

**Degradación enzimática del gluten de cebada utilizando bromelina para la producción de cerveza
apta para el consumo de individuos diagnosticados con enfermedad celiaca**

**Enzymatic degradation of barley gluten using bromelain for the production of beer suitable for
consumption by individuals diagnosed with celiac disease**

José Luis Cerfoglio

josecerfoglio@gmail.com

Cristian López Yegros

cristianlo2009@hotmail.com

Carlos Miguel Santa Cruz Vera

carlosmiguelasantacruzvera18@gmail.com

Recibido: 31/08/2023

Aprobado: 17/11/2023

Resumen

Esta investigación se llevó a cabo en la ciudad de Villarrica del Espíritu Santo, Guairá, en el Laboratorio Central de la Universidad Nacional de Villarrica del Espíritu Santo con el objetivo de evaluar el efecto de la Bromelina como agente catalizador para la degradación del gluten de la cebada (*Hordeum vulgare*) para la producción de cerveza artesanal apta para el consumo de individuos diagnosticados con enfermedad celiaca. La investigación se caracteriza por ser cuantitativa y cuasi experimental. Se utilizaron tratamientos con aplicación de la Bromelina en concentraciones de 0,1 %, 0,2 % y 0,5 % (masa/volumen), a temperatura de 62°C y tiempo de acción de la enzima en el mosto de 40 min. Como testigo o blanco se utilizó una muestra del mosto sometida al mismo proceso, pero sin la adición de la enzima. Considerando que el gluten es una proteína la cuantificación del gluten se estimó mediante el método colorimétrico para la determinación de proteínas totales y posterior lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm. La determinación de proteínas totales en el tratamiento sin proceso enzimático fue de 34.80 ppm, mientras que en los tratamientos con proceso de degradación enzimática los mejores resultados fueron de 2.84 ppm de proteínas totales en el tratamiento T3, 17,05 ppm de proteínas totales en el tratamiento T2 y 27.30 ppm de proteínas totales en el tratamiento T3..

Palabras Clave: Degradación Enzimática, Gluten, Bromelina, Cerveza sin Gluten.

Abstract

This research was carried out in the city of Villarrica del Espíritu Santo, Guairá, in the Central Laboratory of the National University of Villarrica del Espiritu Santo with the objective of evaluating the effect of Bromelain as a catalytic agent for the degradation of gluten from the barley (*Hordeum vulgare*) for the production of craft beer suitable for consumption by individuals diagnosed with celiac disease. The research is characterized by being quantitative and quasi-experimental. Treatments with application of Bromelain were used in concentrations of 0.1 %, 0.2 % and 0.5 % (mass/volume), at a temperature of 62°C and a time of action of the enzyme in the must of 40 min. . As a control or blank, a sample of the must subjected to the same process was used, but without the addition of the enzyme. Considering that gluten is a protein, gluten quantification was estimated using the colorimetric method for the determination of total proteins and subsequent absorbance reading in a spectrophotometer at 540 nm. The determination of total proteins in the treatment without enzymatic process was 34.80 ppm, while in the treatments with enzymatic degradation process the best results were 2.84 ppm of total proteins in the T3 treatment, 17.05 ppm of total proteins in the treatment T2 and 27.30 ppm of total proteins in treatment T3.

Keywords: Enzymatic Degradation, Gluten, Bromelain, Gluten Free Beer.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo la degradación del gluten se realizó mediante la adición de la enzima al mosto sometido a agitación magnética y a temperatura constante utilizando la enzima bromelina. La “FACE” Federación de Asociaciones de celíacos en España, señala que la enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia al gluten de trigo, cebada, centeno y probablemente la avena que se presenta en individuos genéticamente predispuestos, caracterizada por la reacción inflamatoria, de base inmune, en la mucosa del intestino delgado que dificulta la absorción de macro y micronutrientes. La cerveza se elabora principalmente a partir de

malta de cebada, teniendo gluten en su formulación.

