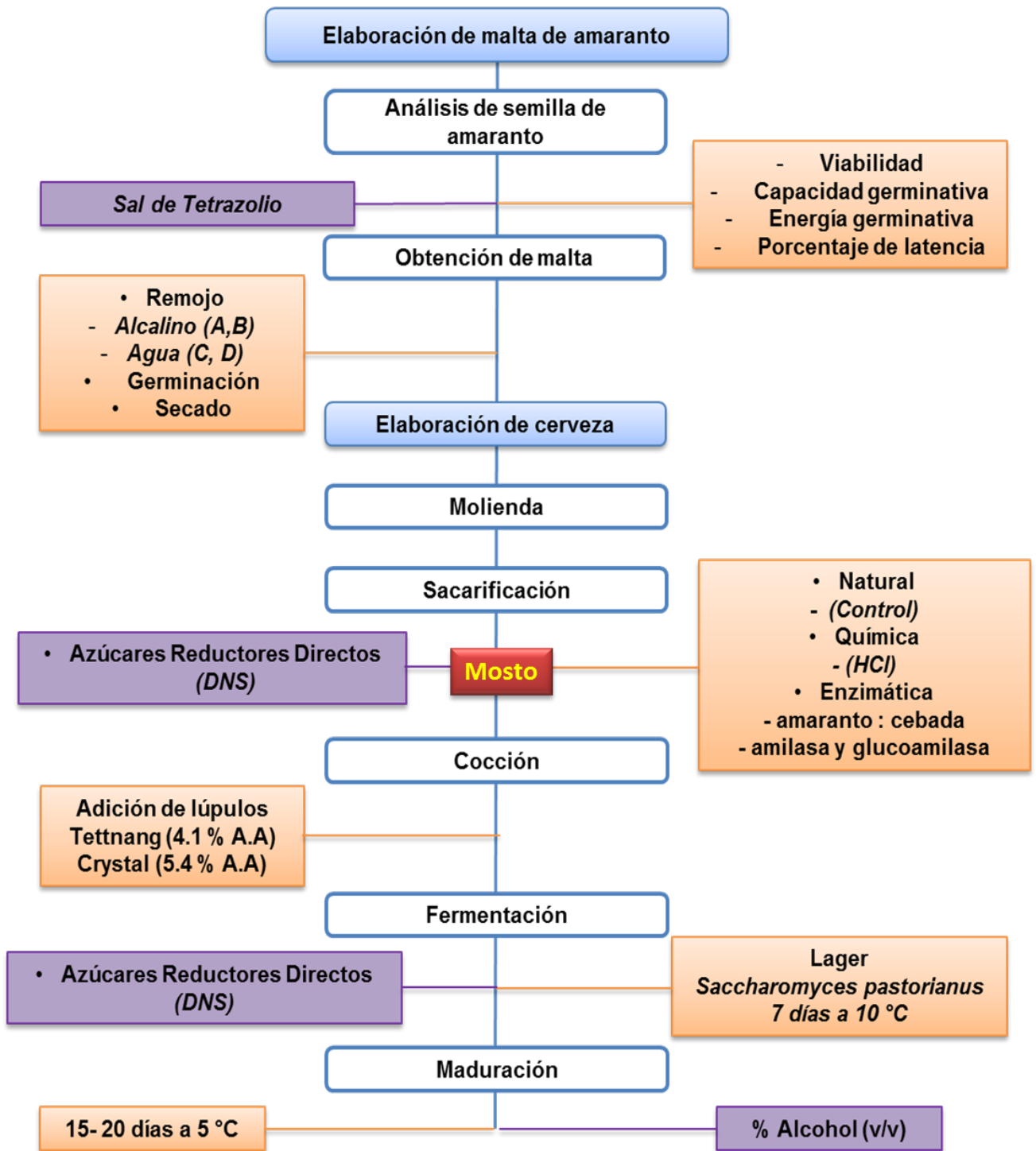


Figura 14. Esquema general del trabajo experimental realizado.

## **Capítulo 11. Materiales y métodos**

### **11.1 Análisis de la semilla de amaranto**

La semilla de amaranto provino de Santiago Tulyehualco, comunidad de la delegación Xochimilco en la Ciudad de México. Se le evaluó la viabilidad mediante la adición de sal de tetrazolio al 1% en 3 cajas Petri que contenían 110 semillas cada una, se dejaron remojando por 2 horas y media a una temperatura de 30 °C, una vez transcurrido el tiempo se cuantificaron las semillas teñidas, obteniendo el promedio del porcentaje de viabilidad, capacidad germinativa, energía germinativa y latencia de la semillas.

### **11.2 Obtención de malta de amaranto**

En Alemania en el año de 1998, Aufhammer *et al.*, evaluaron el efecto de la temperatura, luz y presencia de pesticida sobre el índice de germinación de la semilla de amaranto. Manejaron por 14 días temperaturas de los 7 a 35 °C, en presencia y ausencia de luz, así como el uso de pesticidas. Para la germinación remojaron amaranto por 2 horas a una temperatura de 25 °C y posteriormente lo sometieron a ventilación. Concluyen que en presencia de luz y a temperatura de 19 °C, el proceso de germinación disminuye de 12 a 3 días; en ausencia de luz y a temperaturas menores a 25 °C el índice de germinación se ve inhibido; y realizar un pre remojo a la semilla genera un aumento de semillas germinadas.



Con base en los resultados obtenidos por Aufhammer *et al.* (1998) y por De Meo *et al.* (2011) se proponen distintos tratamientos para inducir la germinación de la semilla de amaranto obteniendo una malta libre de contaminación. Se proponen 4 tratamientos distintos para la germinación por 3 días de la semilla de amaranto:

- Tratamiento A, la semilla se sometió a un remojo inicial de 4 horas en una solución de NaOH 0.2% p/v, dejándola respirar por 1.5 horas, posteriormente se sometió en solución alcalina por 2 horas, se retira la solución dejando respirar nuevamente a la semilla por 1.5 horas.
- Tratamiento B, la semilla se sometió a un remojo inicial de 4 horas en una solución de NaOH 0.2% p/v, posteriormente se colocaron en charolas de plástico formando lechos con la semilla de amaranto, las cuales se hidrataban cada 3 horas mediante aspersion con la misma solución alcalina.
- Tratamiento C, la semilla se sometió a un remojo inicial de 4 horas en agua, posteriormente se dejó respirar por 1.5 horas, se sometió de nuevo a remojo en la solución alcalina por 2 horas, se retiró el líquido para dejar respirar nuevamente a la semilla por 1.5 horas.
- Tratamiento D, la semilla se sometió a un remojo inicial de 4 horas en agua, posteriormente se colocaron en charolas de plástico formando lechos con la semilla de amaranto, las cuales se hidrataban cada 3 horas mediante aspersion con agua destilada.

Para todos los tratamientos durante la noche fue necesario adicionar solución de NaOH 0.2% p/v o agua, según el caso, sin cubrir las semillas para evitar que se deshidrataran y se detuviera la germinación. En la Tabla 1, se resumen los tratamientos aplicados para la germinación de la semilla de amaranto. Una vez concluidos los 3 días, se detuvo la germinación colocando la malta de amaranto en charolas de aluminio en una estufa a 70 °C por 48 horas.

**Tabla 1. Descripción de los tratamientos germinativos evaluados.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Solución</b>	<b>Descripción</b>
<b>A</b>	NaOH	Remojo intermitente (NaOH: aire) (2 h:1.5 h: 2 h: 1.5 h)
<b>B</b>	0.2 %	Remojo inicial 4 horas, hidratación por aspersion cada 3 horas
<b>C</b>	Agua	Remojo intermitente (agua: aire) (2 h:1.5 h: 2 h: 1.5 h)
<b>D</b>	Agua	Remojo inicial 4 horas, hidratación por aspersion cada 3 horas

### **11. 3 Hidrólisis de la malta de amaranto**

Se obtuvo el mosto de la malta de amaranto de la misma manera para someterlos a prueba a distintos tratamientos de hidrólisis de almidón (natural, química y enzimática). En matraces Erlenmeyer de 250 ml, se pesaron 3 gramos de harina de malta de amaranto a los cuales se adicionaron 50 ml de agua destilada y 0.1 g de subacetato de plomo, con el fin de precipitar proteínas y demás compuestos que lleguen a interferir en la cuantificación de los carbohidratos presentes en el mosto.

#### **11.3.1 Natural**

Para realizar la hidrólisis natural del mosto de malta de amaranto, se elevó la temperatura por 20 minutos a 38°C para comenzar la degradación de la pared de la semilla, después se aumentó a 55 °C por 20 minutos para la hidrólisis proteica, la liberación de péptidos y aminoácidos, posteriormente se sometió a prueba el tiempo de activación para la  $\beta$ -amilasa durante 1, 2 y 3 horas manteniendo el mosto a 68 °C para promover la sacarificación de los almidones presentes en la semilla de amaranto, por último a todos los tratamientos se les elevó la temperatura a 75 °C durante 15 minutos para activar la  $\alpha$ -amilasa.

El mosto de malta de amaranto presentó un pH promedio de 6.54 siendo 2 unidades superiores al mosto obtenido de malta de cebada el cual contiene diversos ácidos como el carbónico, láctico, acético, fórmico, y succínico los responsables del pH ácido de la cerveza (4.5 de pH). Se evaluó el efecto que produce el pH del mosto de la malta de amaranto para favorecer que *Saccharomyces pastorianus* transforme los carbohidratos en etanol y CO<sub>2</sub>. Se propusieron los siguientes tratamientos (Tabla 2).

**Tabla 2. Tratamientos para evaluar el efecto del pH en el mosto.**

Tratamiento Mosto	Descripción
<b>Control</b>	El mosto permanece con el pH original (6.54)
<b>Ajustado</b>	Adición de ácido cítrico 0.1 N para obtener el mosto a pH 5.5

### 11.3.2 Química

Para realizar la hidrólisis química del mosto de malta de amaranto, se realizaron 4 tratamientos (Tabla 3) adicionando 5 ml de HCl concentrado al mosto original. Para esta hidrólisis se sometió a prueba el tiempo de reacción del HCl calentando por 3, 15, 30 y 60 minutos a 70 °C, se enfrió a temperatura ambiente para posteriormente ajustar el mosto a pH 5.5 con NaOH 20 % p/v para su posterior fermentación.

**Tabla 3. Tratamientos para la hidrólisis química de la malta de amaranto.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo de hidrólisis ácida (minutos)</b>
<b>A</b>	3
<b>B</b>	15
<b>C</b>	30
<b>D</b>	60

### 11.3.3 Enzimática

- Etapa 1. Amaranto: Cebada

Para realizar la hidrólisis vía enzimática se propuso inicialmente incorporar malta de cebada para que las enzimas presentes en la malta del grano favorecieran la hidrólisis de la malta de amaranto. Se realizaron 2 tratamientos para este caso, explicados en la Tabla 4.

**Tabla 4. Tratamientos para la hidrólisis enzimática con cebada (Etapa 1).**

<b>Tratamiento Mosto</b>	<b>Descripción</b>
<b>90:10</b>	Mosto con 90 % malta de amaranto y 10 % malta de cebada
<b>80:20</b>	Mosto con 80 % malta de amaranto y 20 % malta de cebada

- Etapa 2. Enzimas comerciales

Se utilizaron dos enzimas comerciales proporcionadas por Enmex para realizar la hidrólisis de almidón, estas fueron Glucozyme<sup>®</sup> (Glucoamilasa) y Thermozyme<sup>®</sup> ( $\alpha$ -amilasa), las cuales se agregaron al mosto de acuerdo a sus condiciones óptimas para realizar la hidrólisis (Tabla 5).

Para la enzima Glucoamilasa se disminuyó el pH del mosto original (6.5) a un pH (4.5) con ayuda de ácido cítrico 0.1 N, sometiendo a prueba la dosis utilizada (50 y 100  $\mu$ l) y el tiempo de hidrólisis (15, 30, 45 y 60 minutos), manteniendo la temperatura a 45 °C.

Para el caso de la  $\alpha$ -amilasa, se disminuyó el pH a 5.5 con ácido cítrico 0.1 N, utilizando diferentes dosis de enzima (50 y 100  $\mu$ l) y el tiempo de hidrólisis (15, 30, 45 y 60 minutos), manteniendo la temperatura a 70 °C.

**Tabla 5. Tratamiento para la hidrólisis con enzimas comerciales (Etapa 2).**

ENZIMA	MALTA DE AMARANTO	DOSIS ( $\mu$ l)	TIEMPO (minutos)
$\alpha$ -amilasa	Sin gelatinizar	50 y 100	15, 30, 45, 60, 120
	Gelatinizado		
glucoamilasa	Sin gelatinizar		
	Gelatinizado		

## 11. 4 Elaboración de cerveza

En el siguiente diagrama (Figura 15) se muestra el proceso para la elaboración de cerveza a base de amaranto malteado, comenzando con (1) la Sacarificación de la malta de amaranto, (2) seguido por la Cocción y (3) adición de lúpulo, posteriormente con el (4) Enfriado (5) Inoculación del mosto dulce con la levadura para finalizar con (6) la Fermentación. Cada etapa se explica con detalle a continuación.



Figura 15. Diagrama de elaboración de cerveza.

### 11.4.1 Cocción

Una vez filtrado el mosto obtenido de la sacarificación de la malta de amaranto por los distintos métodos de hidrólisis, se llevó a ebullición por 1.5 horas. En esta etapa se adicionaron 6 gramos de lúpulo Crystal con un porcentaje de alfa-ácidos de 5.4, y 10 gramos del lúpulo Tettnang con un porcentaje de alfa-ácidos de 4.1, reportados en el empaque (Haz Chela, México). Una vez transcurrido el tiempo de cocción se enfrió el mosto a una temperatura de 20 °C para inocular la cerveza con 3.5 g de levadura Saflager W-34/70 previamente activada en una solución de glucosa 1 g/L.

#### **11.4.2 Fermentación-Maduración**

Se traspasó el mosto dulce enfriado previamente a 20°C a un fermentador de 4 litros. La fermentación se llevó a cabo durante 7 días a una temperatura de 16 °C. Para embotellar se esterilizaron 200 ml de una solución de sacarosa 6 g/L, se mezcló con la cerveza verde para posteriormente traspasar a botellas ámbar y dejar madurando por 21 días a 10 °C.

#### **11.5 Cuantificación de Azúcares Reductores Directos**

Se cuantificaron los carbohidratos disponibles presentes en cada tratamiento hidrolítico por el método de Miller (1995) para cada tratamiento de hidrólisis de almidón con el reactivo de DNS. Se colocaron 0.1 ml de cada muestra (semilla de amaranto, mosto, cerveza verde y cerveza madura) y 0.1 ml de DNS en un tubo de ensaye se llevaron a ebullición por 5 minutos y se enfriaron colocándolos en un baño de hielo, se adicionaron 2 ml de agua destilada, se agitaron y dejaron a temperatura ambiente para posteriormente leerlos en el espectrofotómetro ThermoSpectronic Modelo Biomate 3 a una longitud de onda de 540 nm.

La concentración de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de calibración (Anexo A) graficando absorbancia en función de la concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 0, 62.5, 125, 187.5 y 250 mg/L, utilizando glucosa como estándar, tratándolas de la misma manera que las muestras.

