

Extracción de la enzima invertasa y el análisis de la influencia de esta para la fermentación de la cerveza

Ana Sofía Corzo, Gabriela Lemus, José Ignacio Ovalle, Lourdes Mancilla, Santiago Juárez

Laboratorio de Microbiología I, Departamento de Bioquímica, microbiología y Biotecnología molecular, Universidad del Valle de Guatemala
Guatemala 25 Noviembre, 2022

RESUMEN: Como parte de la optimización de procesos para la creación de productos, la enzima invertasa tiene gran importancia en la industria alimentaria, como en la cervecería. La invertasa es una enzima con un papel importante en la hidrólisis de azúcares. Con esto, el objetivo del presente trabajo es el de analizar cómo se da el proceso de fermentación al desactivar la enzima o disminuir la presencia de esta en la levadura. Por ello, se elaboraron dos cervezas: un control y una con levadura modificada. Esto, con el objetivo de comparar los productos finales mediante análisis analíticos como cromatografía de gases, UV-Vis y refractometría. La importancia del presente trabajo de investigación recae en que existen diversas aplicaciones industriales mediadas por el trabajo enzimático que llevan a cabo distintos microorganismos. Trabajos donde la invertasa se utiliza como sustituto de levadura, por ende, comprender su capacidad enzimática es importante en diversos procesos. Se corroboró la efectividad del método utilizado para extraer la invertasa de las levaduras, aunque no se esperaba que las levaduras a las que se les extrajo la invertasa llevaran a cabo procesos de fermentación alcohólica. Se determinó que la cerveza realizada por levaduras simples no presentó metanol, mientras que la que contenía levaduras con invertasa eliminada sí presentó metanol. Este fenómeno puede ser ocasionado por alguna contaminación externa o bien, que los diferentes tiempos de fermentación y reposo para cada cerveza hayan influido en los resultados.

PALABRAS CLAVE: Enzima invertasa, cervecería, cerveza, levadura, fermentación, industria alimentaria.

Extraction of the invertase enzyme and analysis of its influence on beer fermentation

ABSTRACT: As part of the optimization of processes for the creation of products, the invertase enzyme is of great importance in the food industry, such as in the brewery. Invertase is an enzyme with an important role in the hydrolysis of sugars. With this, the objective of this work is to analyze how the fermentation process occurs by deactivating the enzyme or reducing its presence in the yeast. Therefore, two beers were brewed: a control one and one with modified yeast. This, with the aim of comparing the final products through analytical analyzes such as gas chromatography, UV-Vis and refractometry. The importance of this research work lies in the fact that there are various industrial applications mediated by the enzymatic work carried out by different microorganisms. Where invertase is used as a substitute for yeast, therefore, understanding its enzymatic capacity is important in various processes. The effectiveness of the method used to extract invertase from yeasts was confirmed, although it was not expected that the yeasts from which invertase was extracted would carry out alcoholic fermentation processes. It was determined that the beer made by simple yeasts did not present methanol, while that containing yeasts with extracted invertase did present methanol. This phenomenon may be caused by some external contamination or that the different fermentation and rest times for each beer have influenced the results.

KEYWORDS: Invertase enzyme, brewery, beer, yeast, fermentation, food industry.

Introducción

Avances en estudios bioquímicos y ciencias moleculares, han dado lugar a la identificación enzimática. Según Heckmann (2020), para 1907, fue identificada la enzima encargada de catalizar la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa: la beta-fructofuranosidasa- o bien conocida como invertasa-. Esta tiene la función de convertir estos disacáridos en etanol, por lo que es aplicada en la industria alimentaria. Se utiliza ampliamente para la fermentación de melazas gracias a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol, siendo útil para llevar a cabo el proceso de fermentación (Aguilar, 2016).