La presencia de gluten imposibilita su ingesta a las personas celíacas. lo que representa una patología autoinmune con síntomas inflamatorios que afectan al intestino delgado, que se manifiestan al ingerir alimentos que contienen gluten.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se caracteriza por ser cuantitativa y cuasi experimental. Para realizar el procedimiento de degradación se utilizó la enzima bromelina. Para cada uno de los tratamientos, antes de realizar la adición de la enzima al mosto, la misma fue sometida a agitación magnética y a temperatura constante. Se agregó al mosto de la

cebada durante el macerado con una temperatura de 62°C y con tiempo de acción de la enzima en el mosto de 40 min. Para estimar el nivel de degradación de la concentración de gluten se realizó la Determinación de Proteínas Totales.

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE

DATOS

La técnica empleada fue de observación y pruebas. Para determinar el rendimiento del método se utilizaron tres tratamientos experimentales de mostos de cebada con enzimas proteolíticas de bromelina en diferentes dosificaciones y un tratamiento sin adición de enzima considerada como blanco o testigo como instrumentos experimentales y escala de medición.

Tabla 1 Descripción de los tratamientos que fueron utilizados en el experimento

TRATAMIENTO	Tipo
T0: Tratamiento 0	Sin aplicación Bromelina.
T1: Tratamiento 1	Aplicación Bromelina al 0,1 %.
T2: Tratamiento 2	Aplicación Bromelina al 0,3 %
T3: Tratamiento 3	Aplicación Bromelina al 0,5 %

Fuente: Propia (2023)

POBLACIÓN DE UNIDADES

La población estuvo compuesta de cuatro Unidades Experimentales (de 10 L cada una) contenidas en barriles de cerveza. Se procedió al embotellamiento considerando el efecto que podría tener el sobrenadante como el sedimentado en cada uno de los bloques, tanto en las características organolépticas como fisicoquímicas y se conformaron así cuatro bloques de 12 botellas cada uno para la toma de muestras, en filas de cuatro unidades y columnas de tres unidades cada uno.

VARIABLES QUE SE REGISTRARON.

Grado de degradación enzimática.

Para determinar esta variable se conformaron bloques de 12 botellas cada uno para cada unidad experimental. Para la toma de muestras, se extrajeron en forma aleatoria 3 muestras de cada bloque.

La obtención de la bromelina consistió en preparar un jugo de la cáscara de frutos inmaduros lavados con agua y pelados con un cuchillo a una profundidad de no más de 1.5 milímetros. Esta

cáscara fue triturada en un procesador de alimentos obteniendo una pasta húmeda almacenada en frascos plásticos a temperatura de a 35 °C a pH 5.

Para la adición de la enzima al mosto, el jugo fue sometido a agitación magnética y a temperatura constante durante 10 minutos para cada uno de los tratamientos. El agregado de las enzimas contenidas

en el jugo se realizó durante el macerado a una temperatura constante de 62°C y como tiempo de acción de la enzima en el mosto fue de 40 min.

Considerando que el gluten es una proteína, la Estimación del Grado de degradación enzimática se llevó cabo mediante la Determinación de Proteínas Totales.

Se observó que la enzima bromelina demostró ser un buen agente enzimático al actuar en la degradación de las proteínas totales en el mosto de cerveza, sin embargo, se recomienda para futuras investigaciones la realización del análisis con el kit ELISA y posterior lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm para una cuantificación de la concentración del gluten.

Tabla 2. Perfil Físicoquímico de los tratamientos.

Tratamiento	Ph	Acidez	Brix	Densidad	Graduación alcohólica (A.B.V.)	Determinación de Contenido calórico kcal	Determinación de Proteínas PPM
T0	3,71	0,4	5,5	1045	4.59	195,84	34,80
T1	3,47	0,5 3	5,5	1043	4.33	184,74	27,30
T2	3,27	0,5 5	5,4	1042	4.2	179,2	17,04
T3	3,21	0,5 7	5,4	1041	4.06	173,22	2,84

Fuente: Elaboración propia 2023.

Características del mosto y de la cerveza.

