

ESTUDIO DEL DESARROLLO DEL NITRÓGENO AMINO LIBRE DURANTE EL MALTEADO DEL SORGO

STUDY OF THE DEVELOPMENT OF FREE AMINO NITROGEN DURING SORGHUM MALTING

Yanet Boffill Rodríguez^{1}, Irenia Gallardo Aguilar² y João de Almeida e Silva¹*

¹ Departamento de Biotecnología. Escuela de Ingeniería de Lorena. Universidad de São Paulo. Estrada Municipal do Campinho, s/n, CEP: 12602810, Lorena, Brasil.

² Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Recibido: Julio 28, 2016; Revisado: Octubre 28, 2016; Aceptado: Diciembre 14, 2016

RESUMEN

En el proceso de fabricación de cervezas se utiliza la malta de cebada como materia prima principal. Uno de los cereales idóneos para sustituir la cebada es el sorgo ya que posee alto potencial nutritivo. Sin embargo, la oferta de cervezas de sorgo aún es insuficiente en el mercado mundial, debido a la baja calidad de su malta. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el desarrollo del nitrógeno amino libre (FAN) durante el malteado del sorgo para el proceso de producción de cerveza mediante el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). Fue usado un diseño compuesto central rotatable (CCD) para desarrollar un modelo estadístico para la optimización de variables del proceso tales como la concentración de NaOH (0,2 - 0,5% (p/v)), el tiempo de remojo (12 - 36 h), y el tiempo de germinación (48 - 72 h). Los datos obtenidos a partir de la RSM en la producción de FAN fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y fueron analizados usando una ecuación polinómica de segundo orden. Las condiciones óptimas del malteado para el valor más alto de FAN (350,00 mg L⁻¹) fueron: concentración de NaOH 0,35%, tiempo de remojo 26 h y tiempo de germinación 63 h.

Palabras clave: bebidas, calidad, FAN, malta de sorgo.

ABSTRACT

In the brewing process, barley malt is used as main raw material. Sorghum is one of the most suitable cereals to replace barley because of its high nutritional value. However, the sorghum beer supply is still insufficient in the global market due to the low quality of its malt. The aim of this research was to study the development of free amino nitrogen (FAN) during sorghum malting for brewing process by using Response Surface Methodology (RSM). A Central Composite Rotatable Design (CCD) was used to develop a statistical model for the optimization of process variables such as NaOH concentration (0,2 - 0,5%(w/v)), steeping time (12 - 36 h), and germination time (48 - 72 h). Data obtained from RSM on FAN production were subjected to the analysis of variance (ANOVA) and were analyzed using a second order polynomial equation. Optimum malting conditions for the highest FAN value (350,00 mg L⁻¹) were: NaOH concentration 0,35%, steeping time 26 h and germination time 63 h.

Key words: beverage, quality, FAN, sorghum malt.

1. INTRODUCCIÓN

El sorgo, a diferencia de la cebada, se adapta muy bien a condiciones semiáridas y subtropicales, principalmente, en gran parte del continente Africano (Agu y Palmer, 1998). Por ese motivo, es empleada la malta de sorgo en la fabricación de bebidas en ese continente. Específicamente, (Lyumugabe et al., 2012) resaltaron la variabilidad de cervezas de sorgo de acuerdo con la localización geográfica, dentro de las mismas se encuentran: *ikigage*, *merissa*, *doro*, *amgbaytchoukoutou*. Estos autores reportaron que estas bebidas son ricas en calorías, vitaminas del complejo B (incluyendo tiamina, ácido fólico, riboflavina y ácido nicotínico). Además, presentan alto contenido de aminoácidos esenciales como lisina, y también presentan grandes cantidades de minerales dentro de los cuales se encuentran hierro, fósforo, potasio y sodio. Demostrando así que el empleo de sorgo en la producción de cerveza está basado, además de su disponibilidad, en su alto poder nutritivo.

Por otra parte, el cultivo de este cereal proporciona muchos beneficios tales como amplia adaptabilidad al medio, tolerancia a los estreses abióticos como la seca, salinidad y alcalinidad, y la capacidad de crecer rápidamente (Prasad et al., 2007).