La cerveza, uno de los productos realizados con ayuda de la invertasa, es una bebida alcohólica producida por la fermentación de azúcares de levadura derivados de la cebada malteada en alcohol y aromatizada con lúpulo. Los ingredientes esenciales para la cerveza cebada malteada son el lúpulo, agua y levadura. Los cuales son sometidos a un proceso de tres etapas: molienda, maceración y conversión. El proceso inicia en la maceración donde se procesa la malta para liberar azúcares fermentables (Bokulich, 2013). Los azúcares presentes en la malta se almacenan en forma de almidón. La malta se mezcla con agua para obtener un puré. Las enzimas de la malta se liberan y convierten el almidón en azúcar. El líquido azucarado, conocido como mosto, se extrae de la masa y se hierve con lúpulo, lo que le confiere amargura y sabor (Morales-Toyo, 2018). A continuación, el mosto se enfría y se añade levadura. La levadura fermenta el mosto, produciendo alcohol y CO₂, transformándolo en cerveza (Brewing, 2019).

De acuerdo con Suárez-Machín (2016), la levadura es el nombre con el que se le conoce a los hongos microscópicos unicelulares capaces de descomponer diversos cuerpos orgánicos, principalmente carbohidratos. Las levaduras tienen la capacidad de vivir y crecer en presencia y ausencia de oxígeno. En ausencia de oxígeno, sobreviven mediante el proceso de fermentación donde obtienen dióxido de carbono y etanol como productos finales. Cabe resaltar que existen dos tipos de fermentación en las cuales, por consiguiente, se hace uso de distintas levaduras; estas son Lager (*Saccharomyces uvarum* o *carlsbergensis*) y las Ale (*Saccharomyces cerevisiae*) (Sanz, 2021). La fermentación con la levadura Lager se denomina fermentación baja porque se produce en la parte inferior del fermentador a temperaturas de 0 a 12°C. Por otro lado, la fermentación con la levadura alta se da cerca de la superficie del mosto a temperaturas de entre 10 y 24°C (Sanz, 2021).

En base a lo mencionado, la enzima invertasa tiene una importante función en la industria cervecera, dado que en el proceso de fermentación esta realiza la hidrólisis de varios azúcares. Es por ello que la investigación presente, busca

analizar cómo se da el proceso de fermentación si se desactiva la enzima o se disminuye la presencia de esta en la levadura utilizada. Para conocer más sobre este proceso, se compararon dos cervezas donde una de ellas contiene levaduras modificadas. Esto con el objetivo de comparar los productos finales mediante análisis analíticos como cromatografía de gases, UV-Vis y refractometría. La importancia del presente trabajo de investigación recae en que existen diversas aplicaciones industriales mediadas por el trabajo enzimático que llevan a cabo distintos microorganismos. De tal manera pretendemos desarrollar una comparación respecto a la influencia que posee la invertasa durante el proceso de fermentación de la cerveza y brindar un enfoque de las posibilidades de mejora en cuanto a producción que tendrían las empresas artesanales o industriales de melazas.

La experimentación que presentamos nace como fruto del interés por el análisis microbiológico en levaduras llevado a cabo durante el curso. En esta experimentación se buscó medir la tasa de cambio entre una cerveza fermentada con levadura de la cepa *S.cerevisiae* y una fermentada con la cepa *S.cerevisiae* sin invertasa. Esto, con la finalidad de comparar el rendimiento, duración y eficiencia de la producción de cerveza así como la influencia enzimática que posee la invertasa como catalizadora.

Materiales y Métodos

Elaboración de cerveza

Se pesaron 0.750g de cebada malteada y se molieron parcialmente haciendo uso de un procesador convencional. Seguidamente, se procedió a macerar la muestra de cebada en un recipiente apto para cocción donde se le adicionaron 3L de agua. Bajo agitación, se calentó hasta llegar a una temperatura de 50°C y se dejó reposar por 30 minutos. Se realizó un segundo calentamiento hasta llegar a 64°C, se repitió el reposo por 30 minutos. Un tercer calentamiento fue realizado hasta llegar a 74°C reposando por 10 minutos. El último calentamiento consistió en llegar a 77°C con reposo de 30 minutos.