Cada uno de los tratamientos fue sometido a determinación de ph, determinación de acidez, determinación de sólidos disueltos, determinación de densidad, determinación de grado alcohólico, determinación de contenido calórico y determinación de proteínas. Así también para el análisis sensorial a prueba de color EBC, prueba de amargor en International Bitterness Units (IBU), aroma, persistencia de espuma, transparencia, cuerpo, vivacidad.

Tabla 3. Perfil Organoléptico de los

Tratamiento	Prueba de Color EBC	Amargor en International Bitterness Units (IBU)	Aroma	Persistencia de espuma	Transparencia	Cuerpo	Vivacidad
T0	12	30	4	4	3	4	4
T1	8,2	29	4	4	2	3.5	3
T2	8	29	4	4	2	3	2.5
T3	6,2	29	4	4	2	3	2.5

Fuente: Elaboración propia 2023.

Se observa que la enzima bromelina demostró ser un buen agente enzimático al actuar en la degradación de las proteínas totales en el mosto de cerveza. Así también un dato relevante es que los tratamientos con aplicación de la enzima alcanzaron en el segundo día de fermentación el contenido de sólidos disueltos ideal, sin embargo, esto repercute en otras propiedades fisicoquímicas disminuyendo la Graduación alcohólica (A.B.V.) y el Contenido calórico.

Para la evaluación la evaluación de análisis sensorial se conformaron muestras de cerveza artesanal con los tratamientos, en vasos plásticos

transparentes y en orden aleatorio más un test Test

hedónico descriptivo para la evaluación de los atributos de perfil sensorial de 5 puntos que indica la intensidad de la cerveza artesanal para cada atributo siendo; 1 = más baja aceptación y 5 = más alta aceptación, cada puntuación manifiesta una categoría distinta. Se observó una diferencia significativa en cuanto al color, propio del catabolismo de las enzimas y no se observaron diferencias significativas en cuanto al amargor.

En todas las muestras se pueden percibir un intenso aroma cítrico y frutal. Se determinó buena consistencia de espuma en todas las muestras. La transparencia varía de acuerdo al estilo, presencia o

ausencia de partículas en suspensión en cervezas artesanales, siendo considerado por los consumidores como un criterio de calidad a nivel sensorial. En cuanto al atributo del cuerpo y la vivacidad si fueron observadas diferencias significativas entre mayor sea la concentración de aplicación de la bromelina.

Características Efectos en individuos.

Para determinar esta variable se proveyó de una muestra de la cerveza con mayor estimación de la degradación de gluten a individuos diagnosticados con enfermedad celiaca junto con un cuestionario que fue aplicado 24 horas después del día que indicaron la ingesta del producto.

La población estuvo compuesta de doce individuos diagnosticados con enfermedad celiaca, quienes participaron en forma voluntaria en el experimento y aprobaron su participación mediante la firma de un consentimiento informado.

La evaluación de los efectos patológicos, biológicos, o fisiológicos en individuos está dada en

tres puntos que indican la intensidad de síntomas siendo; 0 = Ausencia, 1 = leve, 2 = moderada y 3 = grave. Cada puntuación manifiesta una categoría distinta de síntomas.

En la tabla 4 se presentan las mediciones de los resultados obtenidos con sus respectivas medias y sumatorias, en el cual no se registraron individuos afectados por síntomas de estreñimiento, cefalea, cansancio, necesidad urgente de defecar, síntomas extraintestinales, náuseas, dermatitis y vómito. De la muestra de doce individuos 2 personas manifestaron tener síntomas leves y moderados de dolores intestinales y diarrea.

Tabla 4 Efectos de la cerveza en individuos.

	Muestra de Individuos												Total de Afectados
	I 1	I 2	I 3	I 4	I 5	I 6	I 7	I 8	I 9	I 10	I 11	I 12	
Estreñimiento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarrea	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Necesidad urgente de defecar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Síntomas extraintestinales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefalea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cansancio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dolores intestinales.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
Náuseas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vómito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dermatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sumatoria	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	
Media	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	

Fuente: Elaboración propia 2023.