Además del alto poder diastásico, uno de los principales objetivos del malteado, para la producción de cerveza, es producir malta con alto contenido de FAN. El FAN es producido por la acción de enzimas endógenas proteasas o peptidasas sobre la reserva de proteínas de los granos (Evans y Taylor, 1990) y (Dewar et al., 1997). Los productos de la descomposición de la acción proteolítica son aminoácidos y pequeños péptidos, y son llamados como FAN. Durante el proceso de producción de cerveza, el FAN es usado por las levaduras como fuente de nutrición en la fermentación, Pickerell (1986).

El remojo de los granos de sorgo con soluciones de NaOH, en pequeñas concentraciones, puede dar maltas con altos niveles de FAN y de poder diastásico (Lefyedi y Taylor, 2006). Este colectivo de autores confirmó que el empleo de soluciones de NaOH (0,2% (p/v)) es un método eficaz para el control de bacterias y hongos durante el malteado ya que reduce las unidades formadoras de colonias/g. En

este sentido, se han realizados diversos estudios del efecto de diferentes condiciones en las etapas del malteado sobre la calidad de la malta de sorgo (Bwanganga et al., 2012), (Bekele et al., 2012), (Djameh et al., 2015). Sin embargo, aún existen pocos estudios que muestren las mejores condiciones del proceso de malteado que garanticen un alto nivel de nitrógeno amino libre en el proceso de elaboración de cerveza. El objetivo de la presente investigación fue estudiar el desarrollo del (FAN) durante el malteado mediante la RSM, variando la concentración de NaOH, el tiempo de remojo y el tiempo de germinación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis de la calidad del grano

Los granos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) usados en este estudio fueron proporcionados por la Empresa “Ceres Sementes do Brasil” Energía de germinación (EG). La EG (%) fue determinada de acuerdo al método de la EBC (European Brewing Convention, 1987); pero, a 30 °C en lugar de 20 °C ya que el sorgo es malteado a esa temperatura para el buen desarrollo enzimático, reflejando su naturaleza tropical (Djamed et al., 2015). Se tomaron muestras representativas de 100 granos y se colocaron en papeles de filtro humedecidos (con 4 ml de agua doblemente destilada), dentro de placas Petri cerradas para el desarrollo de la germinación. Los granos germinados fueron contados a intervalos de tiempo de 24, 48 y 72 h.

2.2. Proceso de malteado

Para estudiar el desarrollo del nitrógeno amino libre durante el proceso de malteado, éste fue llevado a cabo a 30 °C.

Remojo. La etapa consistió en colocar las muestras de los granos en solución de NaOH a diferentes concentraciones (0,10; 0,20; 0,35; 0,50 o 0,60 % (p/v)) y a diferentes tiempos de remojo (TR), (3,82; 12,00; 24,00; 36,00 o 44,20 h). Los vasos fueron drenados cada 6 h, y adicionadas, entonces, nuevas soluciones de NaOH.

Germinación. Los granos fueron germinados en bandejas metálicas a diferentes tiempos de germinación (TG), (39,00; 48,00; 60,00; 72,00 o 80,00 h). La humedad fue mantenida por la aplicación agua destilada rociada.

Secado. La malta fue secada en una estufa aireada (marca Nova Ética) a 50 °C por 24 h de acuerdo a (Dewar et al., 1997). Al final de esta etapa, las raíces fueron removidas.

2.3. Análisis de las muestras

Preparación de las muestras. Las muestras de maltas se prepararon para el análisis mediante la molienda hasta polvo fino. Las mismas fueron almacenadas en bolsas de polietileno a 4 °C hasta su uso. El contenido de FAN (mg L^{-1}) fue determinado a partir del mosto de las muestras usando un ensayo colorimétrico, de acuerdo a los métodos ASBC (American Society of Brewing Chemists, 2008). Se colocan en tubos de ensayo 2 ml de los mostos diluidos (100 veces) con agua destilada y de la solución patrón (glicina) diluida, y se les adicionan 1 ml del reactivo color (ninhidrina pH 6,6). Las mezclas son colocadas en baño de agua en ebullición por 16 min y, después, enfriadas a 20 °C por 20 min. Finalmente, se les agregan 5 ml de la solución de dilución y se mide la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific

Serie GENEYIS 10S) contra el reactivo en blanco. La ecuación 1 muestra la fórmula utilizada para obtener los resultados.

$$FAN (mg L^{-1}) = \left(\frac{A_1}{A_2}\right) \cdot 2 \cdot d \quad (1)$$

Donde, A_1 es la absorbancia media de los ensayos con el mosto, A_2 es la absorbancia media de los ensayos con la solución de glicina y d es el factor de dilución.

2.4. Análisis estadístico

El programa IBM SPSS Statistics 20 fue usado para los análisis estadísticos. Se aplicó un Diseño Compuesto Central Rotable, el cual proporciona un modelo de segundo orden, utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta. Cada variable independiente, concentración de NaOH (X_1), tiempo de remojo (X_2) y tiempo de germinación (X_3) fue codificada en cinco niveles (Tabla 1). El análisis de varianza (ANOVA) y la aceptación del modelo se basaron en un nivel de confianza de 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Calidad del grano

Los granos de sorgo mostraron buena energía germinación (98%). El valor de EG recomendado, para que el sorgo sea considerado adecuado para el malteado, debe ser mayor que el 90% (Dewar et al., 1995). De acuerdo con los métodos analíticos de la EBC, el valor mínimo requerido de EG para la cebada es 96%. La EG en el presente estudio fue acentuadamente superior al valor mínimo para el sorgo, y también superior al mínimo requerido por la EBC para los granos de cebada.

3.2. Calidad de la malta

3.2.1. Derivación del modelo ajustado

A partir de los datos experimentales (Tabla 1), se obtuvo el modelo de regresión (ecuación 2) respecto a las variables independientes estandarizadas. El valor del R cuadrado corregido es muy alto (0,98); el error típico de la estimaciones 13,91 y el test de Durbin-Watson arroja un valor que no está demasiado lejano al idóneo que es 2, para mostrar que no hay autocorrelación de los residuales de la regresión.

$$FAN = 352,97 - 1,07X_1 + 32,42X_2 + 40,25X_3 - 41,00X_1^2 - 62,32X_2^2 - 59,97X_3^2 + 17,22X_1X_2 - 22,02X_2X_3 - 12,81X_1X_3 \quad (2)$$

3.1.2. Comprobación de la idoneidad del modelo desarrollado

La adecuación estadística del modelo de segundo orden se evaluó mediante la Prueba F de Fisher (F -test) y la prueba t de Student (t -test). En la Tabla 2 se muestra el Análisis de Varianza (ANOVA) correspondiente a la regresión y se observa que resulta altamente significativo (la significación del estadístico F es 0,00).

Los resultados de la regresión mostraron las variables que resultaron más significativas, donde no aparece como significativa la concentración de NaOH pero esta variable aparece en interacción con otras. Los coeficientes de la regresión se muestran en la

ecuación 2. La fiabilidad del modelo se ensayó mediante la comparación de los valores pronosticados por la regresión y los experimentales. En la Figura 1 se muestra la correspondencia lineal entre ambos valores.

Tabla 1. Diseño Compuesto Central Rotable y nitrógeno amino libre experimental

<i>Niveles de las Variables independientes</i>				<i>Respuesta</i>
<i>Experimentos</i>	<i>X₁</i> (%)	<i>X₂</i> (h)	<i>X₃</i> (h)	<i>FAN</i> (mgL ⁻¹)
Puntos factoriales				
1	-1 (0,2)	-1 (12)	-1 (48)	40,51
2	-1 (0,2)	-1 (12)	1 (72)	215,19
3	-1 (0,2)	1 (36)	-1 (48)	125,57
4	-1 (0,2)	1 (36)	1 (72)	200,00
5	1 (0,5)	-1 (12)	-1 (48)	37,98
6	1 (0,5)	-1 (12)	1 (72)	157,69
7	1 (0,5)	1 (36)	-1 (48)	217,72
8	1 (0,5)	1 (36)	1 (72)	219,90
Puntos axiales				
9	-1,682 (0,1)	0 (24)	0 (60)	229,24
10	1,682 (0,6)	0 (24)	0 (60)	187,68
11	0 (0,35)	-1,682 (3,82)	0 (60)	78,30
12	0 (0,35)	1,682 (44,18)	0 (60)	185,58
13	0 (0,35)	0 (24)	-1,682 (39)	54,43
14	0 (0,35)	0 (24)	1,682 (80)	213,92
Puntos centrales				
15	0 (0,35)	0 (24)	0 (60)	352,57
16	0 (0,35)	0 (24)	0 (60)	354,23
17	0 (0,35)	0 (24)	0 (60)	355,96
18	0 (0,35)	0 (24)	0 (60)	351,09