Fue necesario extraer todo el residuo de cereal generado durante la cocción haciendo uso de una malla de filtración o colador de cocina filtrando así la mezcla de malta y mosto. El mosto se somete a un calentamiento hasta ebullición, en este punto se le adicionaron 0.6g de lúpulo el cual le aporta un sabor amargo a la cerveza. Se dejó hervir por 30 minutos para después adicionar nuevamente 1.2g de lúpulo. Se esperó 20 minutos de la segunda adición de lúpulo para añadir otros 1.8g, lo que le confiere el aroma característico a la cerveza. Se continuó calentando por 10 minutos más y se dejó reposar por otros 10 minutos. El siguiente paso fue dejar enfriar el mosto hasta alcanzar una temperatura

ambiente, es decir entre 25-28°C. El último paso fue llevar la cerveza al fermentador agregando suficiente agua para llegar a los 3L y añadiendo levadura. Se tapó el botellón con una trampa de bacterias y aire y se dejó fermentar por 5 días (Brewing, 2019).

Este procedimiento se realizó en duplicado con la diferencia que en la segunda preparación se utilizó levadura sin invertasa, la cual se extrajo previamente en el procedimiento detallado a continuación.

Extracción de invertasa

Se colocaron 25 g de levadura seca en 100 ml de una solución 0.1M de bicarbonato de sodio, dejando incubar la mezcla durante 5 horas a 35°C. Seguidamente, se procedió a centrifugar por suspensión de 10,000g durante 30 minutos a 4°C. Se transfirieron 25 ml del sobrenadante a un tubo con 10 ml de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión durante 5 minutos dentro de un baño de hielo. A continuación se centrifugó a 10,000g durante 10 minutos a 4°C nuevamente. Se transfirió el nuevo sobrenadante a un tubo y se agregaron 7 ml de etanol absoluto frío mezclando constantemente por inversión. Una última centrifugación fue realizada por 10 minutos a 4°C para finalmente almacenar el sobrenadante sin el pellet y resuspender en 2ml de PBS, esperando obtener la invertasa aislada.

Evaluación cualitativa de la actividad de la invertasa

Se mezclaron 10 g de azúcar en polvo con 200 uL de invertasa previamente extraída para ensayar. Se incubó la muestra por 5 días a temperatura ambiente y se llevó a cabo la inversión de azúcar como actividad positiva.

Análisis del rendimiento de fermentación de la cerveza por UV y GC

Para este análisis se requirió del equipo de cromatografía de gases y un espectrofotómetro UV-VIS. Se inició con este último equipo para obtener las absorbancias de la muestra de invertasa (véase cuadro 2). Para ello se realizaron soluciones a base de BSA, la cual tiene una composición parecida a la invertasa. Se obtuvieron las absorbancias de estas soluciones y se realizó una curva de calibración para la misma. De este modo, se obtuvo la concentración de cada una de las réplicas de muestra de invertasa con ayuda de una regresión lineal. Se prosiguió con un análisis de cromatografía de gases de tres puntos, para ello no fue necesario un estándar interno. Esto se realizó con el fin de obtener la cantidad de etanol y metanol en la cerveza modificada y en la cerveza normal. Estos datos ayudaron a comparar el rendimiento de la fermentación de ambas cervezas (Paz, 2005).

Resultados y discusión

Se buscaba evaluar la efectividad del método de extracción de invertasa y las cualidades de la invertasa extraída. De igual forma, se buscaba analizar la capacidad de las levaduras a las que se les extrajo la invertasa de realizar un proceso de fermentación alcohólica controlado para producir cerveza, por medio de la medición de metanol y etanol. Cumpliendo satisfactoriamente, de esta manera, con el objetivo de la investigación al extraer la invertasa, obtener una concentración de la misma e identificar compuestos alcohólicos en el producto final.