Al tratarse de un diseño cuasi experimental, no se cumple rigurosamente con todos los requisitos de un estudio experimental puro. No obstante, no se registraron individuos afectados por síntomas de estreñimiento, cefalea, cansancio, necesidad urgente de defecar, síntomas extraintestinales, náuseas, dermatitis y vómito. De la muestra de doce individuos 2 personas manifestaron tener síntomas

leves y moderados de dolores intestinales y diarrea.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA), para determinar las medias de los tratamientos y los bloques mediante el uso del programa estadístico Excel. Estos resultados fueron sometidos al 5% de probabilidad de error.

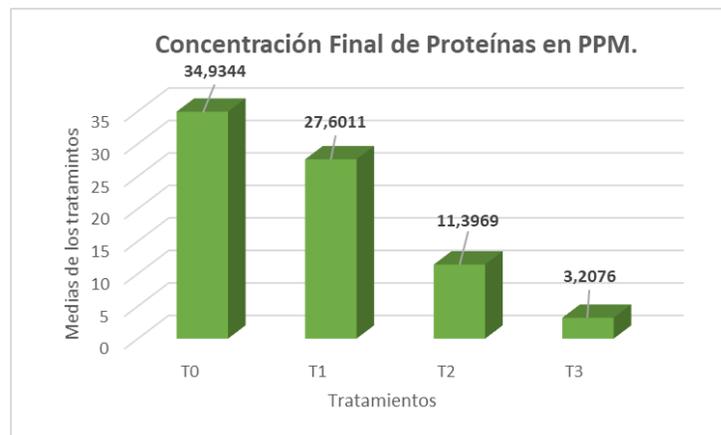
En la tabla 2 se presentan las mediciones de las repeticiones con sus respectivas medias y sumatorias en donde el Tratamiento T3 arrojó el mejor resultado con una degradación hasta 2,8409 PPM de Concentración de Proteínas, seguido del Tratamiento T2 con una media de 11.3669 PPM de Concentración de Proteínas que se encuentran por debajo de los 20 PPM, el cual es rango apto para el consumo de personas celiacas. Por último, el Tratamiento T3 con 27.6011 PPM de promedio en la Concentración Final de Proteínas.

Tabla 5 Mediciones de concentración del Gluten en PPM

Mediciones de concentración del Gluten en PPM				
Repeticiones	T0	T1	T2	T3
1	36,8011	26,6011	10,7636	3,0409
2	35,2011	27,3011	11,3636	2,8409
3	32,8011	28,9011	12,0636	3,9409
Suma(x_i)	104,8033	82,8033	34,1908	9,6227
Media	34,9344	27,6011	11,3969	3,2076

Fuente: Elaboración propia 2023

Gráfico 1. Promedio de las Mediciones de Concentración Final de Proteínas en PPM.



Fuente: Elaboración propia 2023

El análisis de varianza ANOVA efectuado para la determinación del nivel de degradación de gluten expresado en Partes por Millón (PPM) arrojó diferencias significativas entre los tratamientos, haciendo una relación al Tratamiento T0 como testigo y los demás tratamientos hubo diferencias significativas.

Tabla 3. Análisis de la Varianza de la Concentración Final de Proteínas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1904,30322	3	634,7677412	402,388425	0,000000004610759	4,066180551
Dentro de los grupos	12,62	8	1,5775			
Total	1916,92322	11				

Fuente: Elaboración propia 2023.