## **11.6 Determinación de pH**

Se calibró el potenciómetro (Conductronic PC45) con las soluciones reguladoras de pH 4 y pH 7, posteriormente se sumergió el electrodo en las muestras a temperatura ambiente. Se efectuó el análisis por triplicado enjuagando el electrodo con agua destilada entre cada muestra.

## **11.7 Determinación de alcohol por cromatografía de gases**

Se cuantificó la concentración de alcohol presente en las cervezas de amaranto para cada tratamiento mediante cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo marca Aligent 19091 modelo M413, equipado con una columna capilar HP-5 (30 m x 320  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ ), un detector FID; las condiciones de operación fueron: temperatura de inyección 100 °C, temperatura del horno 100 °C, nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 1 ml/min y una presión de 6.11 psi y un volumen de inyección de 1  $\mu\text{l}$ .

Se elaboró una curva estándar (Gráfica 2, Anexo B) con concentraciones de 1 al 10 % v/v para la determinación de alcohol presente en las cervezas de amaranto con los distintos tratamientos, el modelo sugerido tuvo un ajuste del 93.6 %.



## 11. 8 Diseño experimental y Métodos Estadísticos

Para cada experimento se propuso un Diseño Completamente al azar (DCA) realizando un ANOVA de uno o dos factores, según el caso. Se la misma manera se realizó la prueba post-hock (Tukey) para los estimadores de carbohidratos presentes en el mosto sometidos a los distintos tratamientos hidrolíticos con un  $\alpha=0.05$ .

En las siguientes tablas se describen las unidades experimentales, los factores y niveles a evaluar, las variables dependientes e independientes, repeticiones y número de datos para cada experimento. Así como las hipótesis experimentales para cada ensayo.

**Tabla 6. DCA para el análisis de la semilla de amaranto.**

<b>Unidad experimental:</b>	<b>caja petri con 110 semillas</b>
<b>Factor:</b>	Viabilidad
<b>Nivel:</b>	1
<b>Variable independiente:</b>	2 horas @30°C en sal de tetrazolio 1%
<b>Variable dependiente:</b>	Número de semillas germinadas
	Capacidad germinativa (%)
	Energía germinativa (%)
	Latencia (%)
<b>Repeticiones:</b>	3
<b>Datos:</b>	330 semillas

**Tabla 7. DCA para la obtención de malta de amaranto**

<b>Unidad experimental:</b>	<b>charola con 100 g de semilla de amaranto</b>		
<b>Factor:</b>	2	Solución	NaOH (0.2 %)
			Agua
	Remojo		Intermitente
			Aspersión
<b>Tratamientos</b>	4	A	NaOH (0.2 %) intermitente
		B	NaOH (0.2 %) aspersión
		C	Agua, intermitente
		D	Agua, aspersión
<b>Variable independiente:</b>	3 días @ 22 °C		
<b>Variable dependiente:</b>	Germinación		
	Presencia de hongo		
	Olor		
	Color		
	Tamaño de raíz		
<b>Repeticiones:</b>	3		
<b>Datos:</b>	300 g de semilla de amaranto		

- **SOLUCIÓN**

**Ho:** No hay efecto de la solución utilizada sobre la germinación de la semilla de amaranto.

(Solución de NaOH 0.2 % = Solución de agua destilada)

**Ha:** Para al menos un nivel de solución utilizada la germinación de la semilla difiere.

(Solución de NaOH 0.2 % ≠ Solución de agua destilada)

- **REMOJO**

**Ho:** No hay efecto del tipo de remojo utilizado sobre la germinación de la semilla de amaranto.

(Remojo intermitente = Remojo por aspersión)

**Ha:** Para al menos un nivel de remojo la germinación de la semilla difiere.

(Remojo intermitente  $\neq$  Remojo por aspersión)

- **TRATAMIENTOS**

**Ho:** No hay efecto del tratamiento utilizado sobre la germinación de la semilla de amaranto.

(Tratamiento A = Tratamiento B = Tratamiento C = Tratamiento D)

**Ha:** Al menos un tratamiento difiere en la germinación de la semilla de amaranto.

(Tratamiento A  $\neq$  Tratamiento B  $\neq$  Tratamiento C  $\neq$  Tratamiento D)

**Tabla 8. DCA para la hidrólisis natural de la semilla y malta de amaranto.**

Unidad experimental:	3 g de malta de amaranto		
<b>Factor:</b>	2	Horas de maceración	0
			1
			2
			3
		Sustrato	Semilla
		Malta	
<b>Tratamientos:</b>	8	S <sub>0</sub> , S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , S <sub>3</sub>	
		M <sub>0</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub>	
<b>Variable independiente:</b>	3 g de sustrato en 50 ml de agua @ 65°C		
<b>Variable dependiente:</b>	Viscosidad		
	Color		
	pH		
	Azúcares Reductores Directos (%)		
<b>Repeticiones:</b>	2		
<b>Datos:</b>	16		

- **HORAS DE MACERACIÓN**

**Ho:** No hay efecto del tiempo de maceración sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(M_{0h} = M_{1h} = M_{2h} = M_{3h})$$

**Ha:** Para al menos un nivel de horas de maceración la concentración de azúcares reductores difiere.

$$(M_{0h} \neq M_{1h} \neq M_{2h} \neq M_{3h})$$

- **SUSTRATO**

**Ho:** No hay efecto del sustrato utilizado sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$[\text{AR semilla}] = [\text{AR malta}]$$

**Ha:** Para al menos un nivel de sustrato difiere en la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$[\text{AR semilla}] \neq [\text{AR malta}]$$

- **TRATAMIENTOS**

**Ho:** No hay efecto del tratamiento utilizado sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(T_{S0} = T_{S1} = T_{S2} = T_{S3} = T_{M0} = T_{M1} = T_{M2} = T_{M3})$$

**Ha:** Al menos un tratamiento difiere en la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(T_{S0} \neq T_{S1} \neq T_{S2} \neq T_{S3} \neq T_{M0} \neq T_{M1} \neq T_{M2} \neq T_{M3})$$

Tabla 9. DCA para la hidrólisis química de la semilla y malta de amaranto.

Unidad experimental:	3 g de malta de amaranto		
<b>Factor:</b>	2	Minutos de reacción	0
			3
			15
			30
			60
		Sustrato	Semilla
		Malta	
<b>Tratamientos:</b>	10	S <sub>0</sub> , S <sub>3</sub> , S <sub>15</sub> , S <sub>30</sub> , S <sub>60</sub>	
		M <sub>0</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>15</sub> , M <sub>30</sub> , M <sub>60</sub>	
<b>Variable independiente:</b>	3 g de sustrato en 50 ml de agua @ 65°C		
<b>Variable dependiente:</b>	Viscosidad		
	Color		
	pH		
	Azúcares Reductores Directos (%)		
<b>Repeticiones:</b>	2		
<b>Datos:</b>	20		

- **TIEMPO DE REACCIÓN**

**Ho:** No hay efecto del tiempo de reacción del ácido sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(TRX_0 = TRX_3 = TRX_{15} = TRX_{30} = TRX_{60})$$

**Ha:** Para al menos un nivel de tiempo de reacción la concentración de azúcares reductores difiere.

$$(TRX_0 \neq TRX_3 \neq TRX_{15} \neq TRX_{30} \neq TRX_{60})$$

- **SUSTRATO**

**Ho:** No hay efecto del sustrato utilizado sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$[AR \text{ semilla}] = [AR \text{ malta}]$$

**Ha:** Para al menos un nivel de sustrato difiere en la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$[AR \text{ semilla}] \neq [AR \text{ malta}]$$

- **TRATAMIENTOS**

**Ho:** No hay efecto el tratamiento utilizado sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(TS_0 = TS_3 = TS_{15} = TS_{30} = TS_{60} = TM_0 = TM_3 = TM_{15} = TM_{30} = TM_{60})$$

**Ha:** Al menos un tratamiento difiere en la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(TS_0 \neq TS_3 \neq TS_{15} \neq TS_{30} \neq TS_{60} \neq TM_0 \neq TM_3 \neq TM_{15} \neq TM_{30} \neq TM_{60})$$

**Tabla 10. DCA para la hidrólisis enzimática utilizando cebada (Etapa 1).**

Unidad experimental:	Lote 3 litros de cerveza		
Factor:	1	Adición de cebada	10%
			20%
Tratamientos:	2	90 % amaranto : 10 % cebada	
		80 % amaranto : 20 % cebada	
Variable independiente:	Malta de amaranto, 7 días de fermentación @ 10 °C		
Variable dependiente:	Viscosidad		
	Color		
	pH		
	Azúcares Reductores Directos (%)		
Repeticiones:	1		
Datos:	2		

**Ho:** No hay efecto del porcentaje de cebada utilizada sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$[AR] \text{ Amaranto: cebada (90:10)} = [AR] \text{ Amaranto: cebada (80:20)}$$

**Ha:** Al menos un porcentaje de cebada utilizada difiere en la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

[AR] Amaranto: cebada (90:10) ≠ [AR] Amaranto: cebada (80:20)

**Tabla 11. DCA para la hidrólisis enzimática utilizando enzimas comerciales (Etapa 2).**

<b>Unidad experimental:</b>	<b>3 g de malta de amaranto</b>		
<b>Factor:</b>	3	Enzima comercial	amilasa
			glucoamilasa
	Gelatinizada		Si
			No
	Minutos de reacción		5
			15
			30
			60
		120	
<b>Tratamientos:</b>	20	AG5, AG15, AG30, AG60, AG120	
		A5, A15, A30, A60, A120	
		GG5, GG15, GG30, GG60, GG120	
		G5, G15, G30, G60, G120	
<b>Variable independiente:</b>	3 g de sustrato en 50 ml de agua @ 65°C		
<b>Variable dependiente:</b>	Azúcares Reductores Directos (%)		
<b>Repeticiones:</b>	2		
<b>Datos:</b>	40		

- **ENZIMA COMERCIAL**

**Ho:** No hay efecto de la enzima comercial utilizada sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

[AR] AMILASA = [AR] GLUCOAMILASA

**Ha:** Para al menos un nivel de enzima comercial la concentración de azúcares reductores difiere.

$$[AR] \text{ AMILASA} \neq [AR] \text{ GLUCOAMILASA}$$

- **ESTADO DEL MOSTO**

**Ho:** No hay efecto del estado del mosto sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$[AR] \text{ Mosto sin gelatinizar} = [AR] \text{ Mosto gelatinizado}$$

**Ha:** Para al menos un nivel de estado del mosto la concentración de azúcares reductores difiere.

$$[AR] \text{ Mosto sin gelatinizar} \neq [AR] \text{ Mosto gelatinizado}$$

- **TIEMPO DE REACCIÓN**

**Ho:** No hay efecto del tiempo de reacción de la enzima sobre la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$(TRX_5 = TRX_{15} = TRX_{30} = TRX_{60} = TRX_{60} = TRX_{120})$$

**Ha:** Para al menos un nivel de tiempo de reacción la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto difiere.

$$(TRX_5 \neq TRX_{15} \neq TRX_{30} \neq TRX_{60} \neq TRX_{60} \neq TRX_{120})$$

- **TRATAMIENTOS**

**Ho:** No hay efecto en la concentración de azúcares reductores sobre el tratamiento utilizado.

$$AG_5 = AG_{15} = AG_{30} = AG_{60} = AG_{120} = A_5 = A_{15} = A_{30} = A_{60} = A_{120} = GG_5 = GG_{15} = GG_{30} = GG_{60} = GG_{120} = G_5 = G_{15} = G_{30} = G_{60} = G_{120}$$



**Ha:** Al menos un tratamiento difiere en la concentración de azúcares reductores extraídos en el mosto.

$$AG_5 \neq AG_{15} \neq AG_{30} \neq AG_{60} \neq AG_{120} \neq A_5 \neq A_{15} \neq A_{30} \neq A_{60} \neq A_{120} \neq GG_5 \neq GG_{15} \neq GG_{30} \neq GG_{60} \neq GG_{120} \neq G_5 \neq G_{15} \neq G_{30} \neq G_{60} \neq G_{120}$$

**Tabla 12. DCA para cuantificar el porcentaje de alcohol en cervezas maduras.**

Unidad experimental:	25 ml de cerveza verde	
<b>Factor:</b>	1	100 % amaranto
		100 % amaranto pH ajustado
		Hidrólisis ácida
		Hidrólisis con cebada
		Hidrólisis con enzimas comerciales
<b>Tratamientos:</b>	5	100 % amaranto
		100 % amaranto pH ajustado
		Hidrólisis ácida
		Hidrólisis con cebada
		Hidrólisis con enzimas comerciales
<b>Variable independiente:</b>	0.1 µl de cerveza desgasificada	
<b>Variable dependiente:</b>	Porcentaje de alcohol	
<b>Repeticiones:</b>	3	
<b>Datos:</b>	15	

- **PORCENTAJE DE OH EN CERVEZAS MADURAS**

**Ho:** No hay efecto del tipo de hidrólisis aplicado al mosto sobre el porcentaje de alcohol en las cervezas maduras.

$$[OH]_{100\% \text{ amaranto}} = [OH]_{100\% \text{ pH ajustado}} = [OH]_{\text{Hidrólisis ácida}} = [OH]_{\text{Hidrólisis cebada}} = [OH]_{\text{Hidrólisis enzimas comerciales}}$$

**Ha:** Al menos un porcentaje de alcohol en las cervezas maduras difiere.

$$[OH]_{100\% \text{ amaranto}} \neq [OH]_{100\% \text{ pH ajustado}} \neq [OH]_{\text{Hidrólisis ácida}} \neq [OH]_{\text{Hidrólisis cebada}} \neq [OH]_{\text{Hidrólisis enzimas comerciales}}$$

## Capítulo 12. Resultados y discusión

### 12.1 Análisis de la semilla de amaranto

Es importante partir con una semilla con las características adecuadas para que el proceso de germinación se vea beneficiado, para esto fue importante realizar pruebas de calidad a la semilla de amaranto. Se realizó una evaluación visual de la semilla (Figura 16), la cual muestra un color amarillo hueso, olor limpio (a cereal), sin signos de contaminación, así como tamaño homogéneo, mínima cantidad de granos dañados y sin presencia de semillas con indicio de germinación. La presencia de basura y cuerpos extraños ocasionó la necesidad de cribar la semilla pasándola por una malla No. 10.