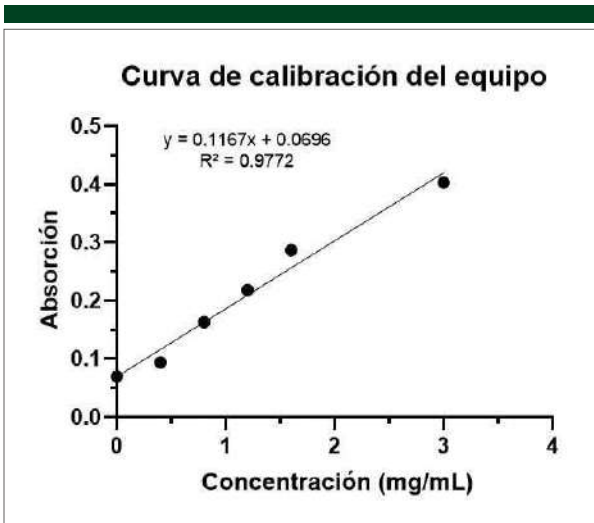
Se realizó una prueba en duplicado de fermentación de glucosa, utilizando la invertasa extraída, y azúcar de marca comercial. Se agregaron ambas sustancias en un medio anaeróbico y se dejó reposar para evaluar la capacidad de la invertasa. En base a los resultados y cualidades organolépticas analizadas evidencian que se dio un proceso de degradación y fermentación de la glucosa, se puede afirmar que la invertasa extraída cumplía con las características esperadas de la enzima.

Los análisis para determinar la concentración de invertasa obtenida, presentaron una media de 0.4761 ± 0.9682 mg/ml, lo cual es satisfactorio para los resultados teóricos buscados. La curva de calibración realizada con los estándares de BSA para obtener la concentración de invertasa, presentó un valor de regresión r^2 de 0.9682. Este valor indica una alta linealidad en la absorbancia de las muestras analizadas y en las concentraciones de invertasa. Por ende, validando el método de extracción de invertasa realizado.

Respecto al producto final de cerveza obtenida, se dio un proceso de fermentación normal al utilizar levadura con la invertasa extraída. Esto nos indica que las levaduras a las que se les extrajo la invertasa realizaron de igual manera un proceso de fermentación alcohólica. Existe la posibilidad de que tras la extracción de la invertasa mediante la centrifugación, las levaduras pudieran generar nuevamente esta enzima catalizadora al estar en un medio anaerobio adecuado con los sacáridos necesarios para degradarse.

Cuadro 1. Análisis estadístico para la concentración de invertasa.

Estadístico	Valor
Media muestral	0.4761 ± 0.9682 mg/ml
Desviación estándar	0.2389
Coefficiente de Variación	50%
Intervalo de Confianza	0.4761 ± 0.2094



Gráfica 1. Curva de Calibración y regresión lineal con BSA para obtener la concentración de invertasa extraída.



Fifura 1. Fermentación de cerveza con levadura y sin invertasa (izquierda) y con levadura normal (derecha).

La cerveza generada utilizando estas levaduras sin invertasa se caracterizó por tener una coloración más oscura. Esto puede deberse a que conservó la coloración de la malta utilizada al no haberse producido una cantidad de etanol considerable en comparación a la muestra con levadura normal. Al haberse dejado fermentar una menor cantidad de tiempo, es posible que esto haya podido tener una incidencia en la coloración. Ocasionando también la menor cantidad de etanol registrada en la cerveza con levaduras sin invertasa.

Cabe destacar que la cerveza que fue producida con levaduras sin extraer invertasa no presentó metanol en solución al realizar los análisis cromatográficos. La cerveza con las levaduras modificadas presentó una concentración de metanol de 7.86×10^{-2} . Esto se pudo deber a la cantidad de tiempo de fermentación, ya que fue menor al de la cerveza con levaduras normales. De igual forma la presencia de metanol puede ser generada por procesos bioquímicos directamente relacionados a la levadura empleada, al reaccionar con el dióxido de carbono generado por la fermentación, y que esto incidiera en la generación de metanol.

Cuadro 2. Compuestos identificados por cromatografía de gases de la fermentación de las dos variaciones de cervezas realizadas.

Proporción del compuesto Identificado	Cerveza con levadura sin invertasa %v/v	Cerveza con levadura completa %v/v
Metanol	7.86×10^{-2}	0
Etol	1.735	5.123

Conclusiones

Se extrajo la enzima invertasa cuya concentración final fue de 0.4761 mg/ml. Y, al estar en un medio anaerobio adecuado con los sacáridos necesarios para degradarse, es posible que se haya llevado a cabo la fermentación alcohólica.