Tabla 4. Comparación de las medias de test Tukey al 5% de probabilidad de error

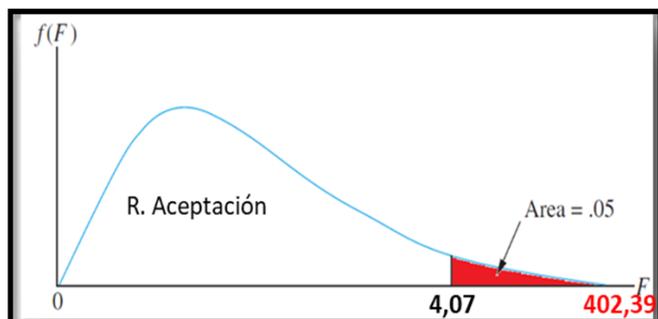
Al obtener resultados con diferencias significativas entre los tratamientos, se presenta en la tabla 4 las medias de test de Tukey al 5% de probabilidad de error en donde el T3 arrojó el mayor resultado en relación con el T0 con una diferencia de 31,73. De acuerdo a los resultados obtenidos T3 (0.5% de Bromelina extraída) es el que presentó los mejores resultados ante los demás tratamientos establecidos durante la evaluación, ya que con este tratamiento se logró una degradación rendimiento de hasta 2,8409 PPM de Concentración del Proteínas.

Diferencia poblacional	Diferencia muestral	Diferencia
$\mu A - \mu B$	7,33	Significativa
$\mu A - \mu C$	23,54	Significativa
$\mu A - \mu D$	31,73	Significativa
$\mu B - \mu C$	16,20	Significativa
$\mu B - \mu D$	24,39	Significativa
$\mu C - \mu D$	8,19	Significativa

Fuente: Elaboración propia 2023.

Para la evaluación de la Hipótesis se utilizó distribución para el valor F con cola derecha. El Análisis de la Varianza de la Concentración Final de Proteínas. Determinó un Valor de 402,388425 para F con un valor crítico para F de 4,066180551. El valor F corresponde a la zona de rechazo de la Hipótesis Nula.

Gráfico2. Distribución para el valor F con cola derecha.



Fuente: Elaboración propia 2023.

Como el valor es el valor F no corresponde a la R. Aceptación, existe evidencia estadísticamente significativa para rechazar la Hipótesis Nula. Por lo tanto, se puede concluir que las enzimas proteolíticas contenidas en la bromelina degradan el gluten del mosto de cebada, para la producción de cerveza apta para el consumo de personas diagnosticadas con celiaquía, con un nivel de significación de $\alpha = 0.05$.

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo es analizar el grado de modificación del gluten sometido a la acción de la enzima Bromelina, su relación con las características fisicoquímicas y con las propiedades sensoriales del producto obtenido. La determinación de proteínas totales en el tratamiento sin proceso

enzimático fue de 34.80 ppm, mientras que en los tratamientos con proceso de degradación enzimática los mejores resultados fueron de 2.84 ppm de proteínas totales en el tratamiento T3, 17,05 ppm de proteínas totales en el tratamiento T2 y 27.30 ppm de proteínas totales en el tratamiento T3.

Con la presente investigación se afirma que fueron observadas diferencias significativas entre mayor sea la concentración de aplicación de la bromelina más afecta al perfil organoléptico de la cerveza. Se concluyó que la enzima bromelina demostró ser un buen agente enzimático al actuar en la degradación de las proteínas totales en el mosto de cerveza y considerando que el gluten es una proteína, se estima la degradación a 2.84 ppm como el mejor resultado obtenido entre los tratamientos aplicados.

Al tratarse de un diseño cuasi experimental, no se cumple rigurosamente con todos los requisitos de un estudio experimental puro. No obstante, no se registraron individuos afectados por síntomas de estreñimiento, cefalea, cansancio, necesidad urgente de defecar, síntomas extraintestinales, náuseas,



dermatitis y vómito. De la muestra de doce individuos 2 personas manifestaron tener síntomas leves y moderados de dolores intestinales y diarrea.

Sin embargo, se recomienda para futuras investigaciones la realización del análisis con el kit ELISA y posterior lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm para una cuantificación precisa de la concentración del gluten.

REFERENCIAS

Albanese L, C. R. (2017). Gluten reduction in beer by hydrodynamic cavitation assisted brewing of barley malts. .

Alimentos, P. d. (1996.). *ALVARADO, J. .*

Associació Celíacs de Catalunya. (2021). *Clasificación de los alimentos .*

Baharil, S. A. (2005). Pilot scale extraction of proteolytic enzyme bromelain from pineapple (*Ananas comosus*).

Biología., H. D. (2003.). Mecanismo de acción de las enzimas.

Bixquert, P. (s.f). Estructura, función y síntesis de las proteínas.

Chávez, M. M. (1995). Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña.

Diario La Nación. (Enero de 2014). Cada paraguayo consume 66,8 litros de cerveza al año.

Diario La Nación. (Agosto de 2018). Paraguay se encuentra en el top 3 de consumo de cerveza en América.

Díaz, D. (2018). Elaboración de cerveza artesanal tipo ale, a partir de malta preparada con amaranto y otros cereales.

Diccionario Larousse. (2005).

Eliécer, J. (2003.). Producción y aplicación de enzimas industriales.

Federación de Asociaciones de Celiacos de España (FACE). (2021). *Manual de la Enfermedad Celiaca.*



- Federación de Asociaciones de celíacos en España. (2008). *Cuaderno de la Enfermedad Celíaca. "FACE"* .
- Félix, R. (2008). Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (*Solanum nigrum*) e higuera (*Ficus apollinaris*).
- Ferreira, L. (2014). Elaboración de cerveza: Historia y evolución, desarrollo de actividades de capacitación e implementación de mejoras.
- Fratini, A. F. (S.F). Optimizing bromelain extraction by reversed micelles from pineapple fruit.
- Galicia, M. (2019). Diseño y dimensionamiento de una línea de elaboración de cerveza artesana acondicionada en botella con levadura no-*Saccharomyces*, con una capacidad de 6.000 l/semana en Abanto Ciérvana (Vizcaya).
- García, B. (2020). Métodos de elaboración de cerveza sin gluten.
- González, J. (S.F). Cinética Enzimática.
- Hager AS, T. J. (2014). Gluten free beer - A review. Trends Food .
- Itescam. (s.f.). Purificación de proteínas.
- Lebrija-Santander Clavijo Diego, P. M. (2012). Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas Comosus*).
- López Lago, J. D. (1996). La bromelina: una proteasa de interés comercial.
- Marafon, F. (2014). Degradação enzimática do glúten em mosto de malte de cevada.
- Martha Hernández, C. C. (2005). Obtención de Preparados Enzimáticos a Partir de Tallos de Piña (*Ananas Comosus*) con Potencialidades de uso en la Biotecnología y la Medicina. .
- Mendoza, F. (2016). CERVEZA ARTESANAL A BASE DESORGO PARA ENFERMOS.



- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social .
(2018). Celiaquía: la clave está en una
alimentación adecuada y sin gluten.
- Norma, H. H. (1995). Ciencia de los alimentos.
- Pérez, A. C. (2018). Actividad proteolítica de
extractos enzimáticos obtenidos de plantas
de la familia Bromeliaceae.
- Pulido, A. (2007). Estudio técnico – económico
para la fabricación de bromelina.
- Ramos, L. L. (2011). Obtención de bromelinas a
partir de desechos agroindustriales de la
piña.
- Redondo Noemí, N. E. (Junio de 2020). Microbiota
and Lifestyle: A Special Focus on Diet.
- Robayo, F. (2011). Extracción, concentración y
cuantificación de la actividad enzimática de
la bromelina a partir de la piña. Tesis de
Ingeniería Bioquímica.
- Robayo, F. D. (2011.). Variación de la actividad
enzimática de tres proteasas de origen
vegetal, medida en leche.
- Sampieri, R. (2004). *Metodología de la
Investigación* .
- Sendra, J. M., & V., C. J. (1999). Evaluación de las
propiedades nutritivas , funcionales y
sanitarias de la cerveza , en comparación
con otras bebidas. Cerveza y Salud.
- Sendra, J. M., & V., C. J. (1999). Evaluación de las
propiedades nutritivas , funcionales y
sanitarias de la cerveza , en comparación
con otras bebidas. Cerveza y Salud. .
- Singh, P. &. (1998.). Introducción a la ingeniería
de los alimentos.
- Vidal, J. (2018). Análisis de la Molienda de la malta
de cebada y efectos en el rendimiento del
macerado.
- Wiseman, A. (1985). Manual de Biotecnología de
los Enzimas. Segunda edición.