Tabla 2. Análisis de varianza para el modelo

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-test</i>	<i>Sig.</i>
Regresión	190009,39	9	21112,15	109,12	0,00
Residual	1547,87	8	193,48	-	-
Total	191557,26	17	-	-	-

F = F-test, Sig. = nivel de significación

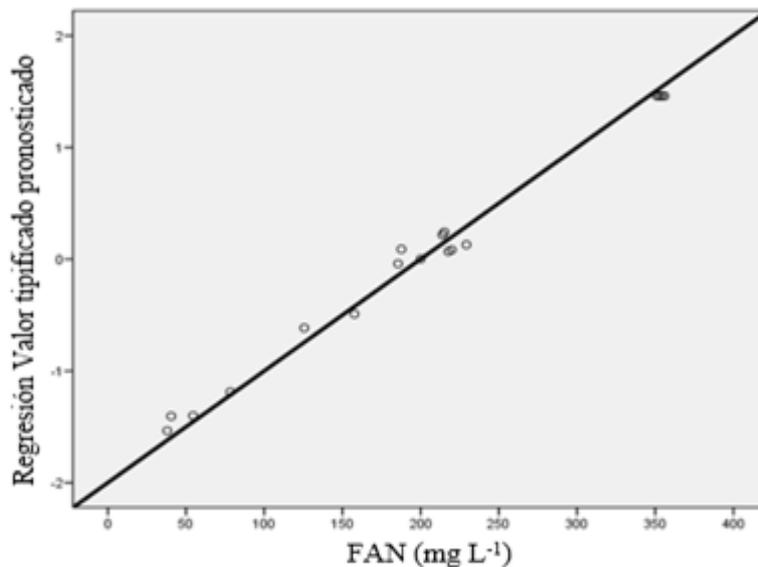


Figura 1. Variación entre los valores observados y los predichos

3.1.3. Superficies de Respuesta

Las figuras 2, 3 y 4 muestran las tres superficies de respuesta y sus correspondientes gráficos de contorno de la relación X_2 y X_3 ; X_1 y X_3 ; X_1 y X_2 cuando X_1 , X_2 o X_3 se mantienen constantes en su nivel central. Así, las ecuaciones resultantes de la ecuación 1, cuando X_1 , X_2 o X_3 se mantienen constantes en su nivel central y las dos restantes variables toman valores de -1,682; -1; 0; 1; 1,682, a partir del modelo (ecuación 3) son:

Cuando $X_1=0$:

$$FAN = 352,97 + 32,42X_2 + 40,25X_3 - 62,32X_2^2 - 59,97X_3^2 - 22,02X_2 X_3 \quad (3)$$

Cuando $X_2=0$:

$$FAN = 352,97 - 1,07X_1 + 40,25X_3 - 41,00X_1^2 - 59,97X_3^2 - 12,81X_1 X_3 \quad (4)$$

Cuando $X_3=0$:

$$FAN = 352,97 - 1,07X_1 + 32,42X_2 - 41,00X_1^2 - 62,32X_2^2 + 17,22X_1 X_2 \quad (5)$$

Donde, X_1 , X_2 y X_3 son los valores de las variables estandarizadas, concentración de NaOH, tiempo de remojo y tiempo de germinación, respectivamente. El efecto combinado de las tres variables independientes fue analizado y se encontró que las mismas influyen en el nivel de FAN.

La Figura 2 muestra el efecto de la variación del tiempo de remojo y el tiempo de germinación cuando la concentración de NaOH se encuentra en su nivel central. Puede observarse que un incremento del tiempo de remojo y del tiempo de germinación, hasta el punto central, incrementa el nivel de FAN. Igual comportamiento puede apreciarse en las Figuras 3 y 4 con la concentración de NaOH y el tiempo de germinación, y con la concentración de NaOH y del tiempo de remojo.

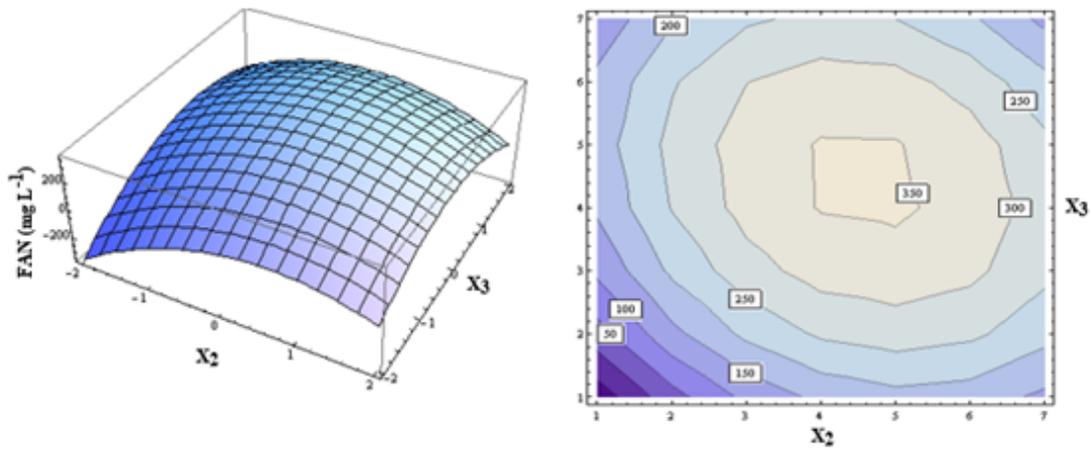


Figura 2. Superficie de respuesta y gráfico de contorno con X_1 constante

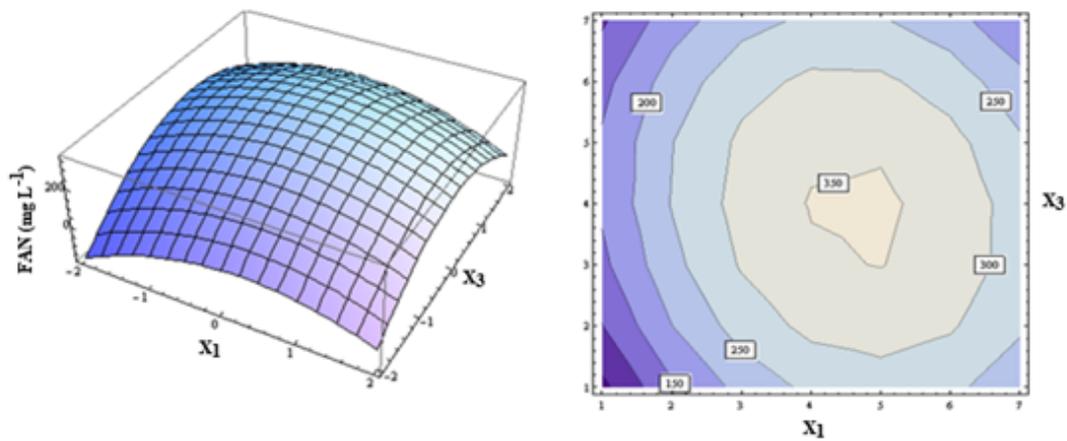


Figura 3. Superficie de respuesta y gráfico de contorno con X_2 constante

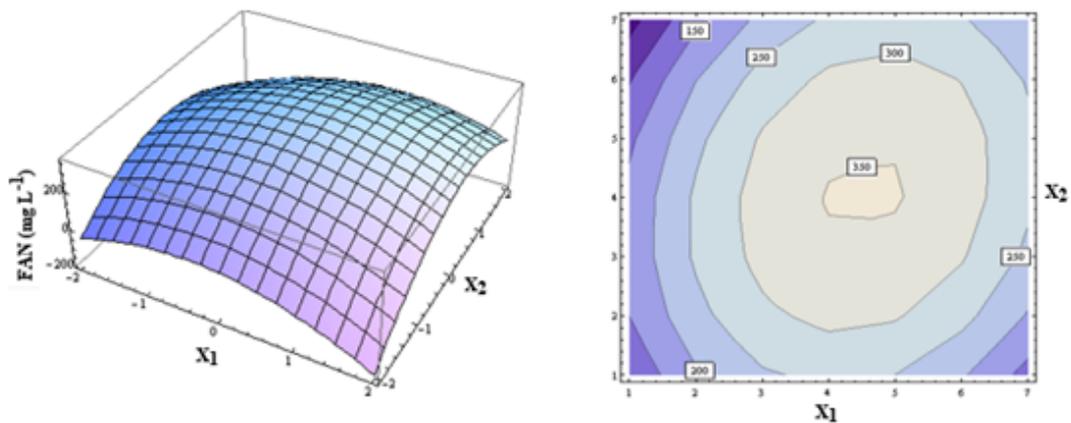


Figura 4. Superficie de respuesta y gráfico de contorno con X_3 constante

3.1.4. Determinación de las condiciones que optimizan el FAN

Las condiciones que optimizan la variable respuesta estudiada son: concentración de NaOH, 0,35 % (p/v); tiempo de remojo, 26,20 h y tiempo de germinación, 63,20 h (2,63 días), las mismas se corresponden con los puntos centrales del diseño experimental, y son afines a la literatura. Por ejemplo, (Beta et al., 2000) obtuvieron buenos resultados,

en términos de actividad α -amilasa, con el uso de NaOH (0,3% (p/v) en el malteado del sorgo. Además de mejorar la actividad α -amilasa, (Taylor et al., 2006) reportaron que, en Nigeria, los fabricantes usan, rutinariamente, NaOH diluido en la etapa de remojo como un método efectivo para la reducción de la contaminación fúngica. También, en África, el proceso tradicional de malteado sorgo se desarrolla hasta 24 h a temperatura ambiente (Lyumugabe et al., 2010). Por otra parte, a 30 °C, de 3 a 7 días de germinación el grano de sorgo produce maltas con un altos niveles de nitrógeno amino libre; además de alto poder diastático, y un aumento en el nivel de extracto de agua caliente y del contenido de azúcar (Morrall et al., 1986).

Los valores de FAN de malta de sorgo reportados por otros investigadores estuvieron en un rango de 90 y 358 mg L⁻¹, y se consideran adecuados niveles de 130-150 mg L⁻¹ para soportar el crecimiento de las levaduras en la fermentación, Pickerell (1986), (Ogu et al., 2006). El máximo valor de FAN (350,00 mg L⁻¹), a partir de las ecuaciones 2, 3 o 4, es superior al reportado por (Usai et al., 2013), (141 mg L⁻¹), y está en correspondencia al reportados en la literatura por (Bekele et al., 2012), los cuales alcanzaron un valor de 343,29 mg L⁻¹ con la variedad 76t1#23 a 144 h. Es válido aclarar que los máximos valores de FAN fueron alcanzados con remoción de las raíces, después del secado, y no con éstas, como es considerado por (Bekele et al., 2012) y (Dewar et al., 1997), para mejorar los niveles de nitrógeno amino libre, lo cual demuestra que la variedad de sorgo estudiada presenta buena calidad; así, puede ser seleccionada para la producción de malta para la elaboración de bebidas fermentadas.

4. CONCLUSIONES

1. La variedad de sorgo usada presentó una energía de germinación (98%) superior al valor requerido para que la malta sea comercializada; demostrando así que es capaz de desarrollar procesos enzimáticos adecuados.
2. Las mejores condiciones del proceso de malteado que optimizan el contenido de FAN, para el desarrollo de la fermentación, son: concentración de NaOH, 0,35% (p/v); tiempo de remojo, 26,20 h y tiempo de germinación, 63 h.
3. La malta de sorgo puede ser utilizada como sustituta de la malta de cebada en el proceso de producción de cervezas, teniendo en consideración los resultados del presente estudio.

REFERENCIAS

- American Society of Brewing Chemists., *Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists. Eighth Edition*, Minnesota, USA, 2008, pp. 1975-1976.
- Agu, R.C., Palmer, G.H., *A reassessment of sorghum for lager-beer brewing.*, *Bioresource Technology*, Vol. 66, 1998, pp. 253-261.
- Bekele, A., Bultosa, G., Belete, K., *The effect of germination time on malt quality of six sorghum (Sorghum bicolor) varieties grown at Melkassa, Ethiopia.*, *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 118, 2012, pp. 76-81.
- Beta, T., Rooney, L.W., Marovatsanga, L.T., Taylor, J.R.N., *Effect of chemical treatments on polyphenols and malt quality in sorghum.*, *Journal of Cereal Science*, Vol. 31, 2000, pp. 95-302.

- Bwanganga, J.C., Béra, F., Thonart, P., Optimizing red sorghum malt quality when *Bacillus subtilis* is used during steeping to control mould growth., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 118, 2012, pp. 295-304.
- Dewar, J., Taylor, J.R.N., Joustra, S.M., Accepted Methods of Sorghum Malting and Brewing Analysis, CISR-Food Science and Technology: Pretoria, South Africa, Methods 1 and 4, 1995, pp. 356-361.
- Dewar, J., Taylor, J. R. N., Berjak, P., Effect of germination conditions, with optimised steeping, on sorghum malt quality-with particular reference to free amino nitrogen., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 103, 1997, pp. 171-175.
- Djameh, C., Kwesi, F., Sinayobye, E., Budu, A., Essilfie, G., Mensah-Brown, H., Sefaddeh, S., Optimization of the sorghum malting process for pito production in Ghana., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 121, 2015, pp. 106-112.
- Evans, D. J., Taylor, J. R. N., Extraction and assay of proteolytic activities in sorghum malt., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 96, 1990, pp. 201-207.
- European Brewing Convention., *Analytica-EBC. Fourth Edition*, Analytica EBC, Fachverlag Hans Carl Nürnberg, Method 3.6.2, Section 3 Barley, 1987.
- Lefyedi, M.L., Taylor, J.R.N., Effect of dilute alkaline steeping on the microbial contamination, toxicity and diastatic power of sorghum malt., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 112, No. 2, 2006, pp. 108-116.
- Lyumugabe, F., Gros, J., Nzungize, J., Bajyana, E., Thonart, P., Characteristics of African traditional beers brewed with sorghum malt: a review., *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, Vol. 16, No. 4, 2012, pp. 509-530.
- Lyumugabe, F., Kamaliza, G., Bajyana, E., Thonart, P.H., Microbiological and physico-chemical characteristics of Rwandese traditional beer “Ikigage”., *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9, No. 27, 2010, pp. 4241-4246.
- Morrall, P., Boyd, H. K., Taylor, J. R. N., Van-Der-Walt, W. H., Effect of germination time, temperature and moisture on malting of sorghum (*Sorghum bicolor*)., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 92, 1986, pp. 439-445.
- Ogu, E. O., Odibo, F. J., Agu, R. C., Palmer, G. H., Quality assessment of different sorghum varieties for their brewing potential., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 112, No. 2, 2006, pp. 117-121.
- Pickerell, A.T.W., The influence of free a-amino nitrogen in sorghum beer fermentations., *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 92, 1986, pp. 568-571.
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N., Joshi, H. C., Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India., *Energy & Fuels*, Vol. 21, 2007, pp. 2415-2420.
- Taylor, J.R.N., Schober, T.J., Beanb, S.R., Novel food and non-food uses for sorghum and millets., *Journal of Cereal Science*, Vol. 44, 2006, pp. 252-271.
- Usai, T., Nyamunda, B.C., Mutonhodza, B., Malt quality parameters of finger millet for brewing commercial opaque beer., *International Journal of Science and Research*, Vol. 2 Sep., 2013, pp. 146-149.