La cerveza obtenida mediante el uso de levaduras simples no presentó metanol en solución. Por otro lado, la cerveza a la cual se le agregaron levaduras con invertasa extraída sí presentó metanol. Es probable que la principal causa de este fenómeno sea algún proceso de contaminación externa. O bien, que los diferentes tiempos de fermentación y reposo que se dieron para ambos resultados hayan influido directamente en los resultados obtenidos. Por ello se recomienda un monitoreo constante a tiempos estipulados desde la producción de la cerveza hasta el análisis realizado para tomar en cuenta todos los datos posibles.

Agradecimientos

Personal que apoyó con equipo de laboratorio:

- Licda. Christa Contreras, Coordinadora de laboratorios del departamento de bioquímica, microbiología y biotecnología molecular; catedrática del curso de Microbiología 1 en la Universidad del Valle de Guatemala.
- Licda. Patricia Palomo, Coordinadora de la planta de ingeniería en alimentos; catedrática de cursos varios de la facultad de ingeniería de la Universidad del Valle de Guatemala.

- Ing. Gamaliel Zambrano, Director del departamento de ingeniería química; catedrático de cursos varios de la facultad de ingeniería en la Universidad del Valle de Guatemala.
- Licda. Ana Luisa Mendizabal, Coordinadora del laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado.
- Lic. Miguel Morales, Catedrático de cursos varios en la Universidad del Valle de Guatemala.

Personal que apoyó en el trabajo de laboratorio:

- Nicolás Sandoval, Estudiante de ingeniería química en la Universidad del Valle de Guatemala.
- Diego Aguilar, Estudiante de la licenciatura en química en la Universidad del Valle de Guatemala.

Bibliografía

Aguilar, C. (2016, 30 junio). LA INVERTASA APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA. https://www.academia.edu/26644635/LA_INTERVASA_APLICACION_EN_LA_INDUSTRIA

Bokulich N., A., Bamforth C., W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 77 (2), 157-172. doi:10.1128/MMBR.00060-12

Brewing C. (2019). Principios Básicos de la industria cervecera y la producción de la cerveza. Recuperado de: [https://ec.europa.eu/programmes/erasmus-plus/project-result-content/f83dc09a-0cda-4a3d-b724-76115a75960a/UNIT%201%20-%20BREWING%20\(ES\).pdf](https://ec.europa.eu/programmes/erasmus-plus/project-result-content/f83dc09a-0cda-4a3d-b724-76115a75960a/UNIT%201%20-%20BREWING%20(ES).pdf)

Heckmann C., Paradisi F. (2020). Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools. *ChemCatChem*. Vol. 12 (24), 6082-6102. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001107>

MA Sainz-Polo, M Ramírez, A Lafraya, B González, J Marín-Navarro, J Polaina, J Sanz-Aparicio. (2013). *Three-dimensional structure of Saccharomyces invertase. Role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity*. *Journal of Biological Chemistry* doi:10.1074/jbc.M112.446435 Recuperado de: <https://www.iqfr.csic.es/es/investigacion-oculto/46-estructura-3d-de-la-invertasa-de-saccharomyces-una-enzima-clave-en-el-metabolismo-del-azucar#:~:text=La%20invertasa%2C%20que%20cataliza%20la,de%20melazas%20para%20producir%20etanol.>

Morales-Toyo, M. (2018). Reacciones químicas en la cerveza. *Revista de Química*. Vol. 32 (1), 4-11.

Paz, L. (2005). DETERMINACIÓN DE METANOL EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS FERMENTADAS TRADICIONALES Y POPULARES DE MAYOR CONSUMO EN DOS REGIONES DE LA REPÚBLICA DE GUATEMALA POR CROMATOGRFÍA DE GASES. USAC. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2379.pdf

Sanz, C. A. (2021, 11 marzo). Cuál es la función de la levadura en la cerveza. Loopulo. <https://loopulo.com/levaduras/funcion-levadura-cerveza/>

Suárez-Machín, C., Garrido, N., A., C, Guevara, C., A., R. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*. Vol. 50 (1), 20-28.