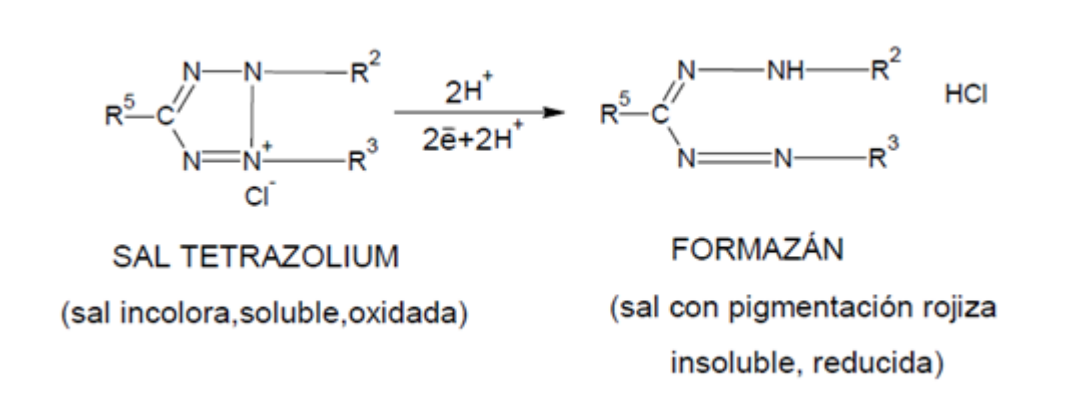


**Figura 16. Semilla de amaranto.**

#### 12.1.1 Prueba de viabilidad

La prueba de tetrazolio, es una prueba bioquímica utilizada para medir la actividad respiratoria asociada a la cadena de transporte de electrones en las semillas o granos de cereales; de esta manera podemos conocer la juventud de la semilla y su capacidad de germinar; sumergiendo las semillas en solución de sal de tetrazolio (cloruro de 2, 3,5-trifenil-tetrazolio).

En el proceso de reducción en las células vivas, los tetrazoles actúan como aceptadores de los electrones liberados por la enzima deshidrogenasa, particularmente del ácido málico, reduciendo la sal de tetrazolio y formando una sustancia roja, estable y no difundible, el trifenil-formazan (Victoria *et al.*, 2006) (Figura 17).



**Figura 17. Reducción Sal de Tetrazolio (López, 2012).**

Esta sustancia se establece con diferentes grados de tinción y en distintas regiones de la semilla, por ejemplo: radícula, plúmula, eje embrional y cotiledones entre otros; indicando que existe actividad respiratoria en las mitocondrias, por lo tanto existe viabilidad celular y del tejido. El trifenil-formazan se estableció principalmente en los cotiledones y el endospermo de la semilla, la parte del perispermo permaneció incolora (Figura 18). Se obtuvo una viabilidad promedio de la semilla de amaranto de 98.18 %, el cual es superior al 96 % reportado por Kreisz en el 2009.



**Figura 18. Semillas de amaranto en sal de tetrazolio y tinción después de la reacción.**

Estimando la capacidad y energía germinativa, nos permitirá medir el porcentaje de granos que no están latentes, el cual es un estado fisiológico transitorio o de inmadurez que impedirá al grano germinar a pesar de tener las condiciones adecuadas, este dato se obtiene por diferencia de la capacidad germinativa y de la energía de germinación (Garibay, 1993).

$$\text{Capacidad germinativa} - \text{Energía germinativa} = \text{Latencia}$$

En la Tabla 6, se muestra el porcentaje de viabilidad, energía y latencia para cada muestra los cuales arrojaron estimados promedio de 98.18 %, 94.33 %, y 3.84 % respectivamente; por lo que la semilla de amaranto se consideró saludable y adecuada favorable para una buena germinación.

**Tabla 13. Viabilidad de la semilla de amaranto.**

Muestra	Viabilidad (%)	Energía Germinativa (%)	Latencia (%)
1	97.27	93.81	3.46
2	98.18	93.92	4.26
3	99.09	95.27	3.82
<b>Promedio</b>	98.18	94.33	3.84

## 12.2 Pruebas de germinación

**Tabla 14. Tratamientos germinativos evaluados en la semilla de amaranto.**

Tratamiento	Solución	Descripción
<b>A</b>	NaOH	Remojo intermitente (NaOH: aire) (4 h: 1.5 h: 2 h: 1.5 h)
<b>B</b>	0.2 %	Remojo inicial 4 horas, hidratación por aspersion cada 3 horas
<b>C</b>	Agua	Remojo intermitente (agua: aire) (4 h: 1.5 h: 2 h: 1.5 h)
<b>D</b>		Remojo inicial 4 horas, hidratación por aspersion cada 3 horas

Se cuenta con poca información respecto al malteo de granos o semillas para la elaboración de cerveza, hasta hace poco De Meo *et al.* (2011) en Italia, compararon distintos cereales y pseudocereales como alternativa para la elaboración de una cerveza libre gluten. Para ello, realizaron un proceso de malteo, con distintos días de germinación (3, 6, 7 días), temperaturas desde 8 hasta 25 °C, así como el uso de un pre-tratamiento a las semillas, remojándolas intermitentemente en una solución de hidróxido de sodio (NaOH 0.2% p/v) para evitar la contaminación del germinado.

Concluyeron que germinar a una temperatura de 25 °C aumenta el poder de germinación, en cambio germinar a una temperatura de 8 y 10 °C disminuye la capacidad germinativa de la semilla; y al realizar el pre-tratamiento con NaOH al 0.2 % p/v se previene el ataque microbiano a la semilla durante la germinación.

Durante la marcha se realizaron distintas pruebas en las que se variaron los tiempos de remojo, los tiempos de exposición de la semilla y el tamaño del lecho. Los resultados mostraron que dejar la semilla remojando por más de 4 horas y/o formar las capas del lecho superiores a los 10 cm, provocaba la fermentación de la semilla, generando espuma en el sistema y desprendimiento de olores desagradables, como a yogurt pasado.

Con base en estos resultados, se propusieron los tratamientos finales para la germinación de la semilla, explicados en la Tabla 7. Se evaluó el remojo intermitente, el cual consistió en sumergir la semilla por 4 horas, y después exponerla por 1.5 horas fuera del líquido para permitir su respiración y liberación de calor, posteriormente se vuelven a remojar por 2 horas para finalmente volver a retirarlas del medio acuoso.

Por otro lado, se evaluó el efecto que produce la hidratación por aspersión, realizando inicialmente un remojo por 4 horas, para después extenderlas en charolas sin superar los 10 cm de altura del lecho. Las semillas se hidrataron cada 3 horas por medio de aspersión y movimiento del lecho. Los líquidos de remojo sometidos a prueba fueron la solución alcalina de NaOH al 0.2 % p/v y agua destilada.

Los tratamientos presentaron diferencia marcadas, aquellos en los que la germinación fue llevada a cabo en cajas de aluminio y agua, lo hicieron bajo circunstancias normales, sin embargo, la presencia de NaOH reaccionó con el aluminio produciendo aluminatos ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )– los cuales actúan como anfóteros. La presencia de los aluminatos provocaron corrosión de las cajas (Figura 19) ejerciendo un efecto negativo en la germinación de las semillas, obteniendo un porcentaje de germinación para el amaranto sin tratar (AST) del 80 %, y para el amaranto tratado (AT) del 40 %, siendo la mitad respecto al no tratado; así como un efecto de burbujeo debido a la formación de hidrógeno.



**Figura 19. Corrosión de cajas de aluminio durante la germinación con NaOH.**

Al observar que las cajas de aluminio reaccionaban con el NaOH, se cambiaron por charolas de plástico para evitar que los aluminatos ejercieran un efecto durante la germinación. Para el primer día de germinación, los 4 tratamientos nos sufrieron cambios visuales significativos, únicamente la absorción del agua por parte de la semilla provocando un incremento en tamaño y tornándose cristalina, permitiendo diferenciar las partes de la semilla del amaranto (Figura 20). Por otro lado, las semillas tratadas con NaOH comenzaron a tomar un color amarillo quemado.



**Figura 20. . Estructura cristalina del amaranto.**



La absorción de agua y expansión del grano fue más notoria al día 2 de germinación, así como la aparición de algunas raíces se hizo evidente. En cuanto al poder germinativo, en las semillas tratadas con NaOH y remojo intermitente (A) no hubo indicios de germinación; en el tratamiento por aspersión (B) solo algunas semillas iniciaron su germinación, aunque no homogénea y presentando para ambos tratamientos cambios en la coloración de las semillas (Figura 21).



**Figura 21. Día 2, semillas de amaranto germinados con NaOH (Tratamientos A y B).**

En las semillas geminadas con agua (C y D), la raíz comenzó a ser más notoria sin importar el tratamiento, el tratamiento con agua por aspersión presentó el mayor número de semillas germinadas; en ambos tratamientos el color amarillo hueso de las semillas permaneció durante el segundo día (Figura 22).

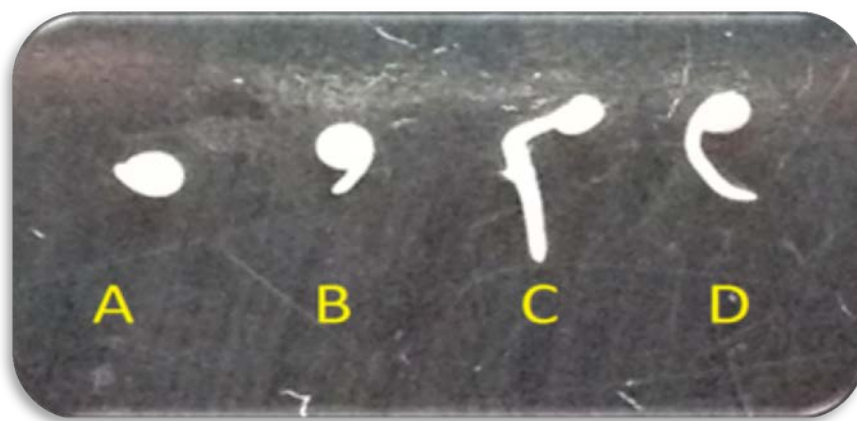


**Figura 22. Día 2, semillas de amaranto germinados con NaOH (Tratamientos C y D).**



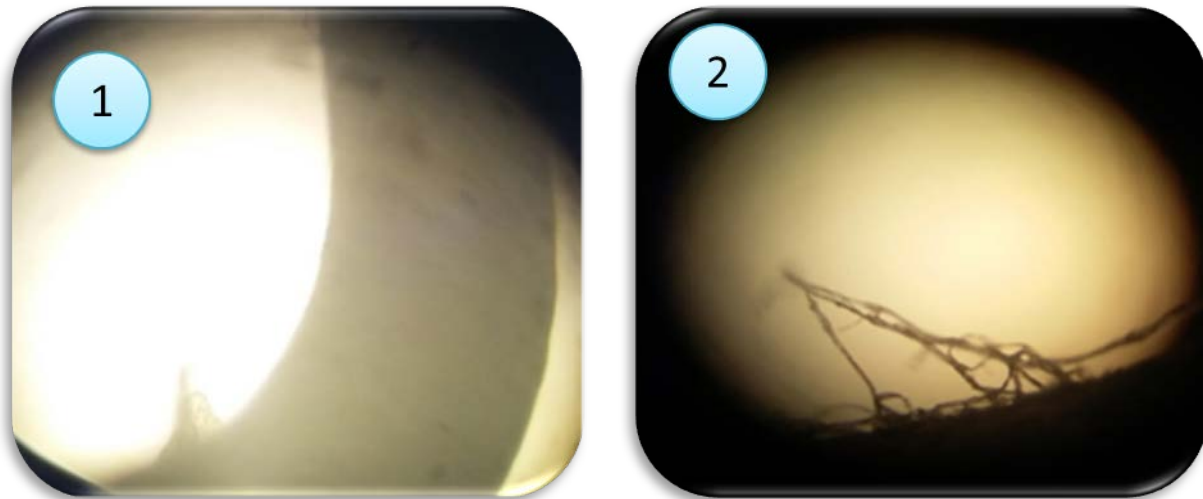
Para el tercer en las semillas tratadas con NaOH remojo intermitente (Tratamiento A) no se observaron indicios de germinación, por lo que se asumió que la presencia del hidróxido de sodio elevó el pH de la semilla, afectando el paquete enzimático, inhibiendo la síntesis del ácido giberélico y deteniendo el crecimiento de la raíz de la semilla.

Las semillas con el tratamiento por aspersión (Tratamiento B), germinaron de manera no homogénea, dando un tamaño de raíz entre 0.1 a 0.5 cm. En cambio las semillas de amaranto germinadas con agua, en ambos tratamientos (C y D) presentaron mayor capacidad y velocidad germinativa, así como un tamaño de raíz con una longitud de 2 a 3 veces mayor, es decir de 1.5 cm para C y 1 cm para las D (Figura 23).



**Figura 23. Tamaño de las raíces de semillas de amaranto germinadas.**

No obstante, la presencia de hongos en la raíz de las semillas tratadas con agua fue más evidente en las tratadas con el remojo intermitente (Tratamiento C) que en las de remojo por aspersión cada 3 horas (Tratamiento D). En la Figura 24, se muestra la raíz de la semilla de amaranto con el Tratamiento D libre de contaminación, así mismo se muestra la raíz de la semilla contaminada al utilizar el tratamiento C.



**Figura 24. (1) Vista en microscopio (10 x) de la raíz de la semilla de amaranto (Tratamiento D). (2) Vista en microscopio (10 x) de la raíz de la semilla de amaranto (Tratamiento C).**

Noeltin *et al.* (2004) han identificado diferentes géneros de hongos fúngicos presentes durante la germinación de la semilla de amaranto. Registraron un total de catorce géneros fúngicos (de campo y de almacenamiento) siendo *Alternaria* el género aislado con mayor frecuencia. Las semillas de *A. hypochondriacus* exhibieron una mayor contaminación por *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*; en tanto que las semillas de *A. cruentus* presentaron una mayor contaminación por *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

De los tratamientos evaluados, el que presentó mejores resultados para obtener la malta de amaranto libre de contaminación fue el D consistente en un remojo de 4 horas e hidratación intermitente por medio de aspersión. Pese que ambos tratamientos (C y D) obtuvieron una energía germinativa superior, se atribuye a que en el tratamiento C, la semilla al tener una mayor disposición de agua, comenzó primero el proceso de pudrición haciendo más susceptible las semillas al ataque microbiano.

En el tratamiento D, al permitir que la semilla respire por periodos más largos, y que la disposición de agua y humedad sea menor, se disminuye la probabilidad de que la semilla sea foco para un ataque microbiano.

Por lo tanto, utilizar el NaOH como pretratamiento alcalino para evitar la contaminación de la malta como lo sugiere De Meo *et al.* (2011), no fue eficiente, ya que ejerció un efecto negativo en la velocidad de germinación, aunque sí disminuyó la contaminación en la malta de amaranto.

Hager *et al.*, en Berlín en el 2014, reporta que la semilla de quinoa (del mismo género que el amaranto) presenta baja actividad de la  $\alpha$ -amilasa en el embrión de las semillas sin germinar, pero emergen en el perispermo después de 24 horas de germinación. El contenido inicial de almidón estimado en semillas de quinoa no germinadas, fue del 52% el cual comenzó a decrecer después de 24 horas de haber iniciado la germinación estimando una concentración del 39.5%. De la misma forma la liberación de glucosa y fructosa, se observaron después de las 24 y 36 horas de germinación.

Balasubramanian *et al.* (1989) reportaron que durante el proceso de germinación, la semilla toma parte de los carbohidratos para crecer, liberando en mayor cantidad azúcares no reductores, en forma de sacarosa, la cual decrece del 5.2 al 3.4 % durante las primeras 24 horas, debido principalmente a que la semilla toma este carbohidrato como fuente de energía (Hager *et al.*, 2014).

Con base en lo anterior y conforme el proceso de malteo se escalaba, fue necesario someter a distintos tiempos de remojo la semilla de amaranto dado que entre mayor cantidad de semilla se utilizaba, ésta requería un mayor tiempo de contacto con el líquido. Después de distintas pruebas se estandarizó un proceso de malteo, con el que se obtiene malta de amaranto libre de contaminación, el cual se explica a continuación.



Figura 25. Diagrama de flujo para obtener malta de amaranto.

En la Figura 25, se muestra el diagrama de flujo seguido para la elaboración de la malta de amaranto. Se realizó la limpieza de 2 kg de semilla de amaranto, retirando material ajeno a esta como palos, hojas y polvo al pasar la semilla por una malla No. 10. Se lavó la semilla de amaranto con agua purificada para iniciar el remojo con relación 1:3 por un periodo de 4 horas a temperatura ambiente cubriendo el recipiente con una gasa, posteriormente se formaron lechos no mayores a 5 cm de altura de semilla de amaranto en charolas de plástico (60 cm X 30 cm) para la germinación por 3 días de la semilla. Se favoreció la respiración de ésta mezclando el lecho de amaranto cada 3-4 horas y adicionando agua por aspersión para evitar que la semilla se secase.

La germinación se detuvo al tercer día colocando la semilla germinada en charolas de aluminio por 42 horas a 50 °C. Una vez obtenida la malta de amaranto se disminuyó el tamaño de partícula con ayuda de un molino de café (Krupps GX4100), triturando el grano por no más de 10 segundos para evitar que todas las semillas se transformaran en harina y se diera el efecto talco en la malta.

## 12.3 Sacarificación

### 12.3.1 Natural

Una vez que se obtuvo la malta de amaranto, se procedió a la elaboración de cerveza de acuerdo a la maceración tradicional realizada en la cebada, Figura 26. El granulo de almidón presente en el amaranto mide menos de 1  $\mu\text{m}$ , y es considerado de los más pequeños dentro de los cereales (Morales, 2009), por lo tanto se aumentó el tiempo de sacarificación (etapa 3), permitiendo la difusión del agua hacia el gránulo por periodos de 1, 2 y 3 horas (Tabla 8).

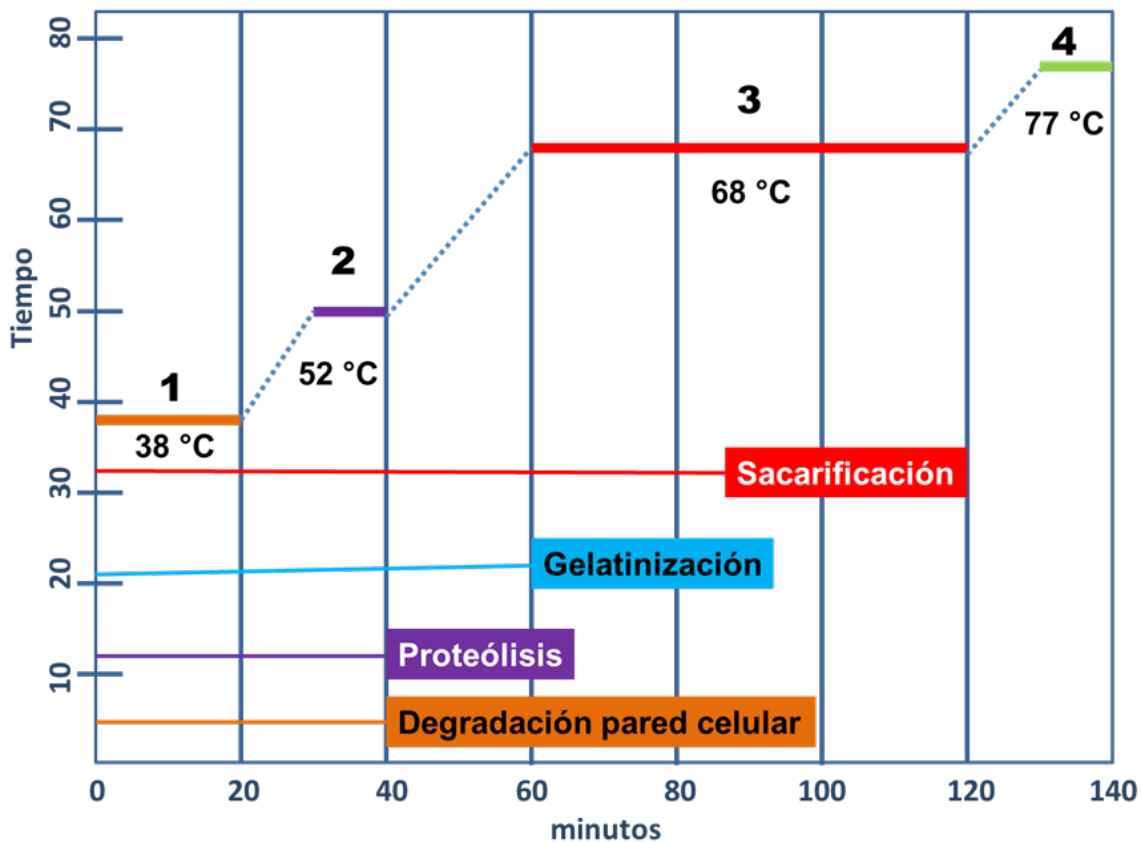


Figura 26. Maceración escalonada para obtención del mosto.

**Tabla 15. Hidrólisis natural.**

Tratamiento	Sustrato	Tiempo de hidrólisis natural (horas)	Variable respuesta
<b>S<sub>0</sub></b>	Semilla de amaranto	Control	% de azúcares reductores directos
<b>S<sub>1</sub></b>			
<b>S<sub>2</sub></b>		1	
<b>S<sub>3</sub></b>			
<b>M<sub>0</sub></b>	Malta de amaranto	2	
<b>M<sub>1</sub></b>			
<b>M<sub>2</sub></b>		3	
<b>M<sub>3</sub></b>			

- Etapa 1. Ajuste del pH del mosto

El mosto que se obtuvo a partir de la malta de amaranto presentó un pH de 6.5, por lo que se evaluó el efecto que produce el pH del mosto para permitir que la levadura pueda transformar los carbohidratos presentes en la malta de amaranto (Tabla 9). Se elaboraron dos cervezas teniendo una como control, manteniendo el pH original del mosto de 6.5, y otro tratamiento en el que se acidificó el mosto a pH 5.5 con ácido cítrico 0.1 N.

**Tabla 16. Tratamiento de hidrólisis natural ajustando el pH.**

Tratamiento Mosto	Descripción
<b>Control</b>	El mosto permanece con el pH original (6.54)
<b>Ajustado</b>	Adición de ácido cítrico 0.1 N para obtener el mosto a pH 5.5

- Etapa 2. Maceración

Se continuó con la maceración escalonada antes mencionada, modificando el tiempo de maceración (1, 2 y 3 horas) a 65 °C para favorecer que la beta amilasa actúe de manera más eficiente en la hidrólisis del almidón. En la Figura 27, se muestran las unidades experimentales para la maceración de la semilla y malta de amaranto.



**Figura 27. Hidrólisis natural en semilla y malta de amaranto.**



**Figura 28. Maceración durante 0, 1, 2 y 3 horas de la semilla de amaranto.**



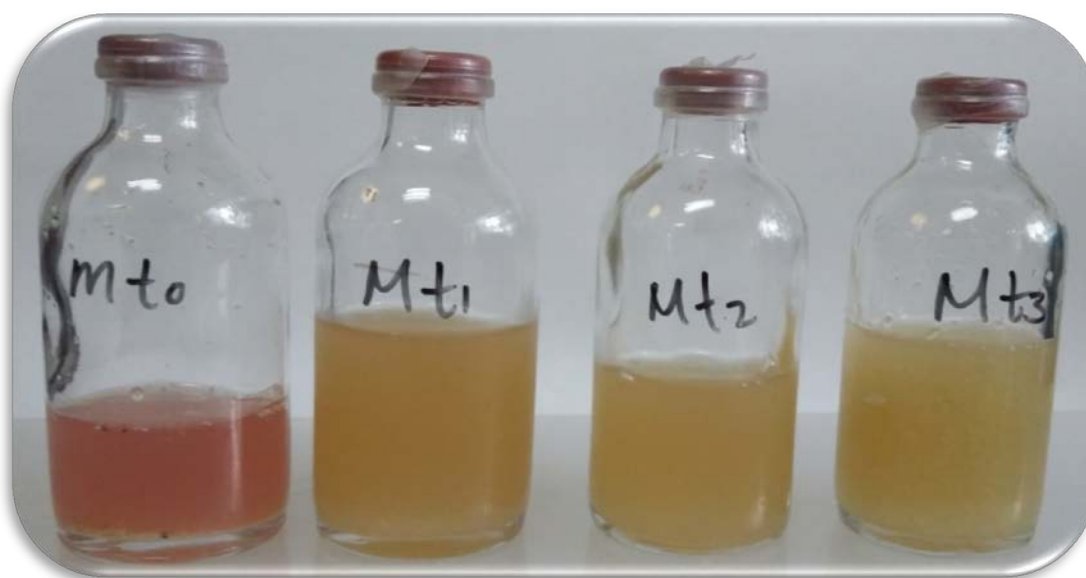
Cuando se adiciona agua a la harina y a la malta de amaranto, ésta penetra por difusión a los gránulos de almidón, hinchándolos ligeramente cerca del 5 % hasta alcanzar la saturación, la cual decrece al incrementar la temperatura del sistema debido a la pérdida de sólidos solubles durante el remojo (Calzetta *et al.*, 2005). El cambio de volumen y la absorción de agua son reversibles si el calor del sistema está por debajo de la temperatura de gelatinización (65 a 68 °C), como en la unidad experimental control ( $S_0$ ) que no se calentó y por ello no sufrió cambios.

Al adicionar agua caliente a la harina de semilla de amaranto ( $S_1$ ), el agua y el calor favorecieron la alteración de la estructura del gránulo, provocando su hinchamiento permitiendo la liberación de la amilosa e incrementando su viscosidad. El calentamiento del almidón causa ruptura de los puentes de hidrógeno entre las cadenas del almidón y con la liberación de la amilosa se produce un gel débil en el sistema (Cruz-Ruiz, 2012) (Figura 28).

Esta viscosidad, atribuida a la gelatinización del almidón, incrementa conforme el tiempo de maceración también aumenta, generando una pasta de almidón, en la que la mayoría de los gránulos se encuentran hinchados, dañados y/o fragmentados, dificultando su manejo de este pero se forma un gel resistente debido a la ruptura de la amilopectina, como se observó en los tratamientos ( $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ ).

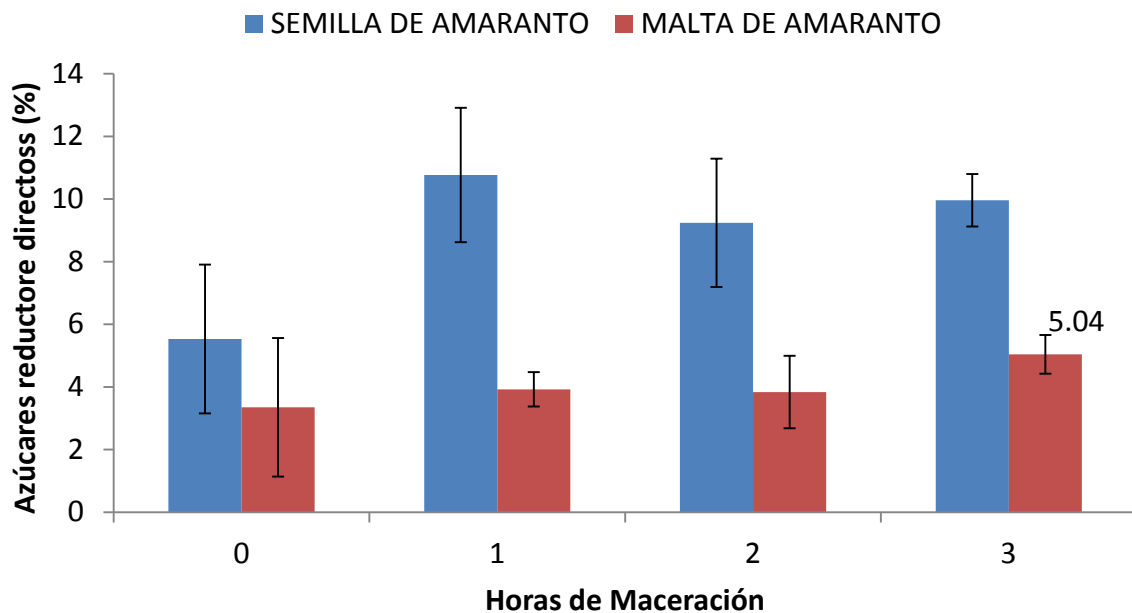
Calzetta *et al.* (2005) reportaron que la temperatura a la cual los gránulos de almidón comienzan su gelatinización corresponde a los 64 °C. Por otro lado, en India Kaur *et al.*, en el 2010, establecieron que la baja actividad catalítica de la  $\alpha$ -amilasa es responsable de conferir las propiedades adecuadas para la formación de la pasta al incrementar su viscosidad.

La actividad de la  $\alpha$ -amilasa fue inversamente relacionada a la dureza del gel, gomosidad y adhesividad, aunque la correlación no fue significativa. La firmeza de gel es causada principalmente por la retrodegradación del almidón, que se asocia con la sinéresis de agua y la cristalización de la amilosa, que conduce a geles más duros.



**Figura 29. Malta de amaranto macerada durante distintos tiempos.**

Durante la hidrólisis natural de la malta de amaranto, se puede observar que la acción de las enzimas amilolíticas como las glucanasas y amilasa, sintetizadas durante el malteo ejercen un efecto significativo al reducir la viscosidad de mosto, tal como lo reportan Hager *et al.*, en el 2014. Un detalle que salta a la vista es la obtención de un mosto color rosa (Figura 29) esto se debe a que durante la germinación no solo se sintetizan enzimas sino también otros metabolitos que confieren color al líquido, llamados betalaínas, principalmente la amarantina que existe como sal en las vacuolas de las células vegetales (Paredes, López, 2013). Sin embargo, la estabilidad del pigmento no es tan grande, comienza a degradarse al superar temperaturas de 68 °C.



**Gráfica 1. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis natural de la semilla y malta de amaranto.**

Comparando el porcentaje de azúcares reductores presentes en los distintos tratamientos, podemos observar en la Gráfica 1, que la maceración de las semillas de amaranto duplico los azúcares reductores respecto a la malta de amaranto. Chauhan *et al.*, en India en el 2015, señala que la concentración de carbohidratos en semillas germinadas disminuye debido al incremento de las enzimas amilasas que hidrolizan el almidón liberando carbohidratos más simples y fáciles de digerir.

A pesar que se obtiene un mayor porcentaje de azúcares en la semilla de amaranto, cuando se somete a un calentamiento y se forma la pasta de almidón, se dificulta su manejo para su futuro uso. Para ambos tratamientos, resulta significativo el efecto del tiempo de maceración (1 y 3 horas) para extraer en el mosto los carbohidratos presentes en la semilla y malta de amaranto, con una probabilidad de P (0.0486, y 0.0216), respectivamente.

Por el método natural, la hidrólisis de la malta de amaranto resultó poco eficiente para la extracción estimada del 5% de los azúcares reductores en el mosto, con 3 horas de maceración. La actividad amilolítica, reportada por Hager en el 2014 en la semilla de quinoa, es significativamente baja comparada con la de la cebada, estimando de 30-60 U/g para la quinoa y 180 U/g para la cebada después de 72 horas de germinación.

En el primer día la actividad fermentativa no generó cambios significativos, pero al día tres se observó la formación de espuma más vigorosa, señal positiva de que la transformación de azúcares está ocurriendo. Al final de la fermentación, se obtuvo una cerveza con un porcentaje de alcohol de  $1.006 \pm 0.087$  v/v.

El poder diastásico del amaranto está reportado como bajo, es por esto que al elaborar una cerveza fermentando el mosto obtenido por el método natural, el efecto de la actividad amilolítica de la malta de amaranto fue baja, y a pesar de aumentar el tiempo de maceración hasta 3 h, no se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de azúcares reductores extraídos.

En la Figura 30, podemos observar la intensidad de la fermentación indirectamente por el del dióxido de carbono y espuma generados durante el proceso.

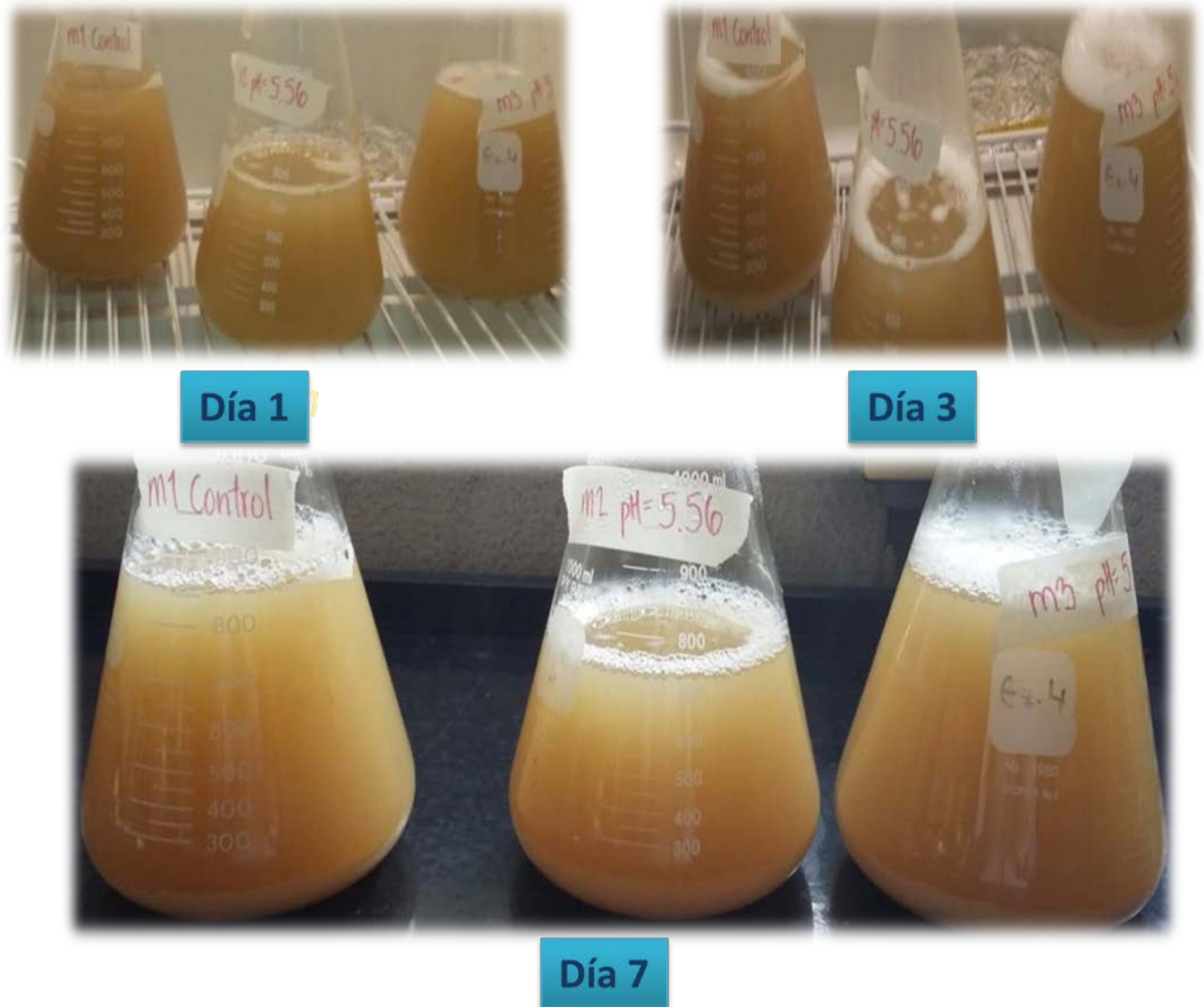


Figura 30. Hidrólisis natural. Estimación de la intensidad de la fermentación por el  $\text{CO}_2$  y espuma generados.



**Figura 31. Cerveza madura de amaranto 100 %.**

### 12.3.2 Química

Debido al bajo poder diastásico que presentó la malta de amaranto y por lo tanto la baja concentración de azúcares reductores obtenidos durante la maceración natural en el mosto, se decidió evaluar la hidrólisis del almidón por otro método, en este caso el método químico.

**Tabla 17. Tratamientos evaluados en la hidrólisis química.**

Tratamiento	Sustrato	Tiempo de hidrólisis química (minutos)	Variable respuesta
<b>S<sub>0</sub></b>	Semilla de amaranto	CONTROL	% de azúcares reductores directos
<b>S<sub>3</sub></b>			
<b>S<sub>15</sub></b>		3	
<b>S<sub>30</sub></b>			
<b>S<sub>60</sub></b>			
<b>M<sub>0</sub></b>	Malta de amaranto	15	
<b>M<sub>3</sub></b>		30	
<b>M<sub>15</sub></b>			
<b>M<sub>30</sub></b>			
<b>M<sub>60</sub></b>		60	

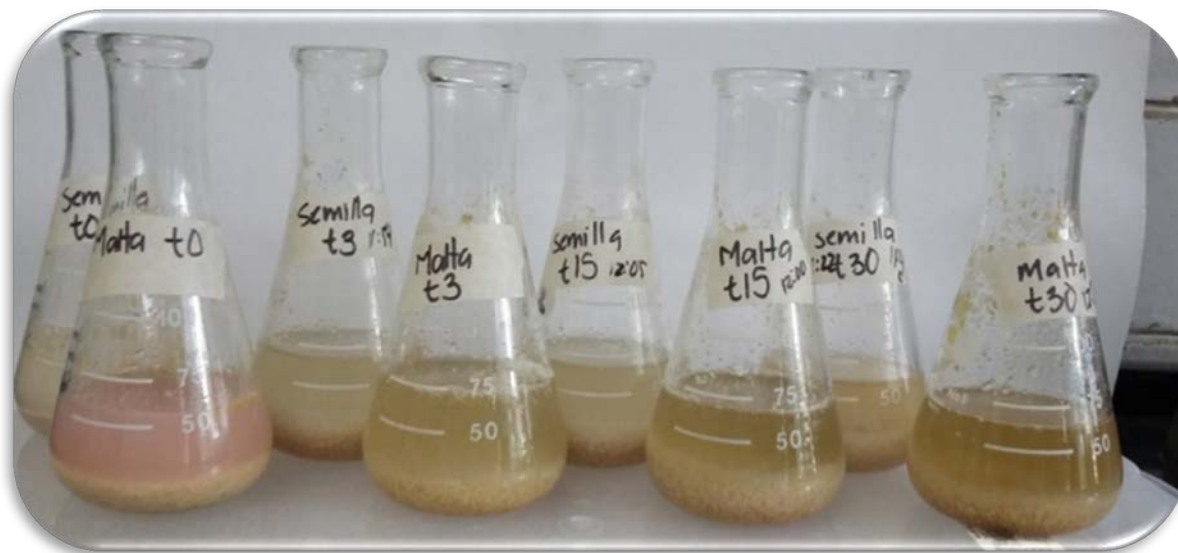
La presencia de enlaces  $\alpha$ -1,6 en la amilopectina es responsable de la formación de zonas amorfas y cristalinas alternadas. Las estructuras de dobles hélices formadas por cadenas adyacentes de amilopectina dan lugar a la capa cristalina, mientras que los puntos de ramificación constituyen las regiones amorfas. Estas regiones amorfas del gránulo de almidón son susceptibles a reacciones químicas, por tanto, éstas pueden ser removidas por acción de ácidos (Palma-Rodríguez, 2010).



Se realizó la hidrólisis química mediante la adición de HCl concentrado para romper los enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 de las cadenas de almidón, las cuales darán como producto dextrinas y azúcares fermentables siendo éstos últimos utilizados por *Saccharomyces pastorianus* para generar etanol y  $\text{CO}_2$ .

Primero, se evaluó únicamente la reacción por 3 minutos, pero al no obtener diferencias significativas se aumentó el tiempo de hidrólisis a sometió a 3, 15, 30 y 60 minutos (Tabla 10).

Los almidones convertidos vía hidrólisis ácida, presentan distintas características, por ejemplo la interrupción de la estructura cristalina de los polímeros de almidón por su rápida degradación a moléculas más pequeñas. Fue notorio el cambio de viscosidad y cristalinidad del mosto obtenido de la semilla de amaranto comparado con el obtenido vía hidrólisis natural, como se muestran en la Figura 32.



**Figura 32. Hidrólisis química de la malta de amaranto.**

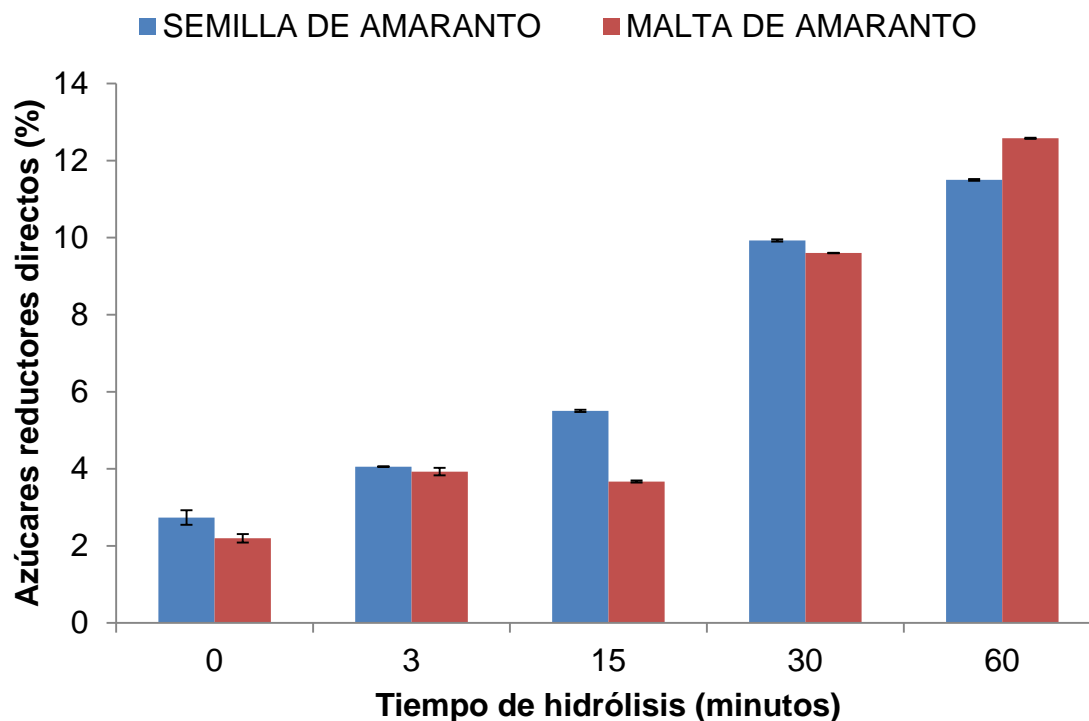


El perfil de viscosidad es el reflejo de los cambios granulares que suceden durante el calentamiento de una dispersión de almidón. Durante la fase de calentamiento (30 a 95 °C), se presenta un aumento en la viscosidad, la cual es registrada como el inicio del hinchamiento de los gránulos. Al continuar calentando, los polímeros de bajo peso molecular, particularmente las moléculas de amilosa, comienzan a lixiviarse desde el gránulo y se obtiene un valor máximo de viscosidad debido al máximo hinchamiento de los gránulos.

Palma-Rodríguez (2010) señala que los almidones modificados por hidrólisis ácida se pueden utilizar en productos que necesiten un proceso de calentamiento y que no requieran incrementar su viscosidad. Compara almidones de papa, maíz y arroz, los cuales fueron modificados químicamente por hidrólisis ácida, señalando la influencia del tamaño del gránulo para obtener propiedades específicas para su uso en la industria.

En la Grafica 2, podemos observar que entre más tiempo consuma la hidrólisis química, la liberación de azúcares reductores en la malta de amaranto aumenta. No existió diferencia significativa entre tratamientos (semilla y malta) en el porcentaje de azúcares extraídos en los tiempos 0, 3, 30 y 60 minutos, excepto a los 15 minutos de hidrólisis cuando se obtuvo un porcentaje estimado de azúcares reductores con diferencia significativa  $P (0.0375)$ .

Sin embargo, hubo diferencias significativas por el efecto del tiempo de hidrólisis. La hidrólisis química al minuto 60, que resultó el tiempo conveniente, dio una concentración 3 veces mayor que solo permitiendo al HCl actuar por 3 minutos. Los almidones hidrolizados vía ácida no presentaron un perfil de formación de pasta ya que no ocurre el hinchamiento de los gránulos debido a la desorganización de la estructura producida por el ácido (Palma-Rodríguez, 2010).



**Gráfica 2. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis química de la semilla y malta de amaranto.**

En la Figura 33, podemos observar, en función del dióxido de carbono y espuma generada durante la fermentación, la intensidad del proceso. La formación de espuma con características jabonosa en la cerveza hidrolizada fue tan vigorosa que sale del sistema; así mismo el color de la cerveza verde adquirió un color café-verdoso. Sin embargo, en la cerveza sin hidrolizar la espuma no resulta tan intensa, tuvo características similares a la cerveza elaborada por el método natural. Utilizando este método hidrolítico se obtuvo una cerveza con un porcentaje de alcohol  $2.72 \pm 0.361$ .



**Figura 33. Cerveza elaborada por hidrólisis química.**

Este método hidrolítico resultó ser el más efectivo para la obtención de azúcares fermentables adecuado para obtener una cerveza con un porcentaje de alcohol cercano al 3% y tuvo las ventajas de ahorro de tiempo, dinero y espacio en la elaboración de la malta. Por lo tanto se podría evitar el malteo del amaranto, pero no hay que olvidar que el principal ingrediente para la elaboración de la cerveza es la malta.

Por otro lado, al ajustar el pH a 5.5 con NaOH al 20% p/v, se formó NaCl y se pensó que podría generar problemas osmóticos para la levadura y dificultar la fermentación, este caso no parece ser un efecto dominante, dado a que la fermentación se llevó a cabo, dando una cerveza de 2.73 % de etanol. Se hizo una degustación pre-eliminar con personas expertas en cerveza señalando que el ajuste con sosa influyó en el sabor final de la cerveza, presentando algunas notas saladas las cuales no son deseadas en la bebida.

### 12.3.3 Enzimática

Debido a que la hidrólisis química no produjo los resultados esperados se propuso la adición de enzimas para la liberación de azúcares reductores presentes en la malta de amaranto; esta hidrólisis se realizó en dos etapas.

- Etapa 1. Enzimas de malta de cebada.

Con el objetivo de evaluar el efecto de las enzimas presentes en la malta de cebada para facilitar la hidrólisis de los carbohidratos del amaranto, se evaluaron dos tratamientos (Tabla 11) con distinta relación de amaranto y cebada, siendo 90 y 10 % para el tratamiento A, y de 80 y 20 % para el tratamiento B respectivamente.

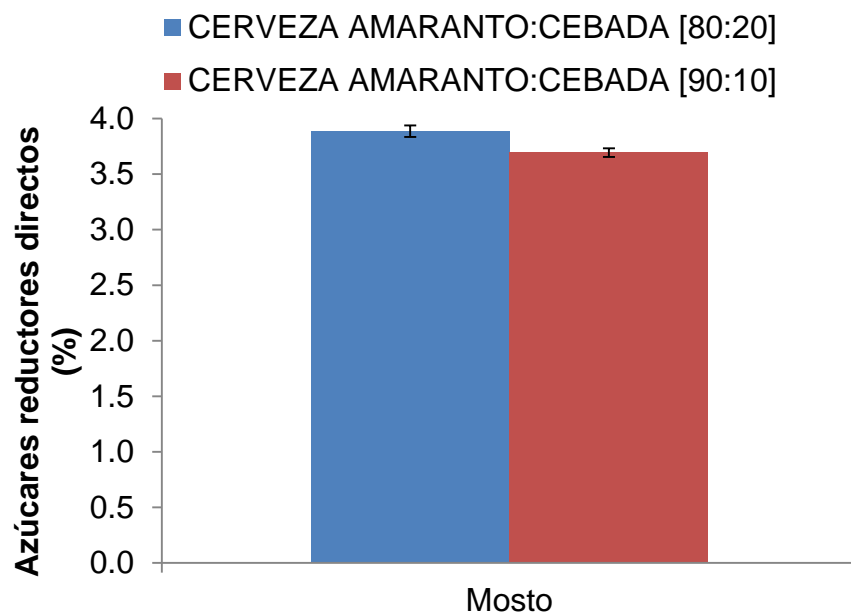
**Tabla 18. Hidrólisis enzimática con la adición de cebada.**

<b>Tratamiento Mosto</b>	<b>Descripción</b>
<b>90:10</b>	Mosto con 90 % malta de amaranto y 10 % malta de cebada
<b>80:20</b>	Mosto con 80 % malta de amaranto y 20 % malta de cebada

En la Gráfica 3 se muestra el porcentaje de azúcares reductores extraídos en el mosto utilizando cebada, no se observó cambio significativo ( $P > 0.05$ ) en la concentración de azúcares reductores presentes en el mosto. Pese a que se aumentó la relación amaranto-cebada no se obtuvo un porcentaje estimado de carbohidratos superior al 4%. Palma-Rodríguez *et al.* (2010) reportan que la variación morfológica y composición química en los gránulos de almidón, son características que afectan las propiedades funcionales de los gránulos, así como su susceptibilidad al ataque enzimático.

Como pudimos observar en la Figura 13, los gránulos de almidón en la malta de quinoa (*Chenopodium quinoa*) por microscopía electrónica de barrido según el estudio de Hager *et al.* (2014) se encuentran tan compactos y ordenados que las capas que cubren cada gránulo dificultan que el ataque enzimático pueda llevarse a cabo.

El objetivo de esta hidrólisis fue utilizar las enzimas presentes en el grano de cebada para facilitar la hidrólisis del almidón de la malta de amaranto, sin embargo no se continuó el aumento de cebada a la mezcla, dado a que el aporte de malta de cebada generó la presencia de atributos relacionados a este grano, principalmente el color del mosto, el cual fue más marcado en la relación 80:20; los demás atributos comenzaron a opacar los sabores y olores del amaranto.



**Gráfica 3. Cuantificación de azúcares por hidrólisis enzimática adicionando cebada.**

La relación amaranto: cebada que resultó más vigorosa durante la fermentación fue la 80:20, no obstante para ambos tratamientos se obtuvo una cerveza con una concentración de alcohol estimado del 1.27 % para la relación (90:10) y de 1.53 % para la relación (80:20) (Figura 34 y 35).

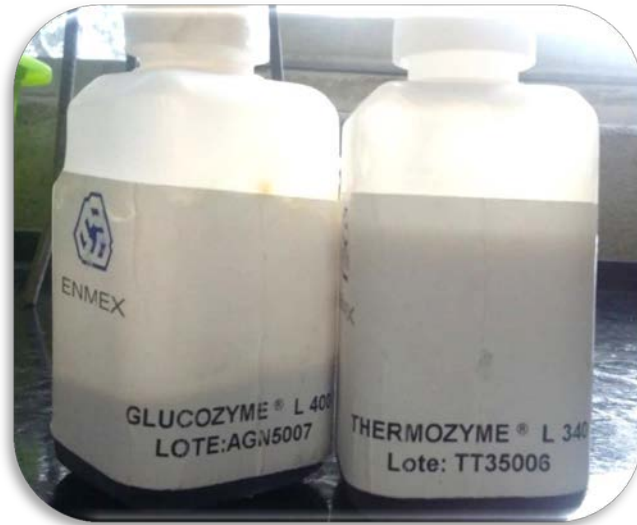


**Figura 34. Efecto de la hidrólisis enzimática Amaranto: Cebada (80:20) en la intensidad de la fermentación juzgada por el CO<sub>2</sub> y espuma desprendida.**



**Figura 35. Efecto de la hidrólisis enzimática Amaranto: Cebada (90:10) en la intensidad de la fermentación juzgada por el CO<sub>2</sub> y espuma desprendida.**

- Etapa 2. Enzimas comerciales.



**Figura 36. Enzimas comerciales.**

En la segunda etapa de la hidrólisis enzimática, se propuso la adición de las enzimas comerciales  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa (Figura 36), las cuales hidrolizarán el almidón presente en la malta de amaranto, rompiendo los enlaces glicosídicos en la unión  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 de los carbohidratos de la amilosa y amilopectina. Se efectuó el siguiente diseño experimental (Tabla 12) en el cual se evaluó el efecto que produce la enzima utilizada, su dosis y tiempo de acción durante la sacarificación de los carbohidratos presentes en el mosto.

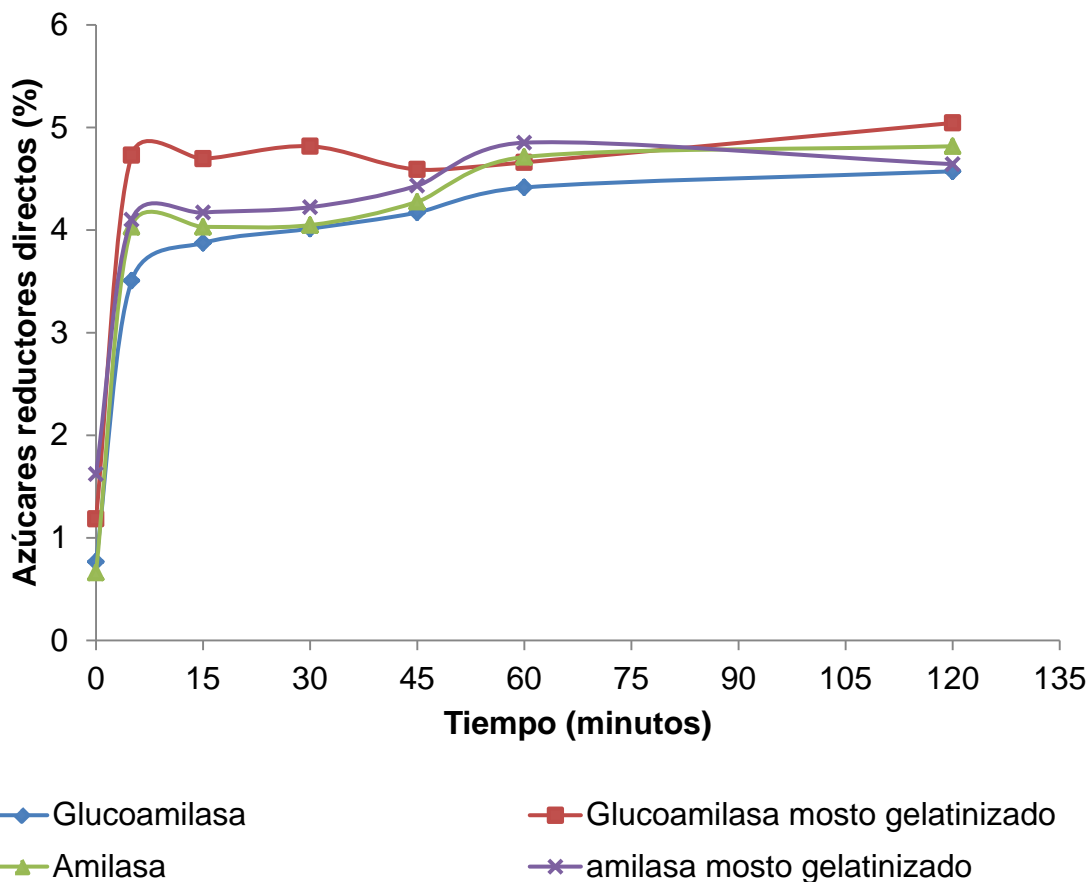
**Tabla 19. Hidrólisis enzimática con enzimas comerciales (Etapa 2).**

ENZIMA	Malta de amaranto	DOSIS ( $\mu$ l)	TIEMPO (minutos)
<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	Sin gelatinizar	50	5, 15, 30, 60
	Gelatinizado		
<b>Glucoamilasa</b>	Sin gelatinizar		
	Gelatinizado		

En la Gráfica 4 se muestra el comportamiento de la hidrólisis enzimática durante los minutos 5, 15, 30, 45 y 60; la actividad de las enzimas resultó ser significativamente distinta durante los tiempos evaluados con una  $P(<0.05)$ , dando un porcentaje de azúcares reductores menor al 5 %. Al realizar la prueba de Tukey se observó que es la enzima glucoamilasa en el mosto gelatinizado la que actúa liberando mayor cantidad de azúcares reductores (Anexo C).

La enzima glucoamilasa presentó una mayor actividad, liberando cerca del 5 % de azúcares reductores a partir del minuto 5, permaneciendo constante durante los 120 minutos de ensayo. Se observó que durante los tiempos evaluados es el mosto gelatinizado en el que la enzima glucoamilasa actúa de mejor manera, coincidiendo con Wang *et al.* (2006) quienes señalan la necesidad de utilizar almidón gelatinizado para que las enzimas puedan actuar con mayor eficiencia.



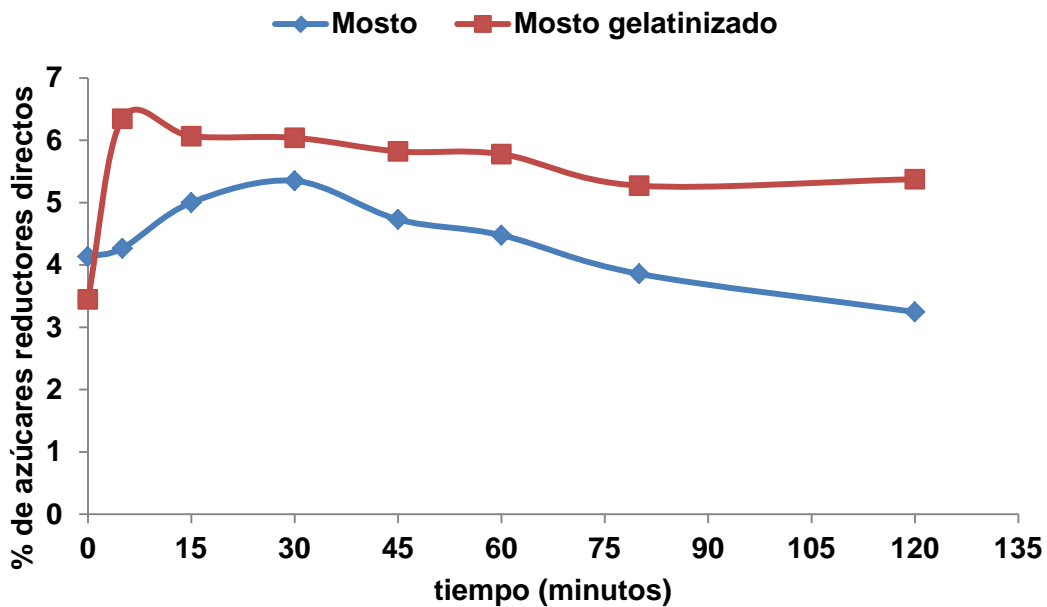


**Gráfica 4. Cinética de extracción de azúcares reductores por enzimas comerciales.**

Se deduce que al utilizar el mosto a una temperatura entre 70 y 75 °C, se evitó que las demás enzimas que contribuyen a la hidrólisis natural del almidón, por ejemplo las  $\beta$ -amilasas, pululanasa y glucoamilasas, actuarán en el sustrato para hidrolizarlo, de tal manera que tienden a desnaturalizarse a estas temperaturas por lo que los únicos productos que se obtienen de la hidrólisis del almidón utilizando la enzima  $\alpha$ -amilasa serían dextrinas, las cuales proporcionarían únicamente cuerpo al mosto sin generar azúcares fermentables.

- Etapa 3. Enzima glucoamilasa

Debido a los resultados anteriores se decidió continuar el estudio enzimático únicamente con la enzima glucoamilasa, al obtener una concentración cercana al 5% de azúcares reductores se aumentó la dosis de enzima a 100  $\mu$ l. En la Gráfica 5, se muestra la cinética de liberación de azúcares reductores en el mosto de la malta de amaranto, el porcentaje evaluado en los distintos tiempos fueron significativamente distintos con una  $P < 0.05$ .



**Gráfica 5. Cinética de hidrólisis enzimática con glucoamilasa.**

En el caso del mosto sin gelatinizar, la liberación de azúcares reductores inició con 4.14 %, pero a los 5 minutos de acción la concentración no superó el 4% y fue hasta el minuto 30 cuando se obtuvo la máxima concentración de azúcares reductores del 5.35 %. La concentración de azúcares reductores disminuyó después de los 30 minutos de acción.

El mosto gelatinizado, inició con una concentración de 3.44% sin embargo se observó un incremento del 54% a los 5 minutos, dando una concentración de 6.35 %, pero ésta comienza a disminuir a partir de los 15 minutos de acción.

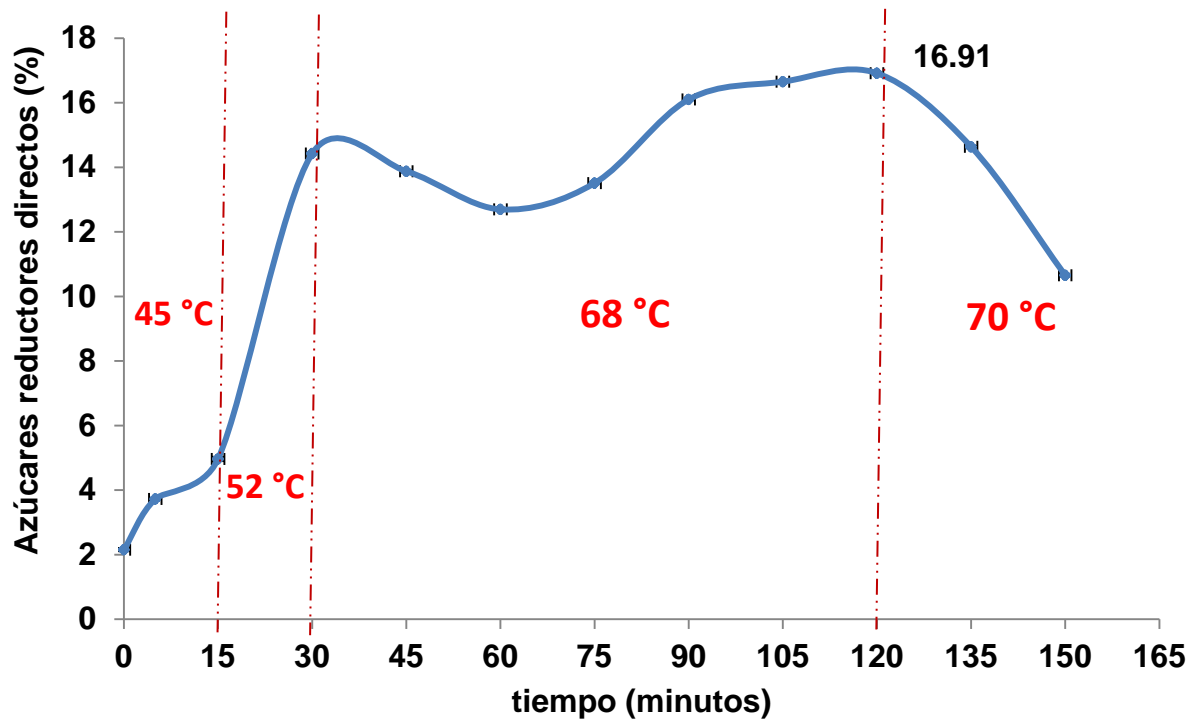
La enzima utilizada para hidrolizar el almidón de la malta de amaranto en ambos mostos, presentó un comportamiento de inhibición por sustrato. En efecto, Bettin *et al.* (2010) reportaron que la enzima glucoamilasa presentó este fenómeno de inhibición por sustrato. Esto indica que una alta carga de malto dextrinas, deseable para mejorar la productividad del proceso, no es conveniente porque pueden ocurrir los siguientes fenómenos de inhibición: altas concentraciones de sustrato de diferente grado de polimerización, como son las malto dextrinas, compiten por el dominio activo de la enzima dificultando su acoplamiento; además, ocasionan restricciones en la transferencia de masa limitando la velocidad de reacción y, por último, altas concentraciones de glucosa como producto causan inhibición competitiva de la enzima.

Se estimaron los parámetros cinéticos para la glucoamilasa al hidrolizar el almidón presente en la malta de amaranto con una velocidad máxima de 0.1817 mg/L min, una constante de afinidad de  $4.08 \times 10^{-5}$  mg/L; de igual manera se obtuvo la constante de inhibición de la enzima, la cual fue de 809.29 mg/L.

Con base en los resultados, se efectuaron modificaciones a los tratamientos utilizados para la hidrólisis enzimática con glucoamilasa, con el objetivo de extraer una concentración entre 8 y 10 % de carbohidratos utilizando 100 µl de extracto del enzima en 50 ml de mosto.

Para facilitar la activación de las enzimas se inició con una temperatura de 45 °C por 15 minutos, favoreciendo la hidratación de los gránulos de almidón y la hidrólisis de éste. Posteriormente se elevó la temperatura por 15 minutos a 55 °C para estimular la proteólisis, después se incrementó a 65 °C para favorecer la acción de la  $\beta$ -amilasa, y finalmente se aumentó la temperatura a 70 °C para que la  $\alpha$ -amilasa termine la hidrólisis.

La enzima glucoamilasa tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4 de los extremos no reductores de polisacáridos para la formación de glucosa y a pesar que también posee la capacidad de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -1,6, lo hace a más baja velocidad generando productos como dextrinas, maltosas y glucosas.



Gráfica 6. Cinética de maceración escalonada utilizando glucoamilasa.

De esta manera se pudo observar, bajo estos parámetros de hidrólisis, que la enzima glucoamilasa actuó de manera eficiente para realizar la hidrólisis del almidón presente en la malta de amaranto para proporcionar un mosto con una concentración de carbohidratos superiores a los deseados, estimando que se obtiene una concentración de 16.91 %, siendo una concentración apta para poder generar una cerveza con un porcentaje de alcohol por encima del 5%.

### Capítulo 13. Porcentaje de alcohol en cervezas maduras

Comparando los distintos métodos hidrolíticos, se observó diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) en el porcentaje de alcohol obtenido en las cervezas maduras (Tabla 13) siendo la hidrólisis ácida el método por el cual se obtuvo una cerveza con una concentración del 2.73% Alc. Vol.

**Tabla 20. Porcentaje de alcohol en cervezas maduras.**

<b>Cerveza</b>	<b>% Alcohol (v/v)</b>
100 % amaranto	1.006
100 % amaranto con pH ajustado	1.127
Hidrólisis ácida	2.727
Amaranto: Cebada (90:10)	1.267
Amaranto: Cebada (80:20)	1.530

## Conclusiones

- La mayor capacidad de germinación se obtuvo en los tratamientos con agua.
- La obtención de la malta base de amaranto libre de contaminación se obtuvo cuando se malteó el grano por aspersion (tratamiento D).
- La disminución de la viscosidad debida a la hidrólisis del almidón durante la etapa de sacarificación se vio favorecida por el malteado del grano de amaranto.
- La baja capacidad diastásica del amaranto requiere de utilizar otro método de hidrólisis para la obtención de los azúcares reductores necesarios para la fermentación.
- No se vio favorecido el aumento de azúcares reductores al incrementar el tiempo de acción de la  $\beta$ -amilasa de la malta de amaranto.
- La hidrólisis química favoreció la liberación de azúcares reductores en la semilla y malta de amaranto pero imparte notas saladas indeseables en la cerveza.
- La hidrólisis enzimática con la glucoamilasa favoreció la obtención de azúcares reductores durante la maceración escalonada realizada en la malta de amaranto.
- La adición de malta de cebada no favoreció la hidrólisis del almidón de la malta de amaranto, pero si cambió los atributos sensoriales de la cerveza.

- La hidrólisis enzimática con la glucoamilasa comercial favoreció la obtención de azúcares reductores durante la maceración escalonada realizada en la malta de amaranto.
- De las hidrólisis estudiadas, la enzimática comercial fue el método hidrolítico más eficiente, facilitando la liberación de azúcares reductores en el mosto suficientes para obtener cervezas con graduaciones mayores a 4 % v/v.
- Se aceptó la hipótesis 1 que establecía que al someter la semilla de amaranto a un remojo en solución alcalina, se favorecía la obtención de una malta libre de contaminación durante el proceso de la germinación, pero se descartó el uso del NaOH ya que inhibió el malteo de la semilla.
- Se aceptó la hipótesis 2 que establecía que la concentración de carbohidratos presentes en el mosto, estaba en función de las condiciones de hidrólisis del almidón aplicadas al amaranto.



## Referencias bibliográficas

1. Arano-Varela Hypatia, Dominguez-Dominguez Jorge, Paredes, López Octavio, 2010, Sobre Expresión de la globulina de amaranto (Amarantina) con propiedades nutraceuticas en dos cepas de *Escherichia coli.*, XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
2. Arce Vázquez María Belem, 2011, Obtención de compuestos biofuncionales a partir del material lignocelulosico de *Amaranthus hypocondriacas* L., Universidad Autónoma Metropolitana, Tesis para obtener el grado en Maestra en Biotecnología
3. Aufhammer W., Czuczorova D., Kaul H.P., Kruse M., 1998, Germination of grain amaranth (*Amaranthus hypocondriacus* x *A. hybridus*): effects of seed quality, temperature, light and pesticides, *European Journal of Agronomy*, Vol. 8, pag. 127-135
4. Balasubramanian Theymoli, Sadasivam S., 1989, Changes in carbohydrate and nitrogenous components and amylase activities during germination of grain amaranth, Department of Biochemistry, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Tamil Nadu, India, *Plant Foods for Human Nutrition* Vol. 39, páginas 325-330.
5. Bárrales Domínguez, José Sergio, Bárrales Brito, Elizabeth, and Bárrales Brito, Edgar, 2010, Amaranto: recomendaciones para su producción. México: Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
6. Bettin Luz A., Quintero Juan C., 2010, Estudio de la producción de jarabes glucosados a partir de malto dextrinas empleando dos enzimas comerciales, *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Volumen 17 número 2, págs. 165-172 , Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia.
7. Bravi E., Ombretta M., Perretti G., Fantozzi P., 2012, Influence of barley variety and malting process on lipid content of malt, *Food Chemistry*, Vol. 135, pag. 1112-1117.
8. Calzetta Resio Andrea N., Aguerre Roberto J., Suarez Constantino, 2005, Analysis of simultaneous water absorption and water-starch reaction during

- soaking of amaranth grain, *Journal Food Engineering* Vol. 68 pages 265-270.
9. Chauhan Arti, Saxena D.C., Singh Sukhcham, 2015, Total dietary fiber and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour, *LWT- Food Science and Technology* 63: 939-945
  10. Cruz Ruiz Kevin Alonso, 2012, Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía, Medellín, Colombia.
  11. De Meo B., Freeman G., Marconi O., Booer C., Perretti G., Fantozzi, 2011, Behavior of malted cereals and pseudocereals for gluten-free beer production, *Journal Institute of Brewing*, Vol. 117(4), pag. 541-546
  12. Escobedo López Diana, Ayala Garay Alma, Campos Silva Luz Gabriela, 2012, Formas de consumo del amaranto en México, *Amaranto: Ciencia y Tecnología*, capítulo XXIV, páginas 341-354.
  13. Fennema Owen R., Parkin Kik L., Damodaran Srinivasan, 2006, *Fennema Química de los Alimentos*, Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, Segunda Edición, Capítulo 3, página 114, 138, 139.
  14. Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E., 2004, Estructura, función e ingeniería molecular de Enzimas implicadas en la digestión de Carbohidratos. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXVIII. Departamento Bioquímica, Facultad Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, Ciudad de México.
  15. G. Mazza, 1998, *Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado*, España, Primera Edición, Editorial ACRIBIA, S.A, Capítulo 9, páginas 291-318
  16. García Garibay Mariano, Quintero Ramírez Rodolfo, López-Munguía Canales Agustín, 1993, *Biotecnología alimentaria*, Capítulo 8, página 263-288

17. Gerold Jerza, Nadine Gebersa, Dominika Szotb, Maciej Szaleniect, Peter Winterhaltera, Slawomir Wybraniecb, 2014, Separation of amaranthine-type betacyanins by ion-pair high-speed countercurrent chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volúmen 1344, páginas 42-50
18. Gins M.S, Gins V.K., Kononkov, 2002, Change in the Biochemical Composition of Amaranth Leaves during Selection for Increased Amaranthine Content, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 38, No. 5, pp. 474–479
19. Hager Anna-Sophie, Mäkinen Outi E., Arendt Elke K., 2014, Amyolytic activities and starch reserve mobilization during the germination of quinoa, *European Food Research Technology* 239: 621-627.
20. Huerta Ocampo José Ángel, Barba de la Rosa Ana Paulina, Maldonado-Cervantes Enrique 2012, Amaranto: propiedades benéficas para la salud, *Amaranto: Ciencia y Tecnología*, capítulo XXI, páginas 303-312.
21. Kaur Shubhpreet, Singh Narpinder, Rana Chand Jai, 2010, *Amaranthus hypochondriacus* and *Amaranthus caudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours, *Food Chemistry* 123: 1227-1234
22. Kreis Stefan, 2009, *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Capítulo 6, página 148.152
23. López Aguilar Víctor, 2012, Sendechó, bebida prehispánica, estudio del malteado propuesta tecnológica de elaboración, Tesina para obtener el grado de especialización en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana
24. Malgarejo Luz Ma2rina, Hernández María Soledad, Barrera Jaime Alberto, Carillo Marcela, 2006, Oferta y Potencialidades de un banco de germoplasma del género *Theobroma* en el enriquecimiento de los sistemas productivos de la región amazónica, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, Universidad Nacional de Colombia, páginas 151 y 152
25. Marañón-Ruiz V. F., Rizo de la Torre L. del C., 2011, Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas por espectroscopía Uv-Vis y barrido en Z, *Superficies y Vacío* 24, Volúmen 4, páginas 113-120,

Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, Departamento de Ciencias Exactas y Tecnología Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara Paseos de la Montaña 1144, Lagos de Moreno, Jalisco México

26. Marconi O., Tomasi Ivan, Dionisio L., Fantozzi P., 2014, Effects of malting on molecular distribution and content of water-extractable  $\beta$ -glucans in barley, *Food Research International*, Vol 64, pag.677-682
27. Molina Cano José Luis, 1989, *La cebada*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Capítulos 2,7; páginas 35, 200-203.
28. Morales Guerrero J.C., Vázquez Mata N., Bressani Castignoli R., 2009, El amaranto: características físicas, químicas, toxicológicas y funcionales y aporte nutricional, Primera edición, México D.F., paginas 21-53.
29. Noelting María C., Sandoval María C., Abbiati Nilda N., 2004, Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) mediante diferentes métodos de análisis, *Revista Perú Biológicas* Volúmen 11 (2), páginas 169-178.
30. Ocampo José Ángel, Barba de la Rosa Ana Paulina, 2012, Caracterización bioquímica y estructural de las proteínas de reserva del amaranto, *Amaranto: Ciencia y Tecnología*, capítulo XX páginas 293-302.
31. Ortiz Hernández Adriana, 2010, Evaluación de la capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos del grano de amaranto, Tesina para obtener el grado de especialización en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana
32. Palma-Rodríguez, H.P. a, Agama-Acevedo, E. a, González-Soto, R.A.a, Bello-Pérez, L.A., 2010, Efecto del tamaño del granulo en la modificación química del almidón, XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos CEPROBI-IPN, Morelos, México.
33. Paredes López Octavio, 2013, El CINESTAV Potencia propiedades antihipertensivas del amaranto, [http://www.planetaazul.com.mx/site/?p=66982&upm\\_export=print](http://www.planetaazul.com.mx/site/?p=66982&upm_export=print)

34. Peralta I. Eduardo, Villacrés P. Elena, Mazón O. Nelson, Rivera M. Marco, 2011, Conceptos y parámetros de calidad para el grano de amaranto (*Amaranthus spp*), Quito, Ecuador, Boletín Técnico No. 154, páginas 19 y 18.
35. Peralta Pérez María del Rosario, 2010, Amilasas, Bioquímica Avanzada, Universidad Autónoma De Chihuahua, Facultad De Ciencias Químicas, Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología
36. Schmitt M., Skadsen R., Budde A., 2013, Protein mobilization and malting-specific expression during barley germination, *Journal of cereal science*, Vol. 58, pag. 324-332.
37. (<http://www2.uni-siegen.de/~pci/versuche/spanish/v44-10.html>).
38. Tovar-Pérez E.G., Guerrero-Legarreta I., Farrés-Gonzalez A., Soriano-Santos J., 2009, Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain, *Food Chemistry* 116, páginas 437-444.
39. Victoria T., Jorge A.; Bonilla C., Carmen R.; Sánchez O., Manuel S.; (2006). Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. *Acta Agronómica*.
40. Wang Jin-Peng, Zeng Ai-Wu, Liu Zhen, Yuan Xi-Gang, 2006, Technical Note Kinetics og glucoamylase hydrolysis of corn, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 727-729

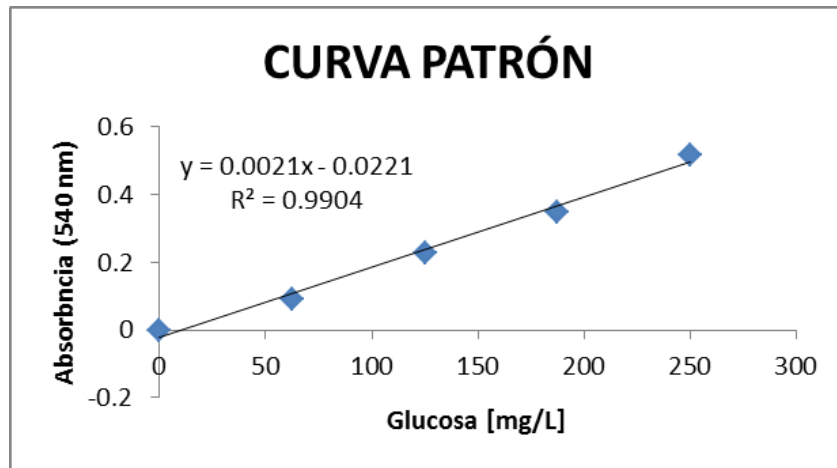
## ANEXO A

Para la aplicación del método DNS de Miller se necesita preparar el reactivo DNS, disolviendo 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se adicionan 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0,5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico). Esta mezcla se afora a 50mL con agua destilada y se almacena en un frasco ámbar a 4°C. La concentración de azúcares reductores se determina utilizando una curva de calibración absorbancia en función de concentración. A estas soluciones se les aplicó el método DNS y se leyó la absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro (Genesys 10vis) a una longitud de onda 540 nm.

La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra (semilla de amaranto, en el mosto, cerveza verde y cerveza madura) se determina haciendo una interpolación en la curva patrón utilizando glucosa como estándar.

**Tabla A. Curva patrón de la glucosa para la cuantificación de azúcares reductores por el método de (DNS).**

<b>CURVA PATRÓN</b>				
<b>Glucosa [mg/L]</b>	<b>Absorbancia (540 nm)</b>		<b>promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>0</b>	0	0	0	0
<b>62.5</b>	0.092	0.085	0.0885	0.0049
<b>125</b>	0.243	0.215	0.229	0.0198
<b>187.5</b>	0.391	0.308	0.3495	0.0587
<b>250</b>	0.533	0.5	0.5165	0.0233



**Gráfico 1. Curva patrón para la cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS.**

Una vez construida la curva patrón se aplicó el método DNS a cada una de las muestras, para lo cual se mezclaron 0,1 mL de cada una con 0,1 mL del reactivo DNS, se colocaron a ebullición por 5 min en baño de maría e inmediatamente se detuvo la reacción con baño de agua y hielo. Se adicionaron 2 ml de agua destilada y se dejaron los tubos a temperatura ambiente hasta su lectura. . Tubos mostrando la reacción con el reactivo DNS.



**Figura 37. Tubos mostrando la reacción con el reactivo DNS.**

## Anexo B. Curva Patrón para la cuantificación de etanol presente en las cervezas de amaranto.

Se partió de una solución de etanol al 98 % para preparar concentraciones desde 1% hasta 10 %, obteniendo las siguientes áreas en los cromatogramas

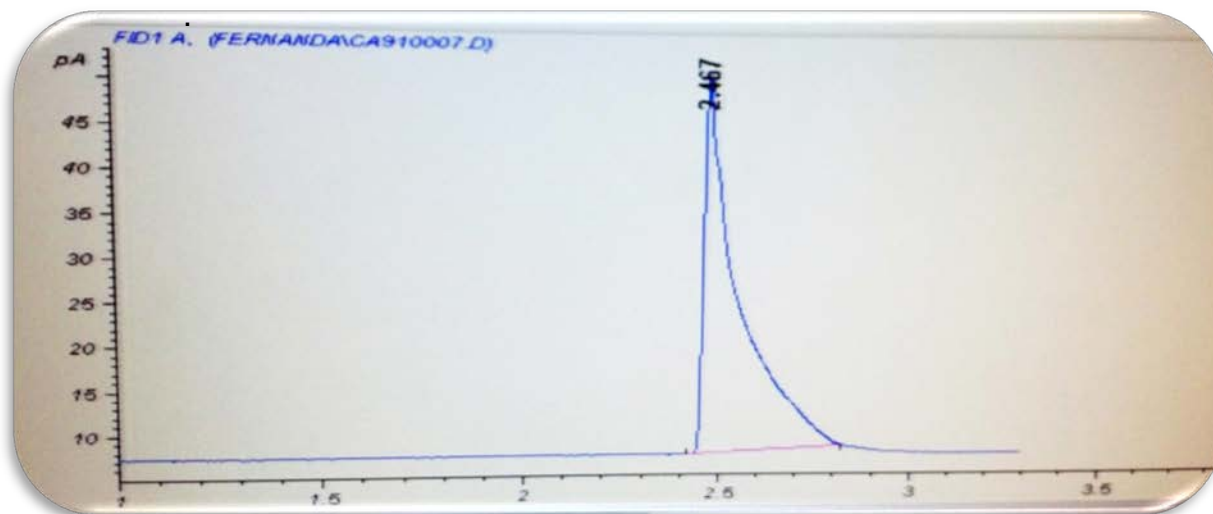


Figura 38. Cromatograma de la corrida del etanol.

Tabla B. Curva patrón para cuantificación de etanol.

% OH	AREA	PROMEDIO	Desviación Estándar	
1	177.502	180.7912	179.1466	2.3258
2	410.9053	443.8027	427.354	23.2620
4	553.7404	595.1494	574.4449	29.2806
6	709.1115	792.4159	750.7637	58.9051
8	925.0518	900.303	912.6774	17.5000
10	1245.0443	1246.8771	1245.9607	1.2960



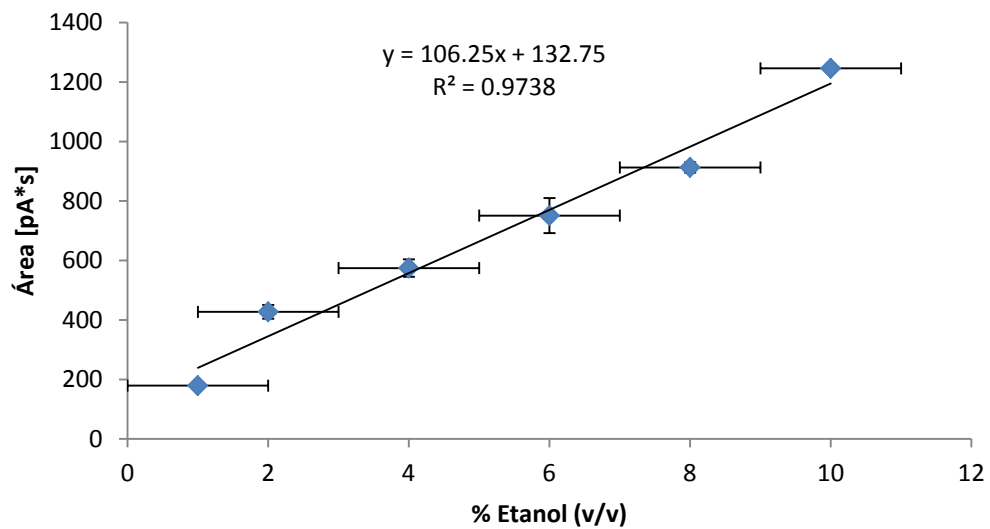


Gráfico 2. Curva patrón para la cuantificación de etanol.

## Anexo C. ANOVAS - TUKEY

C1. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis natural en semilla y malta de amaranto.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Control	Inter-grupos	4.755	1	4.755	.903	.442
	Intra-grupos	10.533	2	5.266		
	Total	15.288	3			
1 hora	Inter-grupos	46.814	1	46.814	19.092	.049
	Intra-grupos	4.904	2	2.452		
	Total	51.718	3			
1 horas	Inter-grupos	29.197	1	29.197	10.551	.083
	Intra-grupos	5.534	2	2.767		
	Total	34.731	3			
3 horas	Inter-grupos	24.206	1	24.206	44.755	.022
	Intra-grupos	1.082	2	.541		
	Total	25.288	3			

C2. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis química en semilla y malta de amaranto.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Control	Inter-grupos	.208	1	.208	4.439	.170
	Intra-grupos	.094	2	.047		
	Total	.302	3			
3 minutos	Inter-grupos	.245	1	.245	2.275	.271
	Intra-grupos	.215	2	.108		
	Total	.460	3			

15 minutos	Inter-grupos	3.482	1	3.482	25.168	.038
	Intra-grupos	.277	2	.138		
	Total	3.758	3			
30 minutos	Inter-grupos	.016	1	.016	.053	.839
	Intra-grupos	.601	2	.301		
	Total	.617	3			
120 minutos	Inter-grupos	.692	1	.692	5.848	.137
	Intra-grupos	.237	2	.118		
	Total	.929	3			

C3. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática (amaranto: cebada) en semilla y malta de amaranto.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	1	.000	.001	.980
Intra-grupos	.258	2	.129		
Total	.258	3			

C4. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática (amilasa y glucoamilasa) en semilla y malta de amaranto.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Control	Inter-grupos	.950	3	.317	21.061	.007
	Intra-grupos	.060	4	.015		
	Total	1.011	7			
5 minutos	Inter-grupos	1.293	3	.431	9.579	.027
	Intra-grupos	.180	4	.045		
	Total	1.473	7			
15 minutos	Inter-grupos	.831	3	.277	7.447	.041
	Intra-grupos	.149	4	.037		
	Total	.980	7			
30 minutos	Inter-grupos	.606	3	.202	6.523	.051
	Intra-grupos	.124	4	.031		
	Total	.730	7			
45 minutos	Inter-grupos	.262	3	.087	58.217	.001
	Intra-grupos	.006	4	.002		
	Total	.268	7			
60 minutos	Inter-grupos	.284	3	.095	7.346	.042
	Intra-grupos	.052	4	.013		
	Total	.335	7			
120 minutos	Inter-grupos	.436	3	.145	18.996	.008
	Intra-grupos	.031	4	.008		
	Total	.467	7			

CONTROL HSD de Tukeya

enzimas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
amilasa mosto sin gelatinizar	2	.7674	
glucoamilasa sin gelatinizar	2	.7945	
glucoamilasa gelatinizado	2		1.3122
amilasa mosto gelatinizado	2		1.5763
Sig.		.996	.278

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

5 minutos

HSD de Tukeya

enzimas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
glucoamilasa sin gelatinizar	2	3.3585	
amilasa mosto gelatinizado	2	4.0668	4.0668
amilasa mosto sin gelatinizar	2	4.0710	4.0710
glucoamilasa gelatinizado	2		4.4752
Sig.		.090	.346

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

15 minutos HSD de Tukeya

Enzimas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
glucoamilasa gelatinizar	sin 2	3.7144	
amilasa gelatinizado	mosto 2	4.1638	4.1638
amilasa gelatinizar	mosto sin 2	4.3565	4.3565
glucoamilasa gelatinizado	2		4.5926
Sig.		.093	.260

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

30 minutos

HSD de Tukeya

enzimas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
glucoamilasa gelatinizar	sin 2	3.8886	
amilasa gelatinizar	mosto sin 2	4.1896	4.1896
amilasa gelatinizado	mosto 2	4.2654	4.2654
glucoamilasa gelatinizado	2		4.6603
Sig.		.281	.168

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

60 minutos

HSD de Tukeya

enzimas	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
glucoamilasa gelatinizar	sin 2	4.2878	
glucoamilasa gelatinizado	2	4.5906	4.5906
amilasa mosto gelatinizar	sin 2	4.7000	4.7000
amilasa mosto gelatinizado	2		4.7860
Sig.		.071	.419

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

120 minutos

HSD de Tukeya

enzimas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
glucoamilasa gelatinizar	sin 2	4.4726		
amilasa mosto gelatinizado	2	4.5904	4.5904	
amilasa mosto gelatinizar	sin 2		4.8588	4.8588
glucoamilasa gelatinizado	2			5.0724
Sig.		.585	.117	.210

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000.

C5. Cuantificación de los azúcares obtenidos por hidrólisis enzimática (amilasa-glucoamilasa) en la malta de amaranto.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Control	Inter-grupos	.558	1	.558	6.985	.118
	Intra-grupos	.160	2	.080		
	Total	.718	3			
5 minutos	Inter-grupos	3.973	1	3.973	1052.922	.001
	Intra-grupos	.008	2	.004		
	Total	3.981	3			
15 minutos	Inter-grupos	.954	1	.954	146.157	.007
	Intra-grupos	.013	2	.007		
	Total	.967	3			
30 minutos	Inter-grupos	1.887	1	1.887	1916.624	.001
	Intra-grupos	.002	2	.001		
	Total	1.889	3			
45 minutos	Inter-grupos	1.850	1	1.850	1459.834	.001
	Intra-grupos	.003	2	.001		
	Total	1.853	3			
60 minutos	Inter-grupos	3.753	1	3.753	397.224	.003
	Intra-grupos	.019	2	.009		
	Total	3.772	3			
120 minutos	Inter-grupos	4.396	1	4.396	1188.857	.001
	Intra-grupos	.007	2	.004		
	Total	4.403	3			



C6. Cuantificación del porcentaje de etanol en las cervezas maduras obtenidos por distintos métodos hidrolíticos.

ANOVA

% OH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5.815	4	1.454	275.734	.000
Intra-grupos	.053	10	.005		
Total	5.867	14			

% OH

HSD de Tukeya

Cerveza	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
100% amaranto	3	1.0063			
100 % amaranto pH ajustado	3	1.1267	1.1267		
Amaranto: Cebada 90:10	3		1.2667		
Amaranto: Cebada 80:20	3			1.5300	
Hidrólisis química	3				2.7267
Sig.		.319	.203	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.