

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTUDIO PRACTICO SOBRE EL EFECTO DE
ALGUNOS ESTABILIZADORES EN CERVECERIA

134

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A
FRANCISCO JAVIER GONZALEZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1 9 7 4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
ADQ. 1974
FECHA
PROC. H. E. 130



QUINTA

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos con profundo cariño y agradecimiento por sus continuos sacrificios, consejos, entusiasmo y apoyo.

Al Ing. Héctor Manuel López H., quien ha sabido ser un auténtico Maestro. Por su consejo y orientación, que tanto en lo profesional como en lo humano ha contribuido a formar tantas generaciones.

A mis amigos, que también han contribuido con algo a mi desarrollo y formación. - Con mi sincera amistad.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE :	Ing. Héctor M. López Herrera
VOCAL :	Ing. Enrique García Galeano
SECRETARIO :	Ing. Rubén Berra García Coss
1er. SUPLENTE :	Ing. Alejandro Garduño Sánchez
2do. SUPLENTE :	Ing. Guillermo Rendón Blanco.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

"Cervecería Musashino de Suntory, Ltd."

Kanagawa-Ken, Japón

CONTENIDO

	Página.
INTRODUCCION	1
Tipos de Turbidez	8
Composición Química de los Precipitados	9
Propiedades Físicas	14
Coloides y Fenómenos Coloidales.	19
CAPITULO I	
EXPERIMENTAL	28
CAPITULO II	
DATOS EXPERIMENTALES	37
CAPITULO III	
CONCLUSIONES	63
APENDICE	70
BIBLIOGRAFIA	87
REFERENCIAS	91

INTRODUCCION

La cerveza no sólo debe estar en perfectas condiciones al terminar su proceso de elaboración, sino también debe mantener sus cualidades hasta que es consumida. Es bien conocido que el color y el aroma pueden alterarse, pero el problema más grave que confronta el fabricante es mantener su brillante apariencia hasta que es servida y consumida. El consumidor busca una bebida espumosa, chispeante, clara y prefiere aquella que tiene buen aroma y características de claridad y habilidad para producir espumas satisfactorias. La "duración o vida en almacén" (shelf life) requerida en una cerveza varía mucho de un país a otro. En algunos países con un alto índice de consumo una "vida de almacenamiento" de un mes es suficiente; en cambio, cerveza para exportación debería tener una vida en almacén superior a 12 meses. Cervezas que tienen que ser almacenadas por períodos mayores a un mes, son generalmente pasteurizadas o filtradas a través de filtros de membrana para prevenir la descomposición biológica, la cual es una de las más rápidas y potentes causas de deterioro. Sin embargo la descomposición biológica no es la única causa de daño y la TURBIDEZ COLOIDAL es con mucho de mayor consecuencia en

la calidad de la cerveza.

Tres diferentes clases de turbidez pueden distinguirse en cervezas :

TURBIDEZ BIOLÓGICA, debida a la acción de microorganismos.

TURBIDEZ COLOIDAL, debida a la coagulación de coloides.

TURBIDEZ QUÍMICA, provocada por la acción de varios agentes químicos.

La turbidez biológica es debida a infección por microorganismos y generalmente se limita a la levadura del fabricante, levaduras salvajes o silvestres y a varios organismos lácticos. Un gran número de bacterias son incapaces de crecer en cerveza normal debido al bajo pH, al contenido alcohólico, a la baja temperatura, a las condiciones anaeróbicas y al poder antiséptico de las sustancias amargas derivadas del lúpulo. La mejor medida para evitar la turbidez biológica en la cerveza es guardar atención estricta a la higiene en la planta. Algunos antisépticos como anhídrido sulfuroso (SO_2) son añadidos algunas veces a la cerveza para asegurar estabilidad biológica; sin embargo, su uso está restringido en casi todos los países y la adición de muchos antisépticos está prohibida, debido a que tales prácticas podrían tener efectos dañinos sobre la salud de los consumidores.

La turbidez química en la cerveza es mucho más rara que otros tipos de turbidez. Los almidones enturbian la cerveza, pero éste problema sola

mente ocurre en mostos inapropiadamente sacarificados. La presencia de ciertos metales puede inducir turbidez. La turbidez química más característica se debe a cristales de oxalato de calcio. Formaldehído y sales cuaternarias de amonio pueden ser introducidas accidentalmente en la cerveza cuando el equipo es esterilizado con estos antisépticos y enturbiarla, pero ésto depende de su sensibilidad a estas sustancias.

La turbidez coloidal es la más frecuente y molesta de las turbideces en cerveza. Grandes esfuerzos han sido hechos estos últimos años para entender su composición y el mecanismo de su formación con el objeto de proveer medios para atacarla y erradicarla. En este estudio nos referiremos a la turbidez coloidal diciendo simplemente "turbidez", dado que es la única que interesa a nuestros fines.

En términos generales hay tres posibles medidas para la reducción de turbidez (coloidal) en la cerveza.

1o.- La selección de materias primas apropiadas y los procesos de molienda y cocimiento pueden ser adaptados para dar una concentración mínima de proteína de alto peso molecular y agentes tánicos en la cerveza. Además, evitando la aereación de la cerveza terminada ayudaremos también a nuestro propósito, evitando oxidaciones. Sin embargo, este tipo de control puede ser aplicado solamente hasta un cierto límite si no se desean cambiar las características intrínsecas de la cerveza.

2o.- Cerveza producida por un proceso normal puede ser tratada con adsorbentes más o menos específicos para remover componentes peligrosos. Pero debido a la falta de especificidad en ambos, reactivos y adsorbentes, - - otras características deseables a menudo tienen que sacrificarse para lograr su estabilidad por estos medios.

3o.- Por último, se podría tratar de modificar y controlar la secuencia de reacciones que producen turbidez de tal manera que ésta sea producida en un tiempo conveniente durante la vida de la cerveza. En este caso está el tratamiento con enzimas proteolíticas, con el cual la aparición de turbidez es retrasada durante un período en el cual la cerveza es normalmente consumida. Las enzimas digieren y solubilizan algunas de las sustancias proteicas de la - - cerveza que tienden a precipitar cuando la cerveza es enfriada. Alternativamente, todo este proceso puede ser acelerado de tal manera que cuando la turbidez esté por formarse, lo haga antes de que la cerveza salga de la fábrica - - donde puede ser filtrada y separada. Esto puede efectuarse mediante el uso de más largos períodos de almacenamiento o bajas temperaturas durante la maduración de la cerveza, o por la adición de precipitantes de componentes causantes de turbidez.

En resumen, existen tres diferentes clases de estabilizadores :

ADSORBENTES

PREPARACIONES ENZIMATICAS

PRECIPITANTES DE PROTEINAS

En estabilización de cerveza con adsorbentes varias sustancias se -- han venido usando durante los años recientes. Tal es el caso de una Sílica -- Gel especialmente preparada (Stabiquick), la cual remueve principalmente -- péptidos responsables de formar turbidez; de poliamidas como nylon, y la aún -- más efectiva polivinil-pirrolidona (PVP), la cual principalmente adsorbe poli -- fenoles; y bentonitas.

El uso de estabilizadores enzimáticos, introducido originalmente por Leo Wallerstein (38) hace cerca de 60 años fue pronto ampliamente adoptado y por muchos años ha sido regularmente y casi universalmente practicado en cervecerías de los Estados Unidos. Su uso en cervecerías europeas en una escala -- extensiva se desarrolló lentamente hasta años recientes. En 1940 Enders y cola -- boradores (15) investigaron la efectividad de papaína, pepsina, bromelina y -- enzimas proteolíticas de la levadura. Moufang (27) encontró que la adición -- de un extracto cocido de células de levadura a la cerveza tierna o verde, re -- dujo la tendencia a enturbiarse la cerveza, y Lamsen (22) sugirió el congela -- miento de suspensiones de levadura para romper las paredes celulares, mezclan -- do el producto con el grueso de la cerveza en almacenamiento. I.M. Stone -- descubrió en 1968 que un hasta entonces desconocido sistema estabilizador -- a prueba de frío está presente en ciertos extractos obtenidos durante el creci -- miento de ciertos microorganismos fungosos, por ejemplo hongos. Los extrac --

tos contienen una variedad de diferentes tipos de enzimas como pectinasas, hemicelulasas, amilasas y otros sistemas enzimáticos.

Se ha sabido que el tanino que se disuelve de los corchos de las tapas produce turbidez en la cerveza, un resultado que se podría esperar dado que el tanino precipita proteínas; esta propiedad se ha hecho provechosa en cervecería, utilizando tanino para provocar la precipitación de la proteína causante de turbidez y su filtración posterior.

Woof y Pierce (39) propusieron en 1967 que el uso de un complejo proteína-flavonoide adecuadamente añadido en proporción a la cerveza tratada, podría ser usado comercialmente como un método para estabilizar cerveza evitando su enturbiamiento. La albúmina de sangre animal ha sido también propuesta como un agente coagulante y precipitante de componentes que inducen turbidez. Hughes patentó la adición de clara de huevo a la cerveza para incrementar su estabilidad.

En adición a las tres anteriores clases de estabilizadores podríamos también mencionar el uso de agentes reductores para prevenir oxidación, y la subsecuente formación de turbidez. Reductonas naturales están presentes en la cerveza y existen también muchas otras sustancias reductoras como polifenoles, proteínas, antocianógenos, melanoidinas, carbohidratos, etc. Así mismo, aditivos artificiales de cervecería con propiedades reductoras como anhídrido sulfuroso, metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, ácido D-glucoascórbico o áci

do norhidro guarético son usados algunas veces, y la eliminación del dañino oxígeno del aire en el cuello de la botella es realizado mucho más rápidamente, pero la formación de turbidez aparece mucho más pronto que si la cerveza es embotellada con completa exclusión de aire. El efecto del ácido ascórbico en la fijación de oxígeno en la cerveza fue también estudiado por el Prof. E.-Urion, L. Chapon, Mme. S. Chapon y M. Metche de Francia (35). Ellos -- encontraron que el ácido ascórbico solamente adsorbía una parte del oxígeno -- en una botella de cerveza y el resto era adsorbido en una reacción gemela con otras sustancias, sustancias tan diferentes como los varios alcoholes, azúcares y taninos. Si los alcoholes y azúcares fueron oxidados, la esperada protección de la cerveza por ácido ascórbico no fue obtenida.

En algunas cervecerías es usado ahora un moderno tratamiento combinado con enzimas proteolíticas y agentes reductores con el objeto de modificar el proceso proteolítico, para asegurar el máximo de eficiencia del tratamiento en el tiempo disponible, bajo las condiciones más económicas; pero para obtener esto es necesario entender bien el mecanismo completo y el papel preciso de enzimas y activadores. Por ejemplo los Sres. R. Scriban, M. Stienne y B. Strobbel (31), encontraron que el ácido ascórbico ejerce una acción protectora sobre ciertas enzimas, especialmente papaína, pero otras enzimas -- (como la rozima P₁₁ de origen fungoso) son inhibidas en su presencia. El metabisulfito de sodio induce una significativa activación de la papaína, ficina,

y P_{II}; Pero un contacto prolongado con agentes reductores no beneficia a la fi
cina ni a la P_{II}. Etanol al 5% en volumen inhibe ligeramente a todas las en-
zimas.

TIPOS DE TURBIDEZ.

Existen varios tipos de turbidez no biológica y han sido clasificados de
de varias maneras, una de las cuales los incluye dentro de Turbidez proteíni-
ca, Turbidez de oxalatos, Turbidez de metales, Turbidez de carbohidratos y —
Turbidez de antisépticos. Otra clasificación comprende : TURBIDEZ EN ---
FRIO y TURBIDEZ PERMANENTE o IRREVERSIBLE y han sido definidas por el -
HAZE GROUP de la European Brewery Convention como sigue :

"Si una cerveza bien filtrada y clara es almacenada a 20°C perma-
necerá siendo clara por algún tiempo. Si es enfriada a 0°C por cuatro horas, -
continuará siendo clara. Después de algún tiempo (digamos dos a cuatro semana
nas) continuará siendo clara a 20°C, pero si es enfriada a 0°C se formará un -
precipitado nebuloso, el cual es reversible, es decir, se redisolverá en la cer-
veza cuando ésta sea tibiada nuevamente a 20°C. Este precipitado reversible
es llamado TURBIO EN FRIO (Chill haze). Esta construido principalmente de de
polipéptidos y polifenoles. A medida que el tiempo avanza se va formando un
precipitado, el cual es insoluble a 20°C; este es llamado TURBIO PERMANENTE. -
Si una cerveza que contiene turbio permanente es enfriada a 0°C se obtiene —

una mezcla de turbio en frío y turbio permanente, y a ésto se llama TURBIO — TOTAL.

COMPOSICION QUIMICA DE LOS PRECIPITADOS

Los constituyentes de los precipitados que producen ambos, "turbio-en frío" y "turbio permanente" son aceptados generalmente como proteínas, polifenoles, carbohidratos y metales. El contenido proteico del turbio en frío — probablemente varíe de muestra a muestra. Valores que varían de 40 a 76% — han sido reportados; por ejemplo, algunos datos obtenidos por varios autores — son :

Hartong (18)	76%
Mendlík (26)	65%
Lhoest, Lontie y de Clerk (24)	69%
Allouf, Munier y Macheboeuf (1)	42%
Bengough y Harris (2)	40%
Ljungdahl y Sandegren (25)	45-68%
Waldschmidt y Leitz (37)	50-75%

De estos valores, solamente los resultados de Bengough y Harris son para "ale", todos los demás se refieren a cerveza clara y ligera (lager beer). Recientemente varios autores han dirigido sus esfuerzos a estudiar el papel de — diferentes proteínas de la cerveza en la formación de turbidez, usando méto—

dos como fraccionación por cromatografía y análisis inmunoeléctroforético. -- Así, las proteínas solubles en precipitados de cervezas de diferentes orígenes, ha sido demostrado que son inmunológicamente idénticas. Todo parece indicar que no hay proteínas específicas causantes de turbidez, sino que toda clase de proteínas pueden participar en su formación.

Ljungdahl y Sandegren (25) reportaron un contenido de azufre de cerca de 1 a 2% en la proteína. Biserte y Scriban (3) demostraron también la presencia de aminoácidos con algún contenido de azufre. Bengough y Harris (2), y Harris y Ricketts (19) encontraron de 40 a 67% de proteína heterogénea en turbio permanente. Debaisieux (14) encontró 50% y Mendlik (26) cita algunas evidencias de la presencia de puentes de disulfuro enlazados en la proteína. Cerutti (9) refiere el desarrollo de turbio permanente a la formación de puentes de disulfuro entre aminoácidos que contiene grupos sulfhidridos a lo largo de las cadenas de proteínas. Se sabe que el cobre cataliza esta reacción.

El segundo mayor constituyente del turbio en frío es material del grupo de los taninos (polifenoles). Mendlik (26) y Sandegren (29) encontraron 35% de taninos y al hacer estudios espectrofotométricos los relacionaron a los que se derivan de la cebada. Harris et al. (2 y 17) estimaron que el contenido de taninos de precipitados de ale que ellos examinaron fue de 20-25%, representando taninos condensados a partir de la malta y el lúpulo, como fue --

demostrado cromatográficamente. Estos fueron estudiados por miembros del -- Brewing Industry Research Foundation y se encontró que leucodelphinidina y leu-- cocianidina se encuentran tanto en malta y lúpulo como en precipitados que -- enturbian la cerveza. Estos estudios llevaron a la introducción de nylon co-- mo un adsorbente selectivo para antocianógenos, esas sustancias que se trans-- forman en materiales coloreados al ser tratados con ácidos minerales. Así, el -- contenido de taninos en el turbio en frío, varía de 17 a 55% e incluye polife-- noles tanto de la malta como del lúpulo. También en el precipitado definido -- como turbio permanente existen polifenoles presentes contribuyendo en más -- del 55%, derivados de ambos, malta y lúpulo.

Los análisis de precipitados turbios efectuados por el Haze Group de la EBC después del congreso de Bruselas (13) demostraron que todas las mues-- tras analizadas contenían polifenoles y encontraron que el importante grupo -- conocido como los antocianógenos constituye entre 20 y 30% del precipitado y está presente en forma compleja. Ellos también encontraron que otros polife-- noles están presentes, notablemente catequinas y materiales relacionados a la -- lignina. La cerveza por sí misma contiene una reserva potencial de compues-- tos formadores de turbidez en variados grados de polimerización, siendo los -- más polimerizados los que provocan turbidez más rápidamente.

Se han reportado contenidos de carbohidratos de 3 al 13% incluyen-- do residuos de hexosa y pentosa. Lhoest et al. reportaron contenidos de ribo--

sa, arabinosa y xilosa. (24)

Allouf et al (1) encontraron glucosa en un hidrolisato. Bengough y Harris (2) reportaron de 2 a 4% de carbohidratos, y Ljungdahl y Sandegren (25) encontraron 4 a 6%, de lo cual la mitad fue glucosa, aunque también se encontró manosa. Waldschmidt y Leitz (37) encontraron 7 a 13% de carbohidratos consistiendo de residuos de glucosa, arabinosa y xilosa. En precipitados de turbio permanente se han reportado contenidos de pentosanos y carbohidratos de 3% o mayores.

M. Nummi, M. Loisa y T.M. Enari de Panimolaboratorio de Helsinki, Finlandia, presentaron al congreso de la E.B.C. en Interlaken en 1969, un trabajo realizado sobre fraccionación de compuestos causantes de turbidez en la cerveza. Ellos prepararon cuatro fracciones a partir de proteína obtenida de cerveza comercial y secada por congelación y eluyéndolas en una columna DEAE-Celulosa. Las muestras de proteína fueron hidrolizadas a 110°F con ácido clorhídrico 6N en tubos sellados durante veinte horas. Luego analizaron los aminoácidos de los hidrolisatos obtenidos con un Cromatógrafo para Líquidos Hitachi Perkin-Elmer 034 usando el método de Ligand (complejo de zinc) para hidrolisatos de proteína. Los resultados de los análisis cromatográficos fueron :

TABLA 1

Composición en aminoácidos de fracciones proteicas expresadas en fracción -- mol de los aminoácidos.

Aminoácido :	Fracción de la cerveza No. :			
	I	II	III	IV
Glicina	0.123	0.150	0.091	0.105
Alanina	0.064	0.052	0.076	0.096
Valina	0.042	0.042	0.067	0.065
Leucina	0.041	0.035	0.118	0.057
Isoleucina	-	0.025	0.040	0.030
Serina	0.080	0.096	0.073	0.069
Treonina	0.052	0.065	0.046	0.048
Metionina	-	-	0.035	0.046
Fenilalanina	0.027	0.017	0.030	0.019
Tirosina	0.027	0.031	0.019	0.023
Prolina	0.164	0.142	0.067	0.066
Acido aspártico	0.057	0.048	0.096	0.120
Acido glutámico	0.268	0.243	0.135	0.158
Lisina	0.031	0.023	0.040	0.037
Arginina	0.024	0.016	0.034	0.029
Histidina	-	0.015	0.020	0.014
Amoniaco	0.482	0.264	0.111	0.108

Otros componentes que han sido encontrados en precipitados turbios son sílice y metales pesados (23). Bengough y Harris (2) reportaron que cenizas de precipitados contuvieron una proporción más alta de metales pesados, -

notablemente cobre, aluminio y fierro, que la contenida en las cenizas de la cerveza misma. Una porción considerable de los metales presentes en la cerveza es entonces removida en los precipitados, particularmente en cervezas viejas. Sin embargo N. S. Curtis reportó en el congreso de la E.B.C. de Estocolmo en 1965 (13) que los métodos de análisis usados para calcular la composición de metales en los precipitados no eran confiables dado que había existido una gran falta de acuerdo en los resultados, no solamente entre diferentes laboratorios, sino aún entre determinaciones realizadas en el mismo laboratorio. Pero a pesar de ésto - según Curtis - estas variaciones no habían invalidado las conclusiones derivadas de los resultados.

Los precipitados que producen turbidez contienen menos de 1% de metales, de los cuales la mayor parte corresponde al cobre, con fierro segundo en cantidad. El trabajo del Prof. Chapon y colaboradores ha ilustrado el papel que estos dos metales juegan en la formación de turbidez.

PROPIEDADES FISICAS.

El precipitado definido como "turbio en frío" (chill haze) cuando está recién preparado es un material de color grisáceo que se oscurece rápidamente cuando es expuesto al oxígeno, mientras que el precipitado llamado "turbio permanente" es oscuro, de color café rojizo a café chocolate. El primero generalmente es considerado como un coagel que se muestra como una tur

bidez en la cerveza a bajas temperaturas (0°C). Su naturaleza coloidal es generalmente reconocida, y su presencia durante el enfriamiento se ha atribuido a coagulación (coacervation). Las propiedades de los coloides de la cerveza han sido estudiados por Charin y Malzew (11), quienes demostraron que estos coloides son hidrofílicos en naturaleza y tienen una alta actividad superficial, una carga positiva con respecto al agua, una densidad de 1.596 g/ml. y un índice de refracción similar al de las dextrinas. Mendlik (26) consideró el turbio en frío como una combinación no compacta entre material nitrogenoso (proteínico) y no nitrogenoso (polifenólico), separable reversiblemente por diálisis y soluble en acetona al 50%. Esta combinación no compacta puede ser una forma de asociación por puentes de hidrógeno entre grupos imino y carbonilo e hidroxilo entre las moléculas de las dos mitades.

Rene Scriban (30) establece el peso molecular de la mitad proteínica entre 20,000 y 30,000 g. mol, en buen acuerdo con el valor de Svedberg de 40,000 g.mol (calculado en ultracentrifuga) citado por Wührer (40).

El turbio permanente también se encuentra en estado coloidal y cargado positivamente, es hidrofílico en naturaleza también. S. Claesson y E. Sandegren (12) estudiaron turbideces en cervezas de diferente origen, usando métodos como fraccionación y ultracentrifugación de precipitados redisueltos aislados en experimentos a gran escala en la ausencia de oxígeno. Análisis con microscopio electrónico de las partículas de los precipitados, y medicio-

nes de alta precisión de dispersión de la luz en cerveza usando un instrumento especialmente diseñado con un alto poder resolvente angular nada usual. Encontraron que dado el cambio en composición del precipitado llamado turbio en frío en cervezas de diferentes edades, se puede inferir que existe una reserva de sustancias de bajo peso molecular (aprox. 10,000 g. mol) a partir de las cuales se forma la mayor parte del precipitado del turbio en frío, a medida que la cerveza se envejece. La forma de las partículas de este precipitado (las que son formadas cuando la cerveza se enfría por algunas horas), varía mucho con la edad de la cerveza y la cantidad total de turbio formada. Como se pueden ver al microscopio electrónico, estas partículas son pequeñas y completamente irregulares en cervezas jóvenes. A medida que la cerveza es más vieja las partículas se van agrandando en tamaño y a menudo se hacen más uniformes en forma. En muchas cervezas se forman partículas muy grandes y casi esféricas (diám. aprox. 0.5 micrones). En algunas cervezas éstas son precedidas por partículas cerca de diez veces menores y también casi esféricas en forma. El mecanismo exacto causante de esta sorprendente variación en tamaño y forma de las partículas no es todavía conocido, pero parece estar asociado un sistema de auto-asociación, y la razón por la cual las partículas son tan uniformes en tamaño parece estar determinada por requerimientos de cinética más bien que por razones de equilibrio. Entonces los precipitados del turbio en frío y turbio permanente son muy diferentes en sus propiedades fisicoquímicas.

También el precipitado del turbio en frío de una cerveza esterilizada es diferente al de una cerveza normal. Por consiguiente, la estabilización de la cerveza no es solamente una retardación de un proceso químico, sino también una modificación que involucra muy diferentes mecanismos fisicoquímicos para el crecimiento de la partícula y su precipitación.

De lo anteriormente considerado, las porciones proteínicas y polihidroxifenólica han sido detectadas como las principales componentes de los precipitados de los turbios, y en particular de la implicación de los antocianógenos como los más activos componentes fenólicos se llega a la conclusión de -- que su eliminación de la cerveza causará un marcado incremento de la "vida en almacén" o "shelf life". Para cervezas con un contenido natural bajo de antocianógenos la vida en almacén puede ser buena a pesar de tener pobres características de oxidación. La eliminación o degradación de proteínas también mejora la vida en almacén de la cerveza.

Entonces, este trabajo va a ser enfocado al estudio de los efectos reales de algunos estabilizadores sobre las propiedades de una cerveza específica : la producida en esta cervecería, con objeto de determinar si el estabilizador que se usa actualmente - ácido tánico - continuará en uso, o si sería -- conveniente cambiarlo por otro estabilizador de los aquí probados si la estabilidad de la cerveza es mejorada. Además del efecto sobre la Estabilidad de la Cerveza, el efecto sobre otras propiedades como Contenido de Sustancias Amar

gas, Polifenoles, pH, Color, Extracto Aparente, Nitrógeno Total, Fracción C y Adhesión de la Espuma serán también determinadas con objeto de evaluar el efecto de cada estabilizador sobre la calidad de la cerveza.

La Predicción de la Estabilidad Coloidal es una parte integral del control de calidad rutinario. Los métodos para predecir estabilidad coloidal tienen una importancia adicional cuando se usan procesos especiales de estabilización para producir cerveza con una "vida en almacén" prolongada, debido a que así se puede contar con un chequeo de rutina de la eficiencia de la estabilización.

Algunos métodos de predicción se basan en mediciones de la cantidad de polifenoles causantes de turbidez en la cerveza. Hay varios métodos más específicos para estimar grupos más particulares de polifenoles, y entre ellos la determinación de los antocianógenos es quizá la más conocida. La prueba del ácido gálico-tánico propuesta por Chapon (10), está basada en el hecho de que aquellas proteínas que muestran más tendencia a formar un complejo insoluble que precipita cuando se agrega ácido gálico-tánico a bajas concentraciones, comprende la fracción causante de turbidez más importante en la cerveza. La turbidez producida cuando la concentración de ácido gálico-tánico alcanza 5 mg. por litro, es medida en un medidor HELM, y el resultado se obtiene sustrayendo este valor de la medida de la turbidez inicial de la cerveza sin tratamiento. Con objeto de predecir la "vida en almacén" de

la cerveza se debería checar también su estado de oxidación. Gray y Stone (16) han elaborado un método para estimar el poder reductor de la cerveza en el frío siguiendo la velocidad de decoloración de 2-6 dicloro bencenona indofenol. Esta medida es llamada Valor de la Prueba Indicadora del Tiempo (I.T.T.: Indicator Time Test) de la cerveza. La prueba del sulfato de cinconina propuesta por Thompson y Forward (33), la prueba del límite de precipitación de sulfato de amonio saturado de Hartong y Enders (21), la prueba del ácido tricloroacético propuesta por Bishop (4 y 6), la prueba del sulfato de magnesio sugerida por Van Roey (36), la del ácido fosfotungsténico y muchas otras pueden ser usadas, pero el camino que parece dar la mejor aproximación a la "vida en almacén" real de la cerveza es combinando los resultados de varias de las pruebas enumeradas con "pruebas de forzamiento" (forcing tests) en las cuales se usan condiciones rigurosas para provocar la rápida aparición de turbidez.

COLOIDES Y FENOMENOS COLOIDALES

Los mecanismos de formación de los enturbiamientos en cerveza así como en vinos y otras bebidas y los procedimientos que permiten evitarlos, pertenecen en gran parte a la química de los coloides. En efecto, los mecanismos de formación de turbideces suponen con frecuencia dos períodos: si aquellas dan comienzo con mecanismos químicos (oxidación del hierro, reducción-

del cobre, modificación de la materia colorante por el tiempo o de las materias proteicas por los taninos, etc.) son coloides que permanecen primero en solución límpida coloidal y luego flocculan por diversos factores y ocasionan enturbiamientos.

Revisemos ligeramente algunos conceptos sobre coloides y soluciones coloidales :

Existen varias clases de soluciones líquido-sólido que pudieran agruparse en :

	Moleculares	Límpidas, con partículas invisibles al ultramicroscopio que atraviesan los ultrafiltros, como membranas de Colodión.
Soluciones	Iónicas	Agrupaciones o complejos de moléculas.- Soluciones límpidas a la observación ordinaria, pero turbias ante una iluminación lateral intensa;
	Coloidales	Partículas visibles al ultramicroscopio pero no al microscopio, que atraviesan los filtros ordinarios pero no los ultrafiltros.- Diámetro de las partículas: 1-100 micrones.

Existen también Suspensiones que son turbias, sus partículas son visibles al microscopio y no atraviesan la mayoría de los filtros ordinarios.

Por ahora nos interesan las soluciones coloidales, así que definire--

mos cómo están compuestas éstas. Las partículas coloidales son complejos moleculares llamados "Micelas", que están rodeados de una capa de líquido de la solución, llamado "líquido intermicelar". Entonces se puede hablar de dos fases :

- Fase continua (líquido)
- Fase dispersa (partículas)

con una interfase entre ambas. Entonces, desde este punto de vista una solución coloidal es heterogénea, aunque la fase dispersa se halla finamente dividida.

Las micelas no pueden atravesar ciertas clases de filtros (ultrafiltros) como pergamino, vejiga, celofán, colodión, etc. Las partículas coloidales o micelas que se encuentran por ejemplo en vinos, son : colorantes, pectinas, gomas, prótidos, fosfato férrico, sulfuro de cobre, etc. Algunas de éstas se encuentran también presentes en cerveza.

La dimensión y composición de las micelas son variables de una solución a otra y dependen de la composición del líquido que las baña; por adsorción fijan iones o moléculas de líquido según ciertas leyes de repartición; cuando por un procedimiento físico o una reacción química se les extrae de su solución dan precipitados amorfos en los que ni al microscopio se distingue una estructura regular. Presentan el fenómeno llamado "movimiento browniano", -- que resulta del "bombardeo" de las moléculas próximas, pero como es más o --

menos atenuado su difusión es muy lenta, e incluso su repartición en el seno — de la solución puede tender a perder uniformidad por influencia de la atracción gravitacional. El movimiento browniano es visible al ultramicroscopio.

Las soluciones coloidales presentan el "fenómeno de Tyndall", que se presenta al hacer atravesar la solución por un haz luminoso intenso, perpendicular a la dirección de observación; la trayectoria del haz aparece en forma de una estela opalescente, resultante de la difusión de una pequeña fracción — de la luz por cada una de las partículas que ésta hiere, en tanto que el mismo haz resulta invisible al atravesar una solución molecular o iónica que contiene cristaloides. Las temperaturas de ebullición y congelación, la conductividad eléctrica y la presión de vapor de soluciones coloidales — incluso muy concentradas — son muy semejantes a las del agua destilada, a la inversa de las soluciones de cristaloides (Leyes de Raoult). En general las soluciones coloidales fallan con casi todas las leyes ordinarias de las soluciones. Presentan dos propiedades interesantes en el campo de bebidas :

- Heterogeneidad Óptica, que se traduce por el aspecto más o menos turbio de las soluciones.
- Inestabilidad, que tiene por consecuencia el aumento de la heterogeneidad, el desarrollo de enturbiamientos y la formación de depósitos.

Existen grandes diferencias entre diversas soluciones coloidales des-

de el punto de vista de la limpidez. La intensidad del enturbiamiento es tanto mayor :

- 1o.) cuanto mayor cantidad de sustancia coloidal exista;
- 2o.) cuanto menos diseminada se halle y mayores sean las partículas (dentro de ciertos límites), y
- 3o.) Cuanto mayor sea el índice de refracción de la solución coloidal.

Quando en una solución coloidal se aglomeran las partículas (fenómeno de floculación), de tal suerte que sus dimensiones aumentan mientras que su número disminuye, la cantidad de luz difusa aumenta, ya que, es proporcional al número N de partículas y al cuadrado de su volumen V , o sea a NV^2 ; durante la floculación el producto NV , que representa el volumen de sustancias es constante; la cantidad de luz difusa es pues proporcional al volumen V de las partículas, es decir, se halla en razón inversa de su número. La solución coloidal que podría ser límpida a la observación ordinaria, se va enturbando de manera cada vez más notable; cuando las partículas exceden cierta dimensión, del orden de 0.1 micra, la solución coloidal se convierte en verdadera suspensión, cuya evolución puede seguir el mismo proceso. Para otra magnitud determinada, superior a la precedente y colocada ya en la escala de las suspensiones, el enturbiamiento alcanza un máximo más allá del cual todo aumento de dimensión trae aparejada una disminución del enturbiamiento y pos

teriormente una sedimentación de las partículas aglomeradas.

Por otra parte, la intensidad de la luz difusa es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda de la luz incidente; entonces, los rayos de luz de onda corta (violetas y azules) son reflejados con mayor intensidad que los demás, y por consiguiente una solución turbia incolora aparece ligeramente azul vista por reflexión. Por ejemplo, en los vinos blancos y cervezas el color amarillo propio, mezclado con el azul reflejado, dan una coloración verdosa.

La "floculación" o precipitación de las partículas coloidales puede definirse como la separación entre el coloide y el líquido. Esta separación tiende a hacerse completa; el coloide se sale completamente de la fase líquida y forma "copos" de aspectos muy diversos que constituyen el "gel". La estabilidad de una solución coloidal es atribuida principalmente a la propiedad de las partículas de estar cargadas de electricidad; de una manera esquemática tales cargas eléctricas ejercen entre partículas próximas fuerzas de repulsión que les impiden ponerse en contacto, a pesar de las fuerzas de atracción y cohesión que siempre existen entre partículas contiguas, y a pesar de la agitación incesante del movimiento browniano que tiende a facilitar los encuentros. Esta misma agitación es por el contrario, un factor importante de la estabilidad, al impedir a las partículas que se sedimenten en el fondo, imprimiéndoles la tendencia a difundirse por todo el volumen del líquido.

Finalmente, un tercer factor que impide la sedimentación es la extrema pequeñez de las partículas, que poseen una superficie muy grande en relación con su peso, de lo que resulta un rozamiento considerable en su caída (tanto mayor cuanto más elevada sea la viscosidad del líquido). En efecto, de acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de caída de los cuerpos es proporcional al cuadrado de su radio; así, una bola de vidrio de un milímetro de diámetro recorrería en el agua un centímetro en 0.05 segundos; una bola de 0.001 milímetros (1 micra) recorrería un centímetro en 14 horas, y una esfera de 0.01 micra recorrería un centímetro en 16 años. Se comprende pues, que para las partículas muy pequeñas la velocidad de caída llega a ser tan lenta -- que es compensada por el movimiento browniano o por los más insignificantes movimientos de convección en la masa del líquido.

El origen de la carga eléctrica de las partículas coloidales puede residir, o bien en una fijación o adsorción de moléculas exteriores sobre su superficie que les comunican una carga eléctrica, o puede deberse a una disociación iónica de la micela del coloide, es decir, la carga es de origen químico. Este es el caso de los próticos.

Existen algunos coloides que al estar en solución junto con un coloide inestable, el primero comunica su estabilidad al segundo, el cual se torna mucho más resistente a la acción precipitante de los electrólitos. Se le llama "coloide protector", y este efecto se le atribuye al "revestimiento" de las par-

fículus del coloide inestable por el coloide estable. Tal revestimiento se opone a la aglutinación y al aumento de volumen de las partículas del coloide -- inestable. Es muy probable que ocurra una neutralización entre las cargas de ambos coloides. Tal es el caso del "enturbiamiento fosfatoférrico" o "enturbiamiento blanco" de los vinos blancos. Al ser expuestos a la luz, el hierro -- pasa al estado férrico, formándose fosfato férrico, sustancia muy poco soluble -- que a una cierta concentración pasa de solución molecular a solución coloi -- dal. Sin embargo, las partículas coloidales no enturbian necesariamente al vi -- no, ya que tienden a ser tan pequeñas que no reflejan apreciablemente la luz -- incidente; el fosfato férrico se halla pues en solución coloidal, pero ésta pue -- de ser tan perfectamente límpida como una solución molecular. Si a una solu -- ción que contenga los ácidos orgánicos del vino ($\text{pH} = 3$), alcohol y 0.5 g. -- por litro de ácido fosfórico, igual que el vino, y a la que se ha agregado 25 -- mg. de hierro férrico el cual por sí mismo no había producido ninguna turbidez a pesar de encontrarse en estado coloidal, se agregaran cationes metálicos -- (0.2 g. de calcio, 1 g. de potasio o algún otro catión), se enturbia sensible -- mente. Idénticas condiciones se tienen en un vino y sin embargo no se produ -- ce enturbiamiento. Las gomas y materiales mucilaginosos que existen natural -- mente en los vinos, o son añadidas con algún fin se oponen a la floculación -- del fosfato férrico con los cationes metálicos y a la consecuente formación de -- turbidez, actuando como coloides protectores al englobar las partículas coloi --

dales férricas. La precipitación total de fosfato férrico puede obtenerse por la adición de un prótido coagulable (gelatina, ictiocola, etc.), y tal "encolado" de un vino afecto de "enturbiamiento blanco" elimina en general más hierro — que una filtración ordinaria. Es por esta razón que el "encolado" es una práctica común en Enología.

En la cerveza se encuentran también presentes algunos coloides proectores, aunque en menor cantidad que en los vinos.

CAPITULO I

EXPERIMENTAL .

Todas las pruebas fueron hechas con cerveza elaborada en escala industrial en esta cervecería. La cerveza verde original fue tomada de un fermentador y separado en 11 muestras individuales de 5.6 litros cada una, dentro de frascos transparentes (matraces erlenmeyer) previamente esterilizados. Una muestra adicional de cerveza verde fue analizada simultáneamente con el objeto de saber el estado inicial de la cerveza para posterior comparación. Luego se añadieron los respectivos estabilizadores a cada una de las muestras y se agregó también a cada una de ellas vitamina C (ácido ascórbico) en una concentración de 20 p.p.m. con objeto de ayudar a la acción enzimática y evitar un poco la oxidación de la cerveza.

Después de añadir los estabilizadores todas las muestras fueron almacenadas en la Bodega de Lúpulos donde la temperatura es de 0°C, igual a la de los tanques de maduración (lagering tanks) de la planta. Se mantuvieron durante 7 días en reposo en esa bodega, en ausencia casi total de luz, para permitir la acción de los estabilizadores. Después de este período se transportaron las muestras al laboratorio donde fueron filtradas a través de "diatomá-

ceas calcinadas" (Celite), y después fueron embotelladas en botellas claras - de 633 ml. Ocho botellas de cada diferente muestra fueron llenadas en la siguiente forma, de acuerdo con los análisis por realizar :

Para Análisis Organolépticos	1 Botella	600 ml.
Para Análisis Químicos	2 Botellas	630 ml.
Para Estabilidad de la espuma	1 Botella	630 ml.
Para Prueba de la Formalina	2 Botellas	580 ml.
Para Prueba de Forzamiento	2 Botellas	630 ml.

Después de ser embotelladas las muestras todas las pruebas fueron iniciadas, incluyendo las de Predicción de la "vida en almacén". Los estabilizadores probados y las concentraciones adoptadas fueron :

<u>Estabilizador</u>	<u>Concentración (q/H1)</u>
1.- COLUPULIN	5
2.- PAPAINA	1
3.- PEPSINA	4
4.- BROMELINA	1
5.- ACIDO TANICO	7
6.- BENTONITA	100
7.- NYLON 66 (D.S. 3850)	20
8.- POLIVINILPIRROLIDONA (POLYCLAR AT)	20
9.- CARBON ACTIVADO	100
10.- SILICA GEL (STABIQUICK)	100
11.- TESTIGO O CONTROL	-

Las concentraciones adoptadas fueron escogidas siguiendo proporciones corrientes descritas en la literatura y tomando en cuenta el criterio de técnicas

nicos de esta Cervecería y miembros del Laboratorio Central de Investigación - de Suntory, Ltd. de Osaka, Japón (SUNTORY OSAKA KENKYU-SHO).

Se tuvo mucha atención y cuidado para asegurar que todas las muestras fueran tratadas bajo idénticas condiciones siempre, con objeto de evitar efectos extraños que desvirtuaran los resultados. Asimismo se procuró trabajar siempre dentro de las más estrictas reglas de higiene para evitar infecciones en la cerveza.

Revisemos ahora ligeramente los métodos de análisis que se usaron - en este trabajo :

EXTRACTO APARENTE

Fue calculado a partir del dato de gravedad específica y transformado a relación por ciento en peso, usando tablas que se tienen en esta cervecera.

pH

Se usó un potenciómetro Milivolt, calibrado con soluciones "buffer" o "tándem" de 6.88y 4.00, antes de cada determinación.

COLOR

Fue determinado usando un colorímetro Hellige de acuerdo a la escala de Bishop adaptado por la European Brewery Convention.

INDICE DE AMARGOS (BITTERNESS INDEX)

El método de Rigby (28) y Bethune modificado por Bang, Moltke y Meilgaard (8) y más tarde por Klopper (7) para estimar el complejo Iso-humulon, Iso-cohumulon e Iso-adhumulon extraído con Iso-octano en medio ácido. El contenido de Iso-humulon en el solvente se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 275 micrones y está dado por la expresión :

$$\text{Iso-humulon (mg/1000 ml.)} = 57.2 (E_{\lambda = 275 \text{ m}\mu}) - 5.9$$

NITROGENO TOTAL

Una modificación del método original de Kjeldahl fue usado. El principio del método es como sigue : La muestra de cerveza se calienta con ácido sulfúrico concentrado, carbón activado y un catalizador Selenio-Cobre, llamado de Wieninger que acelera la reacción verificada en un matraz de Kjeldahl especial, hasta combustión completa y obtención de un líquido cristalino. En el curso de la combustión el nitrógeno de la muestra es convertido a sulfato de amonio. El ácido sulfúrico remanente es entonces neutralizado con hidróxido de sodio concentrado. La solución se hierve para liberar amoniaco y éste es colectado en forma adecuada para después ser estimado por titulación, y este dato se transforma a nitrógeno.

FRACCION C

El método usado es una modificación del método de fraccionación -- de Lundin y Schröderheim basado en el hecho de que se pueden separar tres -- fracciones de las proteínas : una "Fracción A" de nitrógeno de alto peso mole -- cular es precipitada con tanino bajo condiciones bien controladas de tempera -- tura y acidez, seguido de la precipitación de productos intermedios con ácido -- fosfomolibdico. Esta fracción llamada "Fracción B" contiene peptonas y po -- lipéptidos superiores. El nitrógeno no precipitado por ácido fosfomolibdico es llamado "Fracción C", y representa productos menores de degradación hidrolí -- tica de las proteínas, por ejemplo aminoácidos y polipéptidos menores.

POLIFENOLES

Escogimos el método diseñado originalmente por De Clerck y Jeru -- namis modificado por el Dr. A. L. Whitear, y presentado por L. R. Bishop -- (5) del "Haze Group of the E.B.C." en 1972. El método es como sigue : La cerveza se desgasifica por agitación. Mostos o cervezas turbios se clarifican -- por centrifugación. Se pipetea 10 ml. de la muestra y 8 ml. de un reactivo -- CMC/EDTA (solución al 1% de carboximetilcelulosa de baja viscosidad conte -- niendo 0.2% de tetra acetato de etilendiamina) en un matraz graduado de 25 -- ml. y se mezclan vigorosamente . Luego se agregan 0.5 ml. de un reactivo -- férrico (solución verde de citrato férrico de amonio al 3.5%) y también se --

métricamente en un absorciómetro usando una longitud de onda de 550 micrones, contra un testigo preparado de la misma manera, pero usando agua en lugar de cerveza. Una gráfica de Densidad de Color contra Concentración de Antocianógenos se puede trazar midiendo soluciones conocidas de antocianidina preparada a partir de taxifolina por el método de Swain (32) a diferentes concentraciones y puede usarse para interpretación directa de los valores de extinción. El método más detallado y como fue descrito por los autores, es el siguiente: "Diez mililitros de cerveza desgasificada se agitan con 0.5 g. de nylon 66 en polvo durante 40 min.; luego se filtra la resina y se lava para eliminar los restos de cerveza. La resina lavada es entonces mezclada con 12-15 ml. de la solución n-butanol-HCl y calentada a 100°C, agitando a intervalos de 1 y 3 min., hasta que una solución clara se obtenga. