

Universidad Nacional de Río Negro

INGENIERÍA AGRONÓMICA

Trabajo Final de Carrera



*“Evaluación de parámetros bioquímicos relacionados con la calidad maltera en 12 líneas comerciales de cebada cervecera (*Hordeum vulgare*)”*

Viedma, Río Negro. 2022

Estudiante: *María Eugenia Martínez Díaz*

Directora: *Dra. María Lucrecia Piñuel*

A mi hermana incondicional Ma. Victoria Martínez Díaz

A mi amor incondicional Ruben Negro

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Negro por darme la oportunidad de formarme en las Ciencias Agrarias.

Al Consejo Interuniversitario Nacional por la beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas otorgada en el año 2020 que facilitó el desarrollo de las actividades de este trabajo.

A mi directora de tesis, Dra. María Lucrecia Piñuel, por su paciencia, motivación y dedicación.

Al equipo de profesionales Daniela, Eli, Sol, Mari, Miguel, Fany y Patricia, que trabajan en el laboratorio de investigación N°3 , Laboratorio de Tecnología de Alimentos y Biotecnología de la Universidad Nacional de Río Negro por la gran ayuda que me ofrecieron tan amablemente y por facilitarme el equipamiento necesario para llevar a cabo este trabajo.

A Verónica Conti profesional de INTA Bordenave por facilitarme las muestras de cebada.

A mis amigas, amigos y compañeros que hice a lo largo de la carrera y quienes también compartí largas jornadas de estudio.

Y para finalizar, a mi familia que siempre me apoyaron en mi formación. Especialmente a Ruben, Vicky y Daniel que son las personas más especiales de mi vida.

Índice de contenidos

Título	7
Resumen	7
Introducción.....	9
Cultivo de cebada cervecera.....	9
Características de la cebada cervecera	12
Calidad maltera de la cebada	13
Composición bioquímica de los granos de cebada: Proteínas de reserva y enzimas hidrolíticas.....	15
Hipótesis.....	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Metodología.....	20
1. Cultivares y acondicionamiento de muestras	20
1.2. Germinación	20
2. Obtención de diferentes fracciones proteicas	21
2.1 Determinación de proteínas totales	21
2.2. Hordeínas	21
2.3. Extracción de enzimas amilolíticas en granos sin germinar	22
3. Caracterización físico - química de fracciones enzimáticas	22
3.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE	22
3.2. Determinación de proteínas solubles.....	23
4. Evaluación de calidad maltera	23

4.1 Determinación de actividad α amilasa.....	23
4.2. Hidrólisis enzimática del almidón.....	23
5 Actividad amilolítica total (α y β amilasa)	24
5.1 Cuantificación de azúcares reductores	24
6 Análisis estadístico de los datos	24
Resultados y discusión.....	25
1. Determinación del contenido de proteína total en granos de cebada	25
2. Solubilización y caracterización de prolaminas	26
3. Caracterización físico-química de hordeínas por SDS-PAGE.....	28
4. Análisis de agrupamiento entre las 12 variedades.....	30
5. Parámetros germinativos y su efecto sobre el malteado.....	32
6. Efecto de malteado en la solubilidad de proteínas.....	35
7. Determinación de actividad α - amilasa	37
8. Determinación de actividad α y β amilasas	38
Conclusión.....	40
Bibliografía.....	42

Índice de figuras

Figura 1: <i>Hordeum vulgare</i> A) Espiga con granos. B) Ilustración de la planta entera	9
Figura 2: A) Área sembrada y producción de cebada en Argentina. B) Mapa de distribución de cebada cervecera por departamentos.....	10
Figura 3: Estructura de un grano de cebada (Van der Heden, 2015).	13

Figura 4: Representación de las estructuras enzimáticas: α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa y α -glucosidasa. Cada círculo representa una unidad de cada enzima.	17
Figura 5: Contenido de proteína total de las variedades de cebada, Kjeldahl (AOAC, 1990).	26
Figura 6: Cuantificación de hordeínas solubles (mg/ml)	27
Figura 7: SDS-PAGE con estándares de peso molecular de fracciones de hordeínas.....	30
Figura 8: Dendrograma que muestra la distancia genética entre las poblaciones de cebada estudiadas en función del polimorfismo de la hordeína.....	31
Figura 9: A) Granos de cebada sin germinar. B) Granos de cebada germinados a las 8hs. C) Granos de cebada a 72 hs de germinación.	33
Figura 10: Respuesta de la capacidad germinativa CG (%) de las doce variedades de cebada analizadas, bajo condiciones de oscuridad y 15°C.	33
Figura 11: Tiempo medio de germinación TMG (h) de las 12 variedades de cebada.	35
Figura 12: Contenido de proteína soluble por el método de Bradford en (■) granos de cebada sin germinar y (■) granos de cebada germinados o micro malteados.	36
Figura 13: Actividad de la enzima α -amilasa (U/ml) de las 12 variedades de evaluadas.....	38
Figura 14: Concentración de azúcares reductores en las diferentes variedades de cebada (■) granos sin germinar y (■) granos germinados/ micromalteados....	39

Título

Evaluación de parámetros bioquímicos relacionados con la calidad maltera, en 12 líneas comerciales de cebada cervecera (*Hordeum vulgare*)

Resumen

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) en los últimos años tuvo un gran desarrollo en el país por la creciente demanda de las industrias cerveceras. Así, la producción de cebada nacional en el año 2020 ocupó el décimo lugar mundial y su producción se concentró en la zona núcleo. Desde el año 2000 hubo un fuerte recambio de cultivares en Argentina, lo cual provocó, una disminución de la superficie sembrada con cultivares de origen nacional. La variedad “Scarlett” llegó a ocupar más del 80% de la superficie del cultivo. Actualmente, la superficie sembrada está dominada por una única variedad: Andreia. La utilización de una única variedad provoca una mayor vulnerabilidad en la cadena agroindustrial de la cebada frente a condiciones ambientales adversas. Por lo tanto, en este trabajo se tuvo como objetivo evaluar la calidad maltera de 12 líneas comerciales de cebada (*Hordeum vulgare*) según la caracterización de parámetros germinativos y bioquímicos. De esta forma, la información generada podría contribuir en la toma de decisiones adecuadas para favorecer la sustentabilidad del sistema productivo. Para ello, se analizaron 12 variedades de cebada cervecera denominadas: Yanara, Fátima, Militza, Danielle, Montoya, Charles, Alhue, Sinfonía, Overture, Aliciana, Jennifer, Andreia, las cuales fueron donadas por la Red Nacional de Cebada Cervecera de la Estación Experimental de INTA, Bordenave. La calidad maltera depende de la combinación de parámetros germinativos (capacidad germinativa (CG), energía germinativa (EG) y tiempo medio de germinación (TMG) y parámetros bioquímicos (contenido de proteína total, proteínas de reserva/hordeínas y actividad enzimática amilolítica) que favorecen el proceso de malteo y son inherentes a cada variedad.

Se evidenció la variabilidad genética de las 12 variedades, determinada por sus patrones de hordeínas por medio de la técnica SDS-PAGE. Dicha variabilidad

permitió agrupar a las variedades mediante la elaboración de un dendograma por semejanza con la utilización del programa estadístico MVSP Data.

Por otra parte, se determinó la actividad sinérgica de las enzimas α - y β -amilasas presentes en los granos germinados. De esta manera, se cuantificó por el método de azúcares reductores la actividad catalítica de cada variedad.

Según los parámetros de calidad maltera evaluados en este trabajo, la variedad Andreia presentó las mejores propiedades requeridas por la industria cervecera. Sin embargo, las variedades Sinfonía y Jennifer también presentaron características de interés industrial similares a Andreia, por lo que se sugieren como una alternativa para diversificar el cultivo de cebada cervecera manteniendo el stand de calidad.

Palabras claves: Parámetros germinativos, proteínas totales, hordeínas, alfa amilasa, beta amilasa.

Introducción

Cultivo de cebada cervecera

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es un cultivo que se encuentra ampliamente difundido en todo el mundo, ocupa el cuarto lugar en superficie sembrada después del trigo, el maíz y el arroz. Es una planta anual monocotiledónea, de ciclo corto, que pertenece a la familia de las poáceas (gramíneas) y el cultivo de la misma está representada por dos especies: *Hordeum distichum* comúnmente llamada cebada cervecera y *Hordeum hexastichon* que se usa como forraje, ambas especies se pueden agrupar bajo el nombre de *Hordeum vulgare subsp* (figura 1). La cebada cervecera, es un cereal de invierno, en el hemisferio sur se inicia la siembra a fines de mayo y se extiende a los meses de junio/julio, hasta los primeros días de agosto. La cosecha, se realiza a partir de los meses de noviembre, diciembre y eventualmente primeros días de enero (SISA Cebada 2019/20).

Figura 1: *Hordeum vulgare* A) Espiga con granos. B) Ilustración de la planta entera



La cebada cervecera tuvo un desarrollo importante en el país en los últimos 6-7 años, ya que aumentó el área sembrada y su producción. Su cultivo depende y está impulsado activamente por la industria de la malta o cervecera. Estas, reciben toda la producción del grano con calidad apta para maltear, por contratos previamente establecidos entre la industria maltera y productores de cebada. Una vez abastecidas las industrias, los excedentes de cebada cervecera se exportan.

En el año 2020, Argentina fue el décimo país en producción de cebada (FAO, 2020). En la figura 2a se muestra la evolución del área sembrada y la producción de cebada en Argentina, desde el año 1969 hasta el 2022, según la Bolsa de Comercio de Rosario. Según el informe de Sistema de Información Simplificado Agrícola (SISA), la distribución geográfica del cultivo de cebada cervecera se ve reflejada en el mapa de la figura 2b en la campaña 2019/2020.

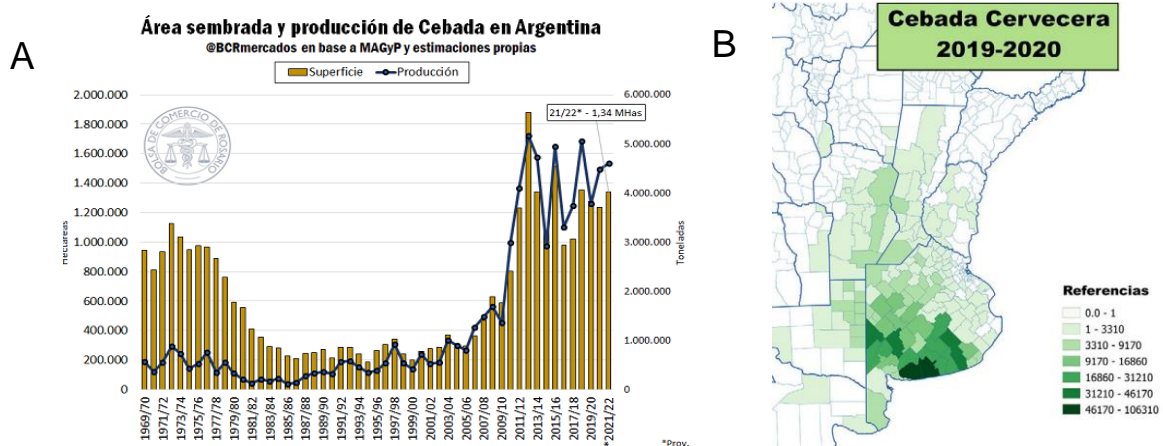


Figura 2: A) Área sembrada y producción de cebada en Argentina. B) Mapa de distribución de cebada cervecera por departamentos.

El grano de cebada ocupó el sexto lugar de importancia en Argentina, ya que la producción fue de 4.48 millones de tn en 2020 (último dato oficial FAO). Sus principales usos engloban tanto la alimentación para el ganado como la producción de malta y cerveza. En Argentina en los últimos años, el cultivo de cebada cervecera se incrementó de manera notoria como alternativa a los cultivos de invierno, ya que cuenta con un ciclo de menor duración en comparación con otros cereales invernales (Veliz, 2017). Esto permite la siembra de soja de segunda y de malta para la fabricación de cerveza (FAO, 2009).

A partir del año 2000 hubo un fuerte recambio de cultivares en Argentina, lo cual provocó, una disminución de la superficie sembrada con cultivares de origen nacional. La variedad “Scarlett” inscrita en el Registro Nacional de Cultivares

(RNC) en el año 1999, llegó a ocupar más del 80% de la superficie del cultivo, debido a su alto potencial de rendimiento como a su excelente calidad maltera, reconocida a nivel internacional (Giménez, 2017). Para la campaña 2019/2020 los productores declararon en el SISA el uso de 75 cultivares diferentes de cebada. Entre las 4 primeras variedades: Andreia, Scarlett, Montoya y Shakira conformaron el 80.43% de la superficie sembrada, y la más utilizada fue “Andreia” inscrita en el RNC en el año 2011, la cual representó el 65.23% de la superficie sembrada declarada en Argentina.

Actualmente, a pesar del gran número de cultivares inscritos en el RNC, la superficie sembrada está dominada por una única variedad: Andreia. La utilización de una única variedad provoca una mayor vulnerabilidad en la cadena agroindustrial de la cebada frente a condiciones ambientales adversas. En este sentido, es necesario generar información que permita la toma de decisiones adecuadas para favorecer la sustentabilidad del sistema (conformado por el sector productivo y la agroindustria), por medio de la selección de germoplasmas de cebada cervecera con altos y estables rendimientos, calidad industrial elite, buen comportamiento sanitario, y aptas para las demandas industriales. En este contexto, los programas de mejoramiento como el que lleva a cabo INTA – Bordenave, perteneciente a la Red Nacional de Cebada Cervecera (RNCC), persiguen el desafío de desarrollar ideotipos de cebada cervecera con calidad diferenciada, que favorezca la competitividad y contribuyan a la diversificación y sustentabilidad de los sistemas productivos.

Desde hace más de 10 años, la RNCC genera información de materiales existentes y/o novedosos a fin de difundir eficientemente nuevas tecnologías que promuevan una cadena agroproductiva sustentable. En el año 2020 se evaluaron caracteres morfológicos, sanitarios, productivos y de calidad comercial de 25 genotipos, de los cuales 12 fueron cultivares comerciales (Alhue, Aliciana, Andreia, Charles, Danielle, Fátima, Jennifer, Militza, Montoya, Overture, Sinfonia y Yanara) y 6 líneas experimentales de cebada cervecera (L1-2020 a L6-2020) en 22 ambientes de producción diferentes en Argentina. Según las diferencias de

rendimiento entre los cultivares más difundidos actualmente (Shakira, Andreia y Danielle), Shakira registró un rendimiento del 2 % y 8 % menor, según la subregión. Danielle fue el cultivar de mayor rendimiento en las cinco subregiones evaluadas (hasta 11 % mayor) y Andreia, el cultivar más difundido, presentó un rendimiento intermedio (Moreyra y Abbate, 2020).

Características de la cebada cervecera

La cebada es la principal materia prima para la elaboración de cerveza, ya que la malta (cebada germinada y tostada) es el insumo de mayor incidencia en el costo final de la cerveza. La malta se produce haciendo germinar bajo condiciones controladas (15°C), los granos de cebada. Durante la germinación se sintetizan enzimas hidrolíticas, que luego se utilizarán para degradar el almidón, y degradar o modificar la estructura de los granos (matriz proteica y paredes celulares). Cuando se considera que este proceso ha llegado al estado deseado (5 días), se interrumpe la germinación mediante el secado de los granos. Muchas características de los granos de cebada vinculadas a una mejor calidad industrial tienen un fuerte control genético y algunas están más influenciadas por las condiciones ambientales y de manejo. Debido a este control genético, los granos de cebada cervecera deben mantener la pureza y la identidad del cultivar hasta la elaboración de la malta, ya que los diferentes cultivares tienen distinto proceso de malteado y dan como resultado maltas de diferentes características. La calidad comercial de la cebada cervecera se refiere a características de la cebada, que están relacionadas con el comportamiento que presentará en la maltería.

El grano de cebada (figura 3) está compuesto principalmente por el embrión, el endosperma y el pericarpio. El embrión (o germen) representa un 3.5% del peso seco del grano, conteniendo altos porcentajes de azúcares tales como sacarosa, rafinosa y fructosanos. El endosperma (78.5%) es fundamentalmente de tipo amiláceo, siendo la matriz proteica que envuelve a los gránulos fácilmente degradable, lo que facilita la accesibilidad y fermentabilidad del almidón. El 18% restante corresponde al pericarpio, el cual está moderadamente lignificado. Cabe

resaltar que el grano de cebada posee una baja proporción de lípidos (2%), un bajo contenido de pigmentos, vitaminas liposolubles y vitamina B12. En cambio, es una excelente fuente de algunas vitaminas del grupo B, tales como tiamina, riboflavina y ácido pantoténico. En cuanto a las proteínas, la proporción de proteínas solubles (albuminas y globulinas) es alta, mientras que las prolaminas (hordeínas) representan un 52% del contenido del grano (Martínez, 2020)

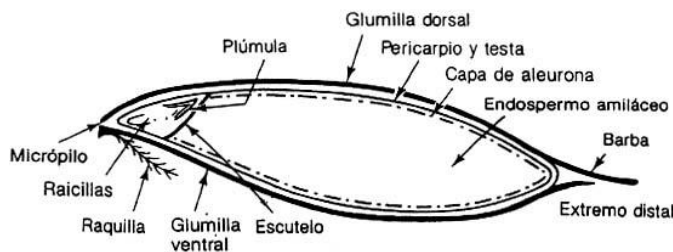


Figura 3: Estructura de un grano de cebada (Van der Heden, 2015).

Calidad maltera de la cebada

La calidad maltera es un carácter complejo, depende de la interacción de características individuales expresadas durante el desarrollo del grano y durante el proceso industrial (Aguinaga, 2019). A su vez, la calidad del grano es crucial para su uso comercial, particularmente, la actividad total de las enzimas que degradan el almidón en la cebada, se considera un parámetro de calidad importante para malteado y elaboración de cerveza (Qi et al., 2006). Dentro de los parámetros de calidad comercial, los más importantes son: el poder germinativo, la pureza varietal, el tamaño de los granos y el contenido y tipo de proteínas. En este trabajo nos centramos en el poder germinativo y en el contenido y tipo de proteínas de interés para el malteado de variedades que ya son comerciales.

El poder germinativo, es la principal característica de una cebada cervecera, ya que todos los granos deben germinar durante el malteo. El poder germinativo debe ser alto (mayor a 95%), los granos que no germinan no colaborarán en la producción de enzimas ni transformarán la cebada y serán atacados más fácilmente

por microorganismos durante la germinación. Una buena cebada cervecera debe tener la mejor energía germinativa (EG) posible, ya que en el malteado la rapidez con que se inicia la germinación es de importancia capital (Arias, 1991). Este parámetro se determina a los tres días y es el porcentaje diario de germinación acumulada cuando la tasa de germinación fue la más alta (Quiroz Marchant et al., 2009).

Otro parámetro importante para la cadena agroindustrial de la cebada cervecera es el contenido de proteínas totales, siendo el valor mínimo de comercialización del 10 % y el valor máximo del 12%. Un déficit de proteínas afectará la capacidad enzimática de la malta, la formación y retención de la espuma en la cerveza y disminuirá la cantidad de aminoácidos libres para la nutrición de las levaduras durante la fermentación. Por otro lado, altos contenidos de proteínas generan menores contenidos de almidón debido a la relación en el balance de almidón y proteínas en el endosperma. Este parámetro es sensible a las fluctuaciones de las condiciones ambientales (suelo, clima y manejo) (Veliz, 2017). Las proteínas en el grano de cebada se pueden separar en albúmina, globulina, prolamina y fracciones de gluten según lo descrito por Osborne (1924).

Las principales proteínas de almacenamiento (30 al 50% de las proteínas del grano) constituyen una reserva de aminoácidos en el grano de cebada para ser utilizadas durante el proceso de germinación, las cuales son las prolaminas o también denominadas hordeínas (Jonassen et al., 1987 Kirkman et al., 1982; Shewry et al., 1983). Las mismas, son almacenadas en forma de cuerpos proteicos en el endosperma y presentan polimorfismos entre los genotipos de la especie. Esta última característica se debe a que las prolaminas provienen de familias multigénicas dando lugar a que sean utilizadas como marcadores genéticos (Salgado-Albarrán et al., 2015).

Composición bioquímica de los granos de cebada: Proteínas de reserva y enzimas hidrolíticas

En los granos de cebada, coexiste una gran cantidad de compuestos como almidón, proteínas y glucanos. Las enzimas producidas en la germinación ayudarán a degradar estos componentes y generar otros más sencillos que serán asimilados y transformados por las levaduras en la etapa de fermentación de la cerveza. La presencia y concentración de proteínas y enzimas impactan de manera directa sobre las características del mosto y este a su vez determinará la eficiencia de la fermentación y características organolépticas de la cerveza. Las hordeínas, proteínas importantes relacionadas con la calidad de la malta son conocidas como proteínas de reserva. El contenido de hordeínas en la malta es un criterio tradicional empleado para evaluar la calidad de la malta. Uno de los cambios físico-químicos importantes que se producen durante el malteado es la degradación de las hordeínas y su conversión en péptidos solubles y aminoácidos. Las hordeínas son un componente dominante de la matriz proteica que rodea los gránulos de almidón dentro de las células del endospermo, por lo tanto su degradación durante el malteado es necesaria para facilitar la hidrólisis completa del almidón (Slack et al. 1979; Howard et al. 1996).

Las hordeínas, tienen un peso molecular que va desde 30 hasta 100 kDa aproximadamente y se clasifican en tres grupos: 1) ricas en azufre (hordeínas B y γ), 2) pobres en azufre (hordeínas C) y 3) de alto peso molecular (hordeínas D). Los tres grupos se caracterizan por su solubilidad en mezclas de alcohol/agua, pero varían considerablemente en otras propiedades como el peso molecular, punto isoeléctrico y composición de aminoácidos.

En primer lugar, las hordeínas D tienen un tamaño aproximado de 100 kDa, representando menos del 10% del contenido total del grano; mientras que las hordeínas C poseen un tamaño menor (55-70 kDa), representando un 10-20% de las proteínas totales. Estas últimas, carecen de residuos de cisteína, y no forman complejos con otras proteínas. Por otra parte, las hordeínas B tienen un tamaño de

aproximadamente 36-44 kDa, existiendo abundantes residuos de cisteína, por lo que pueden formar puentes disulfuro intra o intercatenarios. Esta última fracción, es la más abundante representando alrededor del 75 al 80% de las hordeínas totales, siendo el factor principal que afecta la calidad de la cebada, ya que ha sido demostrado una correlación negativa entre el contenido de hordeínas B y el extracto de malta (Salgado-Albarrán et al., 2015).

Las hordeínas γ son de tamaño similar a las B y contienen residuos de cisteína pero son menos abundantes que éstas, representan el 1-2% de la fracción de hordeínas (Qi et al., 2006). Las hordeínas γ pueden formar puentes disulfuro intra o intercatenarios y se asocian con las B en los cuerpos proteicos.

La calidad de malta que produce un cultivar de cebada depende también de la cantidad de enzimas amilolíticas (α y β amilasas) dado que estas enzimas degradan el almidón durante la primera etapa del macerado (De Schepper et al., 2021). Esto quiere decir, que debe producirse un mosto cuya fermentabilidad sea máxima, con suficiente cantidad de azúcares en solución para que la alimentación de la levadura sea óptima. Una mejora en estas características hace que las maltas producidas sean más competitivas ante una demanda globalizada y un fuerte mercado internacional. La hidrólisis de almidón en azúcares fermentables son catalizados principalmente por cuatro enzimas: α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa y α -glucosidasa (figura 4).

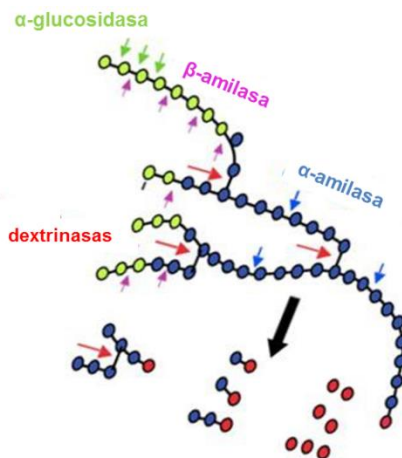


Figura 4: Representación de las estructuras enzimáticas: α -amilasa, β -amilasa, dextrinasa y α -glucosidasa.

De todas estas enzimas producidas durante el malteo, las principales son las que degradan el almidón (α y β amilasas). La α -amilasa no está presente en el grano de cebada maduro y se produce durante la germinación para hidrolizar la molécula de almidón en unidades menores. Por otra parte, la β -amilasa está presente en el grano de cebada y es activada durante la germinación. Durante la sacarificación, la β -amilasa transforma el almidón en maltosa y dextrinas pero para ello requiere que la α -amilasa haya iniciado la transformación del almidón. La actividad de la β -amilasa se puede utilizar como criterio de detección para identificar cultivares adecuados para la malta (Gibson et al., 1995). Numerosos estudios han demostrado que la actividad β -amilasa se relaciona directamente con uno de los parámetros de evaluación de la calidad de la malta, el poder diastático, que es la capacidad de la enzimas amilolíticas para degradar el almidón (Qi et al., 2006). Así, la comprensión de la acumulación de hordeína y β -amilasa en el grano de cebada puede aplicarse en el fitomejoramiento cuando se tiene como objetivo mejorar calidad maltera de la cebada. Además, la relación entre las fracciones de hordeína y la actividad β -amilasa en el grano son esenciales para que los productores optimicen las medidas agronómicas para mejorar la calidad del grano ya que existe una amplia variación genotípica y ambiental en el contenido de la fracción de hordeína en el grano de cebada.

La caracterización fisicoquímica de las fracciones de hordeínas a través de la técnica de electroforesis en gel (SDS-PAGE), es muy utilizada para la identificación de variedades de cebada. No obstante, en Argentina el programa de mejoramiento que se lleva a cabo por la Red Nacional de Cebada Cervecera, aún no ha utilizado esta técnica para la clasificación de las cebadas evaluadas. El objetivo general de este trabajo fue evaluar la calidad maltera de 12 variedades de cebada según la caracterización bioquímica de sus granos. De esta manera este estudio aportará conocimiento para la clasificación de las cebadas cultivadas en

nuestro país según su calidad maltera, otorgándole un valor agregado al programa de mejoramiento genético.

Hipótesis

Las variedades de cebadas podrán ser clasificadas según su calidad maltera, a través de, la evaluación de parámetros germinativos y el estudio de fracciones proteicas y enzimáticas (hordeínas y α y β -amilasa) de sus granos.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la calidad maltera de 12 líneas comerciales de cebada (*Hordeum vulgare*) según la caracterización de parámetros germinativos y bioquímicos de sus granos.

Objetivos específicos

- 1).- Determinar parámetros germinativos en líneas comerciales de cebada.
- 2).- Obtener diferentes fracciones enzimáticas (hordeínas y enzimas amilolíticas).
- 3).- Caracterizar fracciones enzimáticas obtenidas.
- 4).- Evaluar parámetros de calidad maltera.

Metodología

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se plantearon las siguientes actividades:

1. Cultivares y acondicionamiento de muestras

Se utilizaron semillas de doce cultivares comerciales de cebada, donadas por la Red Nacional de Cebada Cervecera de la Estación Experimental de INTA, Bordenave. Los doce cultivares utilizados fueron: Yanara, Fátima, Militza, Danielle, Montoya, Charles, Alhue, Sinfonía, Overture, Aliciaana, Jennifer, Andrea (denominadas del 1-12 en el trabajo). Estos cultivares tienen condiciones de cultivo similares y corresponden a la campaña 2017 por tener procedencia de una red de ensayos de rendimiento. Los granos de cebada de cada cultivar fueron molidos en molino a cuchillas de alta velocidad. La harina resultante se secó a 50°C, durante 22 h y se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

2. Germinación

Se procedió a una desinfección de las semillas con etanol al 70 % v/v por 10 minutos, seguidos de una inmersión en hipoclorito de sodio (48 g Cloro activo/l) al 20 % v/v durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dispuso 25 semillas por placa de Petri, cuatro repeticiones por cada variedad de cebada. Luego, se incubó a 15°C en oscuridad. El criterio de germinación que se consideró fue la aparición de una radícula de por lo menos 0.5 mm de largo (Bewley, 1994).

2.1. Estimación de parámetros germinativos

Para observar el comportamiento de las semillas respecto a la velocidad de germinación, se registró el número de semillas germinadas cada 4 h. Luego se estimaron los siguientes parámetros

- Energía germinativa (EG): Porcentaje de germinación acumulada diaria cuando la tasa de germinación fue la más alta (González et al, 2009).

- Capacidad Germinativa (CG): Porcentaje de germinación total al finalizar el ensayo (Pece, 2010).
- Tiempo Medio de Germinación (TMG): Número promedio de horas utilizadas en la germinación. Mide la velocidad y la dispersión del proceso (Ranal y García, 2006).

$$TMG = ((X1 \cdot h4) + (X2 \cdot h8) + \dots + (X9 \cdot h72)) / \text{total de semillas.}$$

Donde X1, X2, X9 son semillas a las 4 horas h4, h8... h72.

2.2. Proceso de micromalteado de los granos de cebada

Se realizó un proceso de macerado y germinación con las 12 variedades de cebada. Para ello se siguió la metodología propuesta por Passarella y colaboradores (2003). Brevemente, se utilizó 10 gr de grano de cada variedad y se embebió durante 4h en agua destilada y por 20 h se dejaron secar a 15°C y oscuridad (día 1). En el día 2 las semillas fueron embebidas durante 5 h y se dejaron secar por 19 h, bajo las mismas condiciones que el día 1. Luego se procedió a la germinación de estas semillas por 4 días, en los cuales se tomaron registro de los granos germinados cada 4 h.

3. Obtención de diferentes fracciones proteicas

3.1 Determinación de proteínas totales

El contenido proteico total de las diferentes cebadas, se determinó mediante el método Kjeldahl por duplicado (AOAC, 1990). El cálculo de proteína se realizó a partir de los datos de nitrógeno obtenidos de la muestra, utilizando el factor de conversión 5.83.

3.2. Extracción de Hordeínas

Se utilizó harina de las diferentes variedades previamente obtenidas. Se realizó una extracción alcohólica de acuerdo a Howard y colaboradores (1996). Brevemente, 0.1 g de harina se le agrega 1 ml de buffer de extracción (55% propanol, 1% ácido

acético, 2% Beta-mercaptoetanol). Las muestras fueron mantenidas en agitación durante 1 hora a una temperatura de 60°C y luego centrifugadas por 10 min a 10000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para las siguientes determinaciones.

3.3. Extracción de enzimas amilolíticas en granos sin germinar

Las enzimas amilolíticas se extrajeron con buffer de extracción fosfato 10 mM pH 7. Para ello a 0.1 g de harina se le adicionó 1ml de buffer y se mantuvo en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron por 5 minutos a 10000 rpm, el sobrenadante se reservó para las demás determinaciones. El procedimiento de extracción se repitió 2 veces sobre la misma harina.

3.4. Extracción de enzimas amilolíticas en granos germinados

Semillas germinadas sin raicillas (1 g) fueron maceradas en mortero con 5 ml de buffer fosfato 10 mM pH 7. Luego se procedió a centrifugar durante 5 min a 10000 rpm, y el sobrenadante se reservó para futuras determinaciones.

4. Caracterización físico-química de fracciones enzimáticas

4.1. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE

Las fracciones de hordeínas obtenidas se caracterizaron mediante electroforesis desnaturizante y reductora por el método SDS-PAGE de Laemmli (1970). Brevemente, se realizaron geles de poliacrilamida al 12% en el cual se determinó según la movilidad electroforética los diferentes grupos de hordeínas en cada muestra de cebada. Una vez realizada la corrida electroforética, los geles se fijan en metanol al 50% y ácido acético 10%. Luego se procedió al lavado con agua destilada y se llevó a cabo la tinción con Coomassie Brilliant Blue (0.01%). Por último fueron desteñidos con agua destilada por 24h. Los procedimientos de tinción, lavado y teñido se repitieron 3 veces, con una duración de 15 minutos en agitación constante cada uno de ellos.

4.2. Determinación de proteínas solubles

El contenido de proteínas solubles fue determinado por el Método de Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como patrón (0-20 μ g).

5. Análisis de agrupamiento genético

El estudio de variabilidad genética fue realizado por medio de la confección de una matriz binaria de ausencia/presencia de bandas electroforéticas de hordeínas obtenidas en el SDS-PAGE. Para la realización de la matriz de las distancias, se procedió al análisis estadístico, utilizando el programa estadístico MVSP Data 3.1, y se utilizó para este tipo de análisis el coeficiente Nei-Li's (Nei y Li.,1979).

6. Evaluación de calidad maltera

6.1 Determinación de actividad α amilasa

La actividad α -amilasa se determinó utilizando AmilokitR (Wiener Grupo de Laboratorios, Rosario, Argentina). Para ello, la mezcla de reacción fue de 0.8 ml de buffer fosfato de sodio 0.01 M (pH 7.4), 5 μ l de extracto de cada variedad germinada. Después de la incubación previa de la mezcla de reacción en hielo durante 5 minutos, la reacción enzimática comenzó al agregar 0.5 ml de reactivo A (sustrato) en la mezcla de reacción. Luego, se incubó a 37°C durante 7 min y se agregó 0.5 ml de reactivo B (solución de yodo), para el desarrollo del color. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 5.3 ml con agua destilada. Y la absorbancia se determinó a 640 nm en un espectrofotómetro.

6.2. Optimización de actividad amilolítica de extractos de cebada

Para determinar las condiciones óptimas de reacción de las enzimas amilolíticas extraídas, se utilizó la prueba de Lugol. Brevemente, se utilizó 1ml de solución de almidón (0.17%) en buffer citrato 10 mM pH 5.5, 3.4mM de CaCl₂. Al reactivo se le adicionó 0.1 ml de extracto de la variedad Charles (dilución 1/10 y 1/100), ya que mostro el mayo valor de proteína soluble (7.5 mg/ml). La mezcla de reacción se incubó a 50°C a diferentes tiempos (de 0 a 15 minutos). Para cortar la reacción se

utilizó 0.5 ml de 0.5M NaOH luego se agregó la solución de lugol 500 μ l (10% IK, 5% I₂). Esta técnica cualitativa fue puesta a punto para este trabajo y permitió establecer el tiempo de reacción y la cantidad de enzima necesaria para determinar la actividad amilolítica total de los extractos.

7. Cuantificación de la actividad amilolítica total (α y β amilasa)

7.1. Hidrolisis enzimática de extractos

Los diferentes extractos de las semillas germinadas, fueron diluidos 100 veces. Para la determinar la actividad amilolítica los extractos diluidos se incubaron con una solución de almidón (0.17% en buffer citrato 10 mM pH 5.5, 3.4mM de CaCl₂), durante 10 minutos a 50°C. Para cortar la reacción se utilizó 0.5 ml de 0.5M NaOH.

7.2. Cuantificación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores liberados luego de la hidrólisis enzimática del almidón se utilizó el método Somogyn-Nelson. Para ello, a 0.5 ml de la mezcla de reacción se le agregaron 0.5 ml del reactivo de cobre y se colocó a baño maría por 10 minutos. Luego se dejó enfriar por 5 minutos y se agregó 0.25 ml de arsenomolibdeno (1.8%) se utilizó el vortex para una adecuada homogeneización y por último se agregó agua destilada para lograr un volumen final de 5ml. Por último se leyó la absorbancia a 520 nm. La curva de calibración se realizó por triplicado con glucosa al 1% p/v como patrón.

8. Análisis estadístico de los datos

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y para determinar las diferencias entre medias se realizó un test de Fisher (DMS) al 5% de significación. Este análisis fue llevado a cabo a través del programa estadístico INFOSTAT versión estudiantil (Di Rienzo et al., 2009).

Resultados y discusión

1. Determinación del contenido de proteína total en granos de cebada

Para la comercialización de la cebada en la industria cervecera se utilizan ciertas características del grano que se correlacionan con la calidad maltera. Entre ellas, el contenido total de proteína, cuantificado como nitrógeno total y el calibre o tamaño de los granos (proporcional al contenido de almidón). Como se observa en la figura 5, se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en cuanto al contenido total de proteínas en las 12 variedades analizadas por el método de nitrógeno total Kjeldahl (AOAC, 1990). Sin embargo, se comprobó que todas las variedades se encontraban dentro del rango adecuado para su comercialización, conforme a la resolución N°27 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca que estipula las normas de calidad y bases para la comercialización de cebada cervecera en Argentina "NORMA V - ANEXO A - Resolución SENASA 27/2013". En esta normativa se establece que el contenido de proteína mínimo debe ser 9.5% y el contenido de proteína máximo de 13%. Nuestros resultados demuestran que bajo esta legislación todas las variedades de cebada evaluadas pueden ser comercializadas en Argentina como cebadas cerveceras. En general, la industria maltera y cervecera requieren valores de proteínas entre 10 y 12% ya que valores excesivamente bajos limitan el crecimiento de las levaduras encargadas de la fermentación durante el proceso de producción de cerveza. Por otra parte, contenidos proteicos excesivamente altos disminuyen el rendimiento de la malta y generan problemas de turbidez en la cerveza (Veliz, 2017). Un alto contenido de proteína se relaciona con una mayor proporción de proteínas de reserva (Arias., INIA 1991.), entre ellas se encuentran las prolaminas (hordeínas)

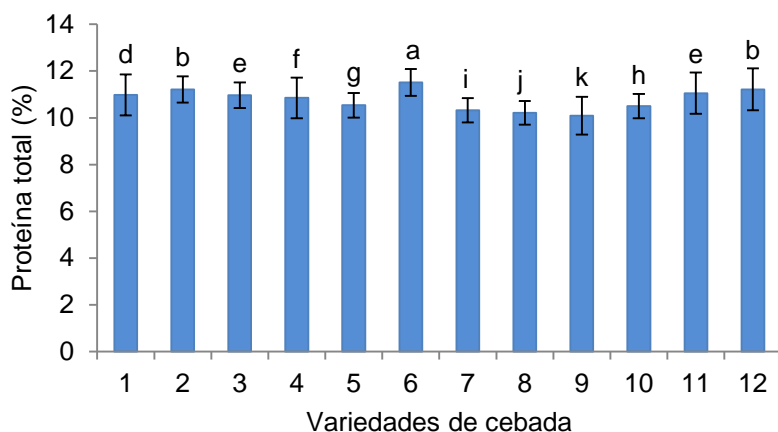


Figura 5: Contenido de proteína total de las variedades de cebada: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciana, 11) Jennifer, 12) Andreia. Analizado por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990). Variedades seguidas de la misma letra, no difieren significativamente según el test de LSD Fisher ($p \geq 0,05$).

2. Solubilización y caracterización de prolaminas

Las principales fracciones proteicas que se encuentran en los granos de cebada son las prolaminas o también denominadas hordeínas (Kirkman et al., 1982; Shewry et al., 1983; Jonassen et al., 1987) caracterizadas por su solubilidad en mezcla de alcohol y agua. Estas prolaminas, ricas en los aminoácidos prolina y glutamina (lo que da el título de prolamina), son más conocidas como las proteínas del gluten y en la cebada son denominadas hordeínas (Espinosa et al., 2015). Se realizó una extracción alcohólica para la obtención de prolaminas y los resultados de las proteínas solubilizadas se muestran en la figura 6.

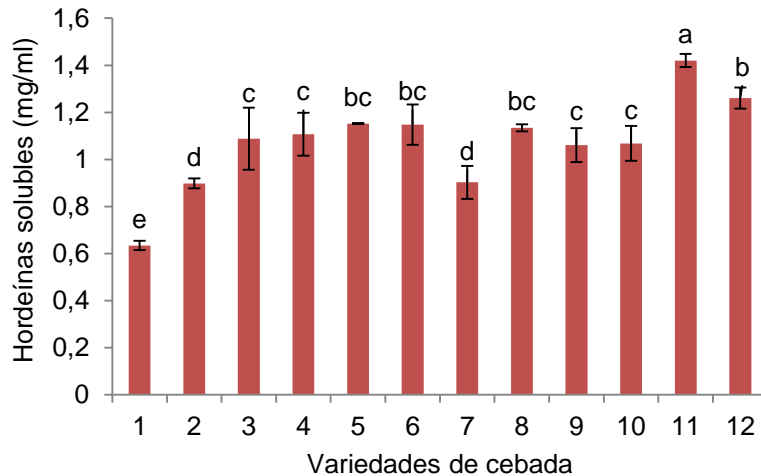


Figura 6: Cuantificación de hordeínas solubles (mg/ml). Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Alicia, 11) Jennifer, 12) Andreia. Variedades seguidas de la misma letra, no difieren significativamente según el test de LSD Fisher ($p \geq 0,05$).

Como se puede observar, las variedades Yanara, Fátima y Alhue (1, 2 y 7, respectivamente) presentaron menores valores de hordeínas solubles (0.63, 0.89 y 0.90 mg/ml, respectivamente), con respecto al resto de las variedades que variaron entre 1.06–1.42 mg/ml. Por otra parte, las variedades Jennifer (11) y Andreia (12), presentaron mayores valores de hordeínas solubles respecto a las otras variedades analizadas (1.42 y 1.26 mg/ml, respectivamente). Ha sido descrito en bibliografía, que una mayor proporción de hordeínas tipo α y B (ricas en cisteínas y grupos sulfhídrico), pueden contribuir a la formación de puentes disulfuro intra y intercatenarios que generan aglomeraciones y disminuyen la solubilidad de las proteínas. Por otra parte, las hordeínas C que poseen un tamaño menor respecto a las hordeínas D (55-70 kDa), representan un 10-20% de las proteínas totales. Las mismas carecen de residuos de cisteína, y no forman complejos con otras proteínas (Martínez, 2020). En este sentido, se podría inferir que las variedades Jennifer y Andreia, presentan una menor proporción de hordeínas tipo α y B y una mayor proporción de hordeínas tipo C. En caso contrario, las variedades Yanara, Fátima y

Alhue podrían tener una mayor proporción de hordeínas tipo α y B, dado el menor contenido de hordeínas solubles determinado en dichas variedades.

3. Caracterización físico-química de hordeínas por SDS-PAGE

En cebada, las principales proteínas de almacenamiento (30 al 50% de las proteínas del grano) son las hordeínas, las cuales presentan un alto grado de polimorfismo por proceder de familias multigénicas.

Desde un punto de vista genético, los genotipos de bajo nivel de proteína en los granos son deficientes en hordeínas (Dailey et al., 1988). Para caracterizar las diferentes fracciones de hordeínas presentes en cada una de las variedades de cebada, se realizó un perfil electroforético (SDS-PAGE) con geles de acrilamida del 12% a partir de los extractos alcohólicos. En la figura 7a y 7b, pueden observarse los resultados de los diferentes perfiles proteicos con 5 a 9 bandas de proteínas por variedad que varían de 20-100 kDa en cada variedad.

En las figuras 7a y 7b se puede observar que las variedades Yanara (1), Fátima (2) y Alhue (7) presentaron un mayor número de bandas de hordeínas tipo α y B respecto de las demás variedades analizadas. Estas hordeínas se caracterizan por aumentar su contenido en el proceso de maduración del grano (Pulido, 2004) y tienen un peso molecular que varía de 36 a 44 kDa (Salgado-Albarrán et al, 2015). Estos perfiles permiten confirmar lo observado en la figura 6, donde mayor cantidad de hordeínas tipo α y B con residuos de cisteína podrían generar aglomeraciones que dificultan la solubilización de las mismas en un medio alcohólico. En las variedades Jennifer (11) y Andreia (12), se puede observar menor proporción de hordeínas tipo α y B, en comparación con Yanara, Fátima y Alhue. Además, como se puede ver en las figuras 7a y 7b, las muestras que presentaron tener más bandas con pesos moleculares entre 36-48 kDa fueron las variedades 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 11 con cuatro bandas cada una, mientras que la muestra 8 solo se conformó por dos banda y en las muestras restantes (4, 6, 9 y 12) se observaron tres bandas correspondientes, con los pesos moleculares señalados (36-48 kDa). Esta variabilidad observada para las hordeínas tipo B ha sido documentada por

varios autores. Se ha demostrado por medio de la electroforesis un importante polimorfismo en este tipo de hordeínas (B) (Montebault, 1983; Shewry y Tatham, 1990; Vapa, 1998; Leistrumaitė y Paplauskienė, 2007) A través de la comparación de las secuencias de aminoácidos de las hordeínas B, estas pueden dividirse en 2 subgrupos B1 y B3, donde su tamaño es de 45 y 36 kDa respectivamente (Arte, 2013). Además, las hordeínas tipo B1 difieren en sustituciones de aminoácidos y pequeñas inserciones/deleciones, mientras que la hordeína B3 difiere además en la organización de dominios repetitivos (Shewry y Tatham, 1990). Por tal motivo, en las hordeínas B se identificaron entre 8 a 13 perfiles diferentes (Montebault, 1983; Leistrumaitė y Paplauskienė, 2007).

Por otra parte, Jennifer (11) junto con la variedad Aliciana (10) y Sinfonía (8) muestran una banda correspondiente a las hordeínas de tipo C que se caracterizan por tener peso molecular de 55-70 kDa y no contienen residuos de cisteína (aminoácidos que favorecen la aglomeración entre proteínas) (fig 7b, ★). En las demás variedades analizadas, las bandas correspondientes a hordeínas tipo C, se observan de manera más tenue en el SDS-PAGE. Esto podría deberse a que este tipo de hordeína disminuye su contenido durante el proceso de maduración del grano (Pulido Regadera, 2004).

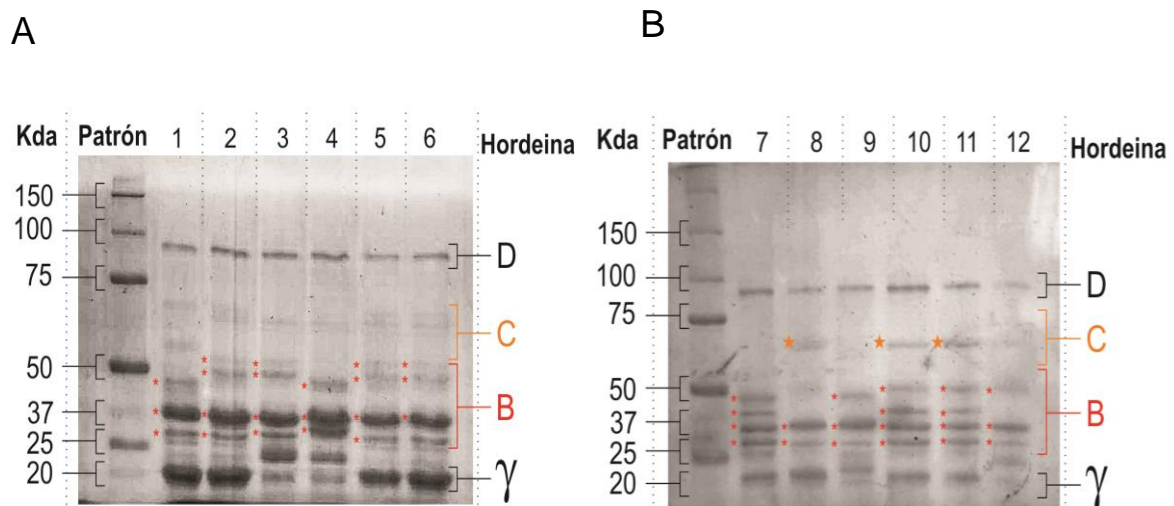


Figura 7: SDS-PAGE con estándares de peso molecular de fracciones de hordeínas. **A)** Muestras 1 a 6. 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles. **B)** Muestras 7 a 12. 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciaana, 11) Jennifer, 12) Andreia.

Por último, la banda de 96-100 kDa, se corresponde a las hordeínas de tipo D, y la banda inferior de 20 kDa, son las hordeínas de tipo α , ambos tipos están presentes en todas las muestras. De esta manera, se pudo demostrar diferencias en el patrón de hordeínas para todas las variedades analizadas. Así, los polimorfismos observados podrían permitir agrupar genéticamente a las diferentes variedades.

4. Análisis de agrupamiento

Dada su gran variación genotípica las hordeínas han sido utilizadas como marcadores genéticos (Shewry et al., 1995). En este trabajo se determinó un análisis de semejanza a partir de los perfiles electroforéticos de hordeínas (fig 7a y 7b). Para ello, se realizó una matriz de presencia-ausencia de cada una de las bandas que aparecieron en los SDS-PAGE y con la utilización del programa estadístico MVSP Data, se obtuvo un dendograma que permitió el análisis de agrupamiento de las diferentes variedades (figura 8).

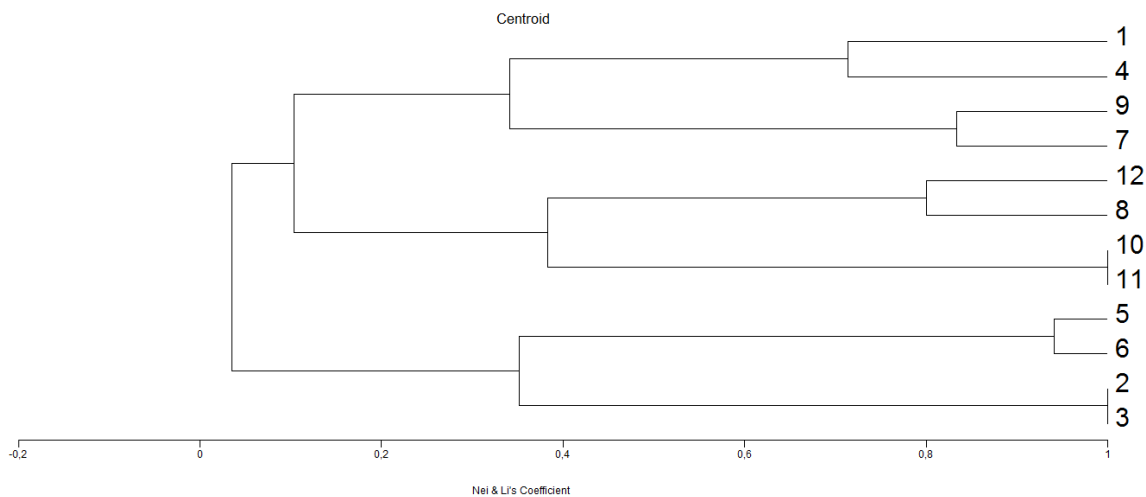


Figura 8: Dendrograma que muestra la distancia genética entre las poblaciones de cebada estudiadas en función del polimorfismo de la hordeína. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciaana, 11) Jennifer, 12) Andreia.

Como puede observarse en la figura 8, si se establece un grado de similitud del 65%, las variedades se agrupan en 6 clusters o grupos diferentes. En primer lugar puede decirse que los agrupamientos formados por las variedades Fátima (2) y Militza (3), y por otra parte Aliciaana (10) y Jennifer (11) muestran 100% de similitud entre ellas. Luego se observa que las variedades Montoya (5) y Charles (6) tienen un 94.1% de similitud entre ellas y comparten el mismo grupo con las variedades Fátima (2) y Militza (3), relacionadas por una distancia de 0.35. Con un 80% de similitud se observa al grupo formado por las variedades Sinfonía (8) y Andreia (12) que difiere en origen al grupo formado por Alhue (7) y Overture (9), (también con 83.3% de similitud). Por último, se observa el cluster formado por Yanara (1) y Danielle (4) con 71.4% de similitud, y a una distancia de 0.35 con Overture (9) y Alhue (7). Además, podría agregarse que si se considera un 35 % de similitud quedan determinados tres grupos con 4 variedades cada uno, indicando un posible origen genético en común para las variedades del mismo grupo. En este sentido, también podría diferenciarse las variedades 2, 3, 5 y 6 del resto, ya que su origen genético podría ser distinto de las demás variedades estudiadas. No obstante, sería necesario un estudio de secuenciación filogenético para poder confirmar nuestras aproximaciones.

Como era esperable, el resultado del dendrograma coincide con lo previamente observado en las electroforesis. En el primer grupo se puede ver que las variedades Fátima (2) y Militza (3) comparten las mismas bandas de hordeínas entre ellas y las variedades Montoya (5) y Charles (6) son muy similares pero se diferencian por la banda de 30 kDa (hordeína B). Por otro lado, las variedades Jennifer (11) y Aliciaana (10) que comparten las mismas bandas entre ellas, son muy similares a las variedades Sinfonía (8) y Andreia (12), las diferencias se deben solo a las bandas de 66 kDa “Hordeína C”, 48 y 40 kDa “Hordeínas B”. En el último grupo

del extremo superior se observa una similitud con las variedades Overture (9) y Alhue (7) respecto de las variedades Yanara (1) y Danielle (4) con el resto de las variedades. Así, se puede decir que las diferencias observadas en el dendogramas, se deben al polimorfismo que se ha previamente descrito para las hordeínas de tipo B previamente mencionado en la sesión anterior.

En resumen, el análisis de las hordeínas por SDS-PAGE, ofreció un recurso para caracterizar y distinguir los cultivares en cebada. Este método ha permitido detectar el polimorfismo de proteínas seminales de diversas especies tales como avena, trigo, semillas de forrajeras, café y algodón, con lo cual se logra identificar y discriminar cultivares. En este caso particular, los patrones electroforéticos obtenidos permitieron afirmar que la técnica empleada resulta un indicador idóneo, de tipo analítico, ya que permitió evidenciar la diferenciación varietal buscada.

5. Parámetros germinativos y su efecto sobre el malteado

El malteado es la germinación controlada de la semilla a 15°C, seguida por su desecación a una temperatura que varía de 55 a 82°C (Giménez, 2017). Así este proceso de la industria cervecera depende directamente de los parámetros germinativos de los granos de cebada. En la imagen 9 (A, B y C), se observa granos de cebada en diferentes estadios de germinación en condiciones de oscuridad y a 15°C a diferentes tiempos. Por otra parte, se evaluó la capacidad germinativa, la energía germinativa y el tiempo medio de germinación de las 12 variedades.



Figura 9: A) Granos de cebada sin germinar. B) Granos de cebada germinados a las 8 hs. C) Granos de cebada a 72 hs de germinación. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciaiana, 11) Jennifer, 12) Andreia.

En la figura 10, puede observarse la capacidad germinativa (CG) de las variedades luego de 3 días de germinación (tiempo establecido en el proceso de malteado), donde la mayoría de las variedades mostraron valores superiores al 95-98%. Estos valores son los porcentajes mínimos y óptimos establecido para la comercialización de cebadas cerveceras según la Cámara Arbitral de Cereales de Buenos Aires (Resolución N° 27/2013). Sin embargo, las variedades Alhue (7) y Aliciaiana (10) mostraron valores de capacidad germinativa inferiores a estos valores establecidos para la comercialización como cebada cervecera, (93% y 81% respectivamente).

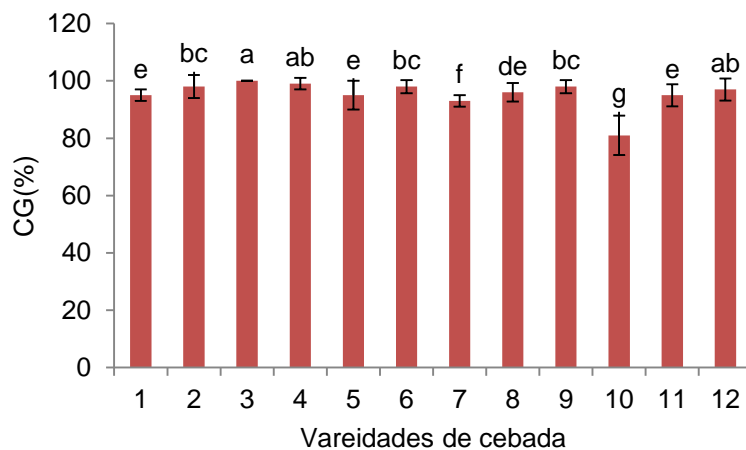


Figura 10: Respuesta de la capacidad germinativa CG (%) de las doce variedades de cebada analizadas, bajo condiciones de oscuridad y 15°C. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciaiana, 11) Jennifer, 12) Andreia. Variedades seguidas de la misma letra, no difieren significativamente según el test de LSD Fisher ($p \geq 0,05$).

Por otra parte, la energía germinativa (EG) hace referencia a la proporción de granos que no presentan letargo para germinar y se usa como un método indirecto para medir el vigor de las semillas. Se determina a los tres días y una buena cebada cervecera debe tener la mejor energía germinativa posible (tiempo mínimo donde la tasa de germinación es mayor), ya que en el malteado la rapidez con que se inicia la germinación es de importancia (Arias, 1991). Con respecto a este parámetro la única variedad que demostró una mejor EG fue la variedad Andreia (12), presentando la mayor tasa de germinación (32%) en las primeras 16 h de germinación. Luego las variedades Yanara (1), Fátima (2) y Danielle (4) presentaron una energía germinativa de 20 h con el 38%, 46% y 34% de semillas germinadas, respectivamente. Y por último, las variedades restantes, mostraron un tiempo mínimo de 24 h, para alcanzar su máxima tasa de germinación.

Cabe resaltar que el objetivo de este análisis fue establecer la proporcionalidad entre velocidad de germinación y número de plántulas germinadas. Este parámetro es muy útil para el proceso de malteado, porque da una idea de la cantidad de semilla que rápidamente brotará evitando cualquier ataque de patógenos (www.mapama.gob.ar).

Por otro lado, el tiempo medio de germinación (TMG) de la variedad Andreia (12) (figura 12), fue del rango de las demás variedades (20.08 h). Este parámetro, indica el tiempo necesario para efectuar el proceso de germinación. La variedad 11 (Jennifer) presentó el menor TMG 19.04 h, sin embargo este parámetro por sí solo, no permite determinar la mejor cebada con respecto a su proceso de germinación. En este sentido, considerando los tres parámetros evaluados, la variedad 12 presenta los valores germinativos óptimos para el proceso de malteado.

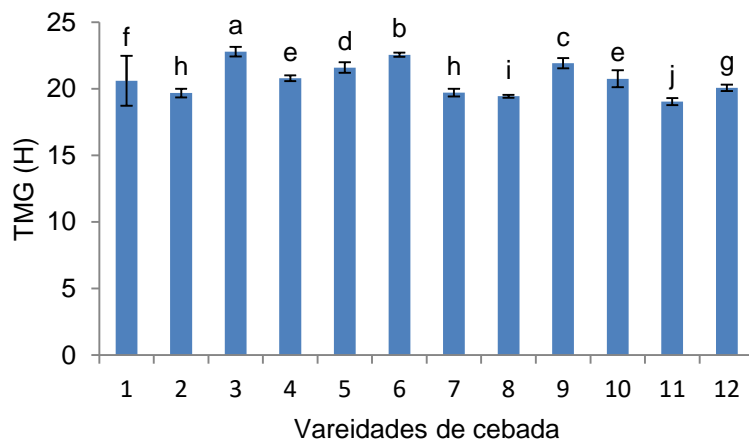


Figura 11: Tiempo medio de germinación TMG (h) de las 12 variedades de cebada. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciaana, 11) Jennifer, 12) Andreia. Variedades seguidas de la misma letra, no difieren significativamente según el test de LSD Fisher ($p \geq 0,05$).

6. Efecto de malteado en la solubilidad de proteínas

La germinación es un proceso biológico que desencadena múltiples eventos para permitir la síntesis de nuevas proteínas y favorecer la solubilidad de otras. (Giménez, 2017). Cuando la cebada es malteada y utilizada para elaborar cervezas, las proteínas contribuyen con características como sensación en boca y cuerpo de la cerveza, en la estabilidad de la espuma y en la tendencia de formar turbidez (Ferreyra, 2014). En general, se observó un aumento de 1.85 veces en el contenido de proteínas solubles cuando se evaluó después de la germinación (figura 13). A excepción de las variedades Danielle (4), Montoya (5), Charles (6) y Sinfonía (8) donde no se registró un aumento de proteína soluble. Los gránulos de almidón que representan el 60% del peso seco total en el grano de cebada (Espirita, 2009) forman complejos aglomerados con las proteínas de reserva del grano sin germinar (Prieto Méndez et al., 2009). Además, las proteínas solubles (albúminas y globulinas) representan el 25% de las proteínas del grano (Armentia. A, 1999) y son

deseables para ser utilizadas por las levaduras como fuente de nitrógeno para la elaboración de malta (Giménez et al., 2011). Los complejos de gránulos de almidón y proteína, son hidrolizados por un conjunto de enzimas como las denominadas α y β amilasa, y endoproteinasas (Jones & Budde, 2005) que se sintetizan en la germinación causando la movilización y conversión de las proteínas a un estado soluble. Este mismo autor, afirma, que el 50% de las proteínas se solubilizan en el malteado, para proveer de energía a la germinación y desarrollo de las semillas y por consiguiente obtener una adecuada calidad maltera (Jones & Budde, 2005 Xue, 2016). En este sentido, el aumento de proteínas solubles podría ser una consecuencia directa de la síntesis de enzimas amilolíticas y proteolíticas para la degradación de las estructuras del endospermo, como es el caso del almidón.

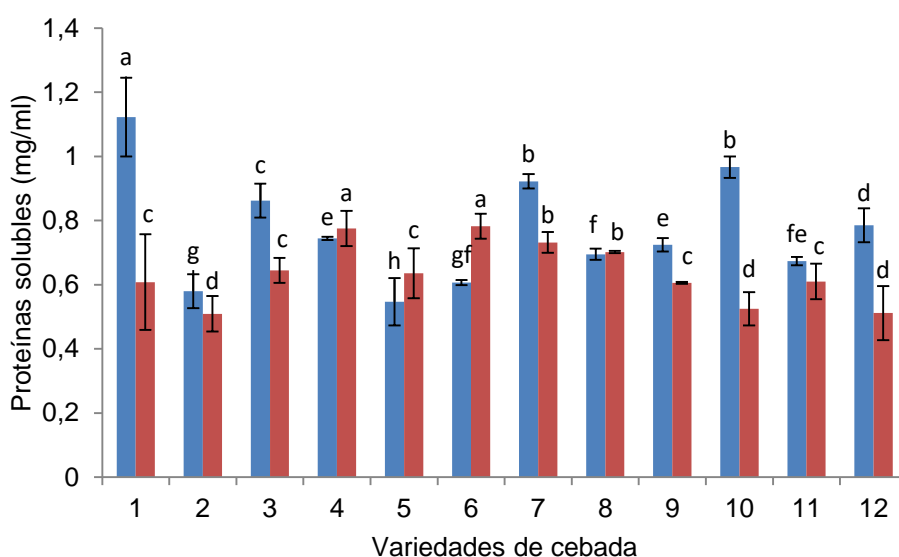


Figura 12: Contenido de proteína soluble por el método de Bradford en (■) granos de cebada sin germinar y (■) granos de cebada germinados o micro malteados. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Alicia, 11) Jennifer, 12) Andreia. Letras distintas dentro de cada tratamiento (granos germinados y sin germinar) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

7. Determinación de actividad α -amilasa

En la figura 13, se cuantificó el contenido de α -amilasa en granos de cebada germinados. Como se puede observar, el contenido de esta enzima fue mayor en las variedades Militza (3), Alhue (7), Overture (9) y Aliciaiana (10). Por otra parte, las variedades Fátima (2), Sinfonía (8) y Andreia (12) mostraron niveles de α -amilasa menores al 50% con respecto a las variedades mencionadas anteriormente. Esto, podría relacionarse con una menor solubilidad de proteínas durante el proceso de germinación observado en la figura 12 para las mismas variedades.

Los autores Kulusheva y Marinova (2007) reportaron, que la mayoría de las veces la hidrólisis enzimática del almidón se lleva a cabo con α -amilasas y en menor proporción aparecen las β -amilasas. No obstante, se ha demostrado que estas dos enzimas realizan una labor sinérgica para hidrolizar el almidón de la cebada. Además, de acuerdo con lo informado por Eglinton et al (1998), las β -amilasas son enzimas claves en la degradación del almidón de la cebada germinada, la cual es sintetizada durante el desarrollo del grano, al igual que otras enzimas importantes, como las endoproteinasas que también participan en el proceso de germinación (Jones & Budde, 2005). En este sentido, no se puede concluir sobre la calidad cervecera de las diferentes variedades de cebada con la evaluación de la α -amilasa, sino que deben evaluarse la actividad en conjunto de la α - y β -amilasa.

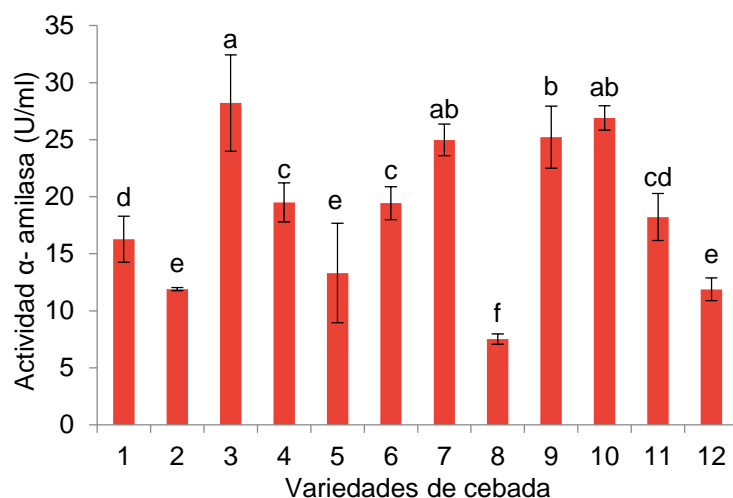


Figura 13: Actividad de la enzima α -amilasa (U/ml) de las 12 variedades de evaluadas. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Aliciana, 11) Jennifer, 12) Andreia. Variedades seguidas de la misma letra, no difieren significativamente según el test de LSD Fisher ($p \geq 0,05$).

8. Determinación de actividad α y β amilasas

Para corroborar la actividad sinérgica de las enzimas α - y β - amilasas presentes en los granos germinados y sin germinar, se realizó la actividad hidrolítica *in vitro* utilizando una solución de almidón como sustrato. Luego se cuantificó los azúcares reductores por el método de Somogy Nelson. Como se puede observar en la figura 14, los granos sin germinar mostraron una baja capacidad hidrolítica del almidón, y esto puede deberse fundamentalmente a la ausencia de la enzima α -amilasa previamente descrito en la bibliografía (Prieto Méndez et al, 2009). Por otra parte, después de la germinación, las variedades Fátima (2), Alhue (7), Alician (10), Jennifer (11) y Andreia (12) produjeron la mayor concentración de azúcares reductores (glucosa, fructosa, galactosa, lactosa y maltosa). Este aumento de azúcares simples es producto de la degradación del almidón resultado de su hidrólisis con las enzimas amilolíticas (Ketiku, 1973; Maduwanthi y Marapana 2017; Pereira et al. 2018). En este sentido, la variedad Andreia (12) mostró una actividad mayor con respecto a las demás variedades, dando indicio de ser un cultivar de cebada con buena calidad cervecera ya que podría alcanzar un alto potencial de rendimiento en extracto (principal carácter económico en la cervecería). Paredes Espinoza (2017) concluyó que el aumento en el rendimiento de azúcares fermentables (sustrato a usar por la levadura durante la fermentación), permite emplear menos cantidad de materia prima y obtener el mismo volumen de alcohol en el producto final. Esta característica le confiere la particularidad de ser un cultivar más competitivo ante una demanda globalizada y un mercado internacional fuertemente subsidiado.

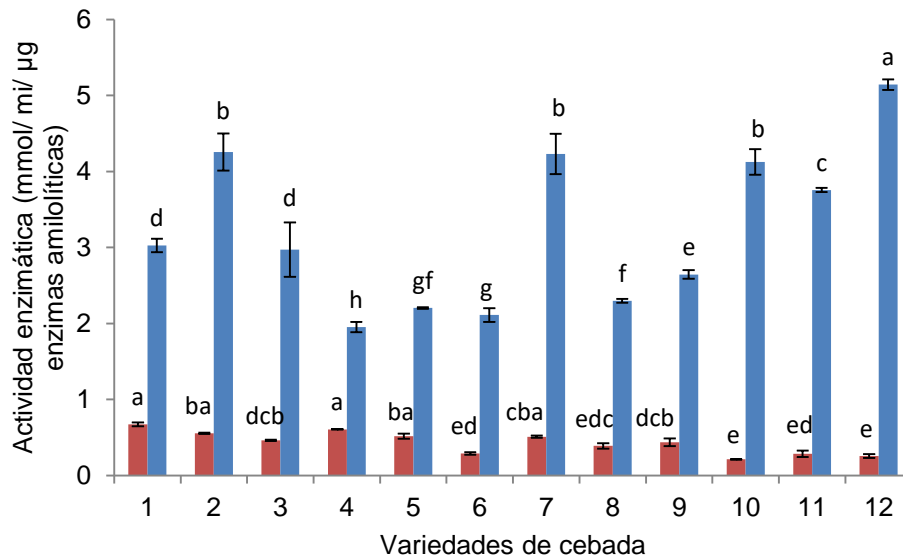


Figura 14: Actividad de enzimas amilolíticas total (■) granos sin germinar y (■) granos germinados/ micromalteados. Variedades analizadas: 1) Yanara, 2) Fátima, 3) Militza, 4) Danielle, 5) Montoya, 6) Charles, 7) Alhue, 8) Sinfonía, 9) Overture, 10) Alicia, 11) Jennifer, 12) Andreia. Letras distintas dentro de cada tratamiento (granos germinados y sin germinar) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Conclusión

De los análisis que se llevaron a cabo en esta tesis se pudo concluir que:

Las doce variedades de cebada cervecera analizadas en el presente trabajo no presentaron diferencias en el contenido total de proteína. En este sentido, todas las variedades se encuentran dentro de los valores de referencia para ser consideradas de calidad maltera.

Con respecto a las proteínas de reserva (hordeínas) de los cultivares evaluados, se destacaron la variedad Jennifer (11) y Andreia (12) por su mayor abundancia en hordeínas solubles mientras que las variedades Yanara (1), Fátima (2) y Alhue (7) presentaron menor abundancia de estas. Este resultado también fue demostrado por los patrones de hordeínas observados en geles SDS-PAGE (menor contenido de Hordeínas B). En este sentido, se pudo concluir que las variedades Jennifer (11) y Andreia (12), presentan mejores patrones de prolaminas (Hordeínas C) para favorecer el proceso de malteado de la cebada. Además, de acuerdo al análisis de agrupamiento las variedades 11 y 12 con un 35 % de similitud comparten el mismo origen genético, por lo tanto es esperable el comportamiento observado para sus proteínas de reserva (hordeínas). También puede destacarse que la variedad Sinfonía (8) comparte un 80% de similitud con la variedad 12 y podría ser también considerada de buena calidad maltera.

De acuerdo a los parámetros germinativos (CG, EG y TMG), la variedad Andreia (12) presentó los mejores valores, dando un indicio de ser una variedad con buena respuesta germinativa, necesario para el proceso industrial de malteado. Además, las variedades Sinfonía (8) y Jennifer (11) también mostraron valores óptimos de germinación (CG>95% y TMG aproximadamente 19 h). Por otra parte, las variedades Alhue (7) y Aliciana (10) presentaron valores de CG por debajo del mínimo necesario por las industrias cerveceras.

Se pudo demostrar a través de la actividad amilolítica, que la variedad Andreia (12) presentó mejor calidad maltera, demostrado por un alto potencial de

rendimiento en extracto que se relaciona de manera directa con un aumento en azúcares reductores fermentables.

A partir del estudio realizado en este trabajo de tesis, se concluye que la variedad Andreia, manifiesta características necesarias para ser utilizada por la industria cervecera. Sin embargo, concentrar la demanda del sector en una sola variedad podría representar una desventaja para el cultivo de cebada debido a la uniformidad genética. De esta manera, frente a condiciones ambientales adversas la cadena agroindustrial de la cebada queda vulnerable. Por ello, se sugiere el cultivo de variedades como Sinfonía (8) y Jennifer (11) que también presentaron características de interés industrial similares a Andreia.

Bibliografía

- AOAC. (1990) Official method of analysis. Association of Official
- Analytical Chemistry. 16th edición, Ed. By Hoorwitz, N., P. Chialo, y H.
- Reynold, Washington, USA
- Aguinaga, A. A. (2019). Mapeo de QTLs asociados a caracteres de calidad industrial con déficit hídrico en cebada cervecera.
- Arias, G. (1991). Calidad industrial de la cebada cervecera. Serie Técnica N 18, Editado por la Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA. ISBN: 9974-556-17-1
- Armentia, A. (1999). ALERGIA A LOS INHIBIDORES DE α -AMILASA DE CEREALES.
- Arte, E. (2013). Ohran hordeiinien uuttuminen ja metallikatalysoitu oksidaatio.
- Bolsa de Comercio de Rosario, sembrada y la producción de cebada en Argentina, desde el año 1969 hasta el 2022 <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal-38>
- Bewley, J. & Black, M. (1994). Seeds: Physiology of Development and Germination. . Edition 2. SPRINGER US.
- Bradford, MM (1976). Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de unión proteína-colorante. *Bioquímica analítica* , 72 (1-2), 248-254.
- Dailey, J.E., Peterson, D.M., Osborn, T.C., 1988. Hordein gene expression in a low protein barley cultivar. *Plant Physiol* 88: 450–453.
- De Schepper, CF, Michiels, P., Buvé, C., Van Loey, AM y Courtin, CM (2021). Hidrólisis del almidón durante el macerado: un estudio de la actividad y la cinética de inactivación térmica de la α -amilasa y la β -amilasa de malta de cebada. *Polímeros de carbohidratos* , 255 , 117494.
- Di Rienzo, J. A. (2009). InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Eglinton, J. K., Langridgeand, P., Evans, D. E. 1998. Thermostability Variation in Alleles of Barley Beta-Amylase. *Journal of Cereal Science* 28: 301-309.
- Espinosa, N. H., Reyes, M. R., Jiménez, F. E. G., Bretón, L. C. N., & Bribiesca, B. L. C. (2015). Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas). *Vertientes Rev. Espec. Cienc. Salud*, 18, 3-7.
- Espitia Rocha, L. C. (2009). Determinación de la concentración de alfa y beta amilasas comerciales en la producción de etanol a partir almidón de cebada empleando *sacchamyces cerevisiae*.
- FAO 2020 https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity

- Ferreyra, L. (2014). Elaboración de cerveza: Historia y evolución, desarrollo de actividades de capacitación e implementación de mejoras tecnológicas para productores artesanales
- Galotta, M. F., Rey, M. F., & Roberts, I. N. (2019). Efecto de la deficiencia de azufre durante el desarrollo de los granos de cebada sobre el poder germinativo y la dormición. *Investigación, Ciencia y Universidad*, 3(4), 93-93.
- Gibson, T. S., Solah, V., HOLMES, M. G., & Taylor, H. R. (1995). Diastatic power in 11 malted barley: contributions of malt parameters to its development and the potential of barley grain beta-amylase to predict malt diastatic power. *Journal of the Institute of Brewing*, 101(4), 277-280
- Giménez, F. J. (2017). Ganancia Genética en Cebada Cervecera (*Hordeum vulgare* L.) en Argentina durante el período 1931-2007 (Doctoral dissertation, Universidad Nacional del Sur).
- Giménez, Fernando; Conti, Verónica; Moreyra, Federico; y Juan Carlos Tomaso. (2011). Informe: Efecto de la época de siembra sobre los caracteres económicos en genotipos de cebada cervecera https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-efecto_de_la_poca_de_siembra.pdf
- Van der Heden, 1995. <http://caeliacerea.blogspot.com/2015/03/ingredientes-i-la-cebada.html>
- Howard, K. A., Gayler, K. R., Eagles, H. A., & Halloran, G. M. (1996). The relationship between D hordein and malting quality in barley. *Journal of Cereal Science*, 24(1), 47-53.
- Jonassen, I.B., Ingversen, J. and Brandt, A. Synthesis of SPII albumin, b-amylase and chymotrypsin inhibitor CI-1 on polysomes from the endoplasmic reticulum of barley endosperm. *Carlsberg Research Communications* 46 *Plant Science* 67 (1987) 175–181.
- Jones, B. L., & Budde, A. D. (2005). How various malt endoproteinase classes affect wort soluble protein levels. *Journal of Cereal Science*, 41(1), 95-106.
- Junio 2016 Características cebada <https://magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Informe-de-cebada.pdf>
- Ketiku, A., (1973). Chemical composition of unripe (green) and ripe plantain (*musa paradisiaca*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(6), 703–707.
- Kirkman, M.A., Shewry, P.R. and Mifflin, B.J. The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of barley seeds. *Journal of the Science of and Agriculture* 33 (1982) 115–127.

- Kolusheva, T., y Marinova, A. 2007. A study of the optimal conditions for starch hydrolysis through thermostable α -amylase. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 42 (1): 93-96.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Leistrumaitė, A. y Paplauskienė, V. (2007). Recursos genéticos de la cebada de primavera: análisis del polimorfismo de Hordein. *Biología*, 53 (3).
- Maduwanthi, S. D. T., y Marapana, R (2017). Biochemical changes during ripening of banana: A review, 2(5), 166–169.
- Martínez, A. M. (2020). Interacción de *Fusarium* en trigo y cebada bajo condiciones de temperaturas actuales y proyectadas a futuro (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Montembault, A., Autran, JC, Joudrier, P. y Moll, M. (1983). Identificación varietal de cebada y malta.
- Moreyra y Abbate. 2020. Rendimiento y estabilidad de los cultivares de cebada en Argentina.
- Nei, M. y Li, WH (1979). Modelo matemático para el estudio de la variación genética en términos de endonucleasas de restricción. *Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias*, 76 (10), 5269-5273.
- Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 1944, vol. 153, p. 375-380
- "NORMA V - ANEXO A - Resolución SENASA 27/2013 <http://www.senasa.gob.ar/resolucion-272013>
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (2009). *Agroindustria manual, cerveza de malta de cebada*; Roma, Italia.
- Osborne, T.B., 1924. *The Vegetable Proteins*. Longmans, Green and Co., London.
- Passarella, V.S., Savin, R., Abeledo G.L. y Slafer G. 2003. Malting quality as affected by barley breeding (1944-1988) in Argentina. *Euphytica* 134: 161-167.
- Paredes Espinoza, C. A. (2017). Mejorar la extracción de azúcares y características de calidad de la cerveza durante la maceración de las cervezas Red ale y Blonde ale producidas en Andes Brewing Co (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.).
- Pece, M.; Gaillard, C.; Acosta, M.; Bruno, C. & Saavedra S. 2010.
- Tratamientos Pregerminativos para Tipa Colorada (*Pterogyne nitens* Tul.).

- Recursos Genéticos Forestales. México. Foresta Veracruzana 12 (1): 17-25 pp.
- Pereira, G. A., (2018). Extraction optimization and profile analysis of oligosaccharides in banana pulp and peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), 1–10.
- Prieto Méndez, J., Rubio Hinojosa, C. U., Román Gutiérrez, A. D., Méndez Marzo, M. A., González Ramírez, C. A., & Prieto García, F. (2009). Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. *Multiciencias*, 9(2), 115-125.
- Pulido Regadera, A. (2004). Estudios celulares y moleculares de la inducción y primeras etapas de la androgénesis en cebada (*Hordeum vulgare* L.).
- Qi, JC, Zhang, GP y Zhou, MX (2006). Contenido de proteína y hordeína en semillas de cebada afectado por el nivel de nitrógeno y su relación con la actividad beta-amilasa. *Revista de Ciencias de los Cereales*, 43 (1), 102-107.
- Quiroz Marchant, I., García Rivas, E., González Ortega, M. P., & Soto Guevara, H. (2009). Ensayo de germinación para semillas de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst
- Ramírez, C. 2016. Estandarización de los procesos de fabricación de cervezas en planta piloto. Memoria de Ingeniero Civil Químico y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile.166 p.
- Ranal, N.A. & Garcia de Santana, D. 2006. How and why to measure the germination process? *Rev. Bras. Bot. São Paulo*. 29 (1).
- Salgado-Albarrán, M., Herrera-Díaz, J., & Dinkova, TD (2015). Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* , 18 (1), 43-51.
- Shewry, P.R., Franklin, J., Parmar, S., Smith, S.J. and Mifflin, B.J. The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. *Journal of Cereal Science* 1 (1983) 21–31.
- Shewry, PR y Tatham, AS (1990). Las proteínas de almacenamiento de prolaminas de las semillas de cereales: estructura y evolución. *Revista bioquímica* , 267 (1), 1.
- Shewry, P. R., Tatham, A.S., and Fido, R.J. 1995. Separation of Plant Proteins by Electrophoresis, Pp. 423–437 In *Methods in Molecular Biology—Plant Gene Transfer and Expression Protocols* (Vol. 49). Jones, H. (ed.) Humana Press, Totowa, NJ.
- SISA 2019-2020
https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_cebada2020.pdf

- Slack , PT, Baxter, ED y Wainwright, T. (1979). Inhibición por hordeína de la degradación del almidón. *Revista del Instituto de elaboración de cerveza* , 85 (2), 112-114.
- Van der Heden, 2015 La cerveza: Ingredientes. <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/maltas.htm> Visto 3 de junio 2022
- Vapa, L. y Radovic, D. (1998). Genética y biología molecular de hordeínas de cebada. *Comunicaciones de investigación de cereales* , 26 (1), 31-38.
- Veliz, C. G. (2017). Efecto de la disponibilidad de azufre sobre los procesos de removilización de asimilados y senescencia foliar en plantas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y su impacto sobre la calidad de los granos.
- Xue, Z., Wang, C., Zhai, L., Yu, W., Chang, H., Kou, X. y Zhou, F. (2016). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante del frijol mungo (*Vigna radiata* L.), soya (*Glycine max* L.) y frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) durante el proceso de germinación. *Revista Checa de Ciencias de la Alimentación* , 34 (1), 68-78.
- www.mapama.gob.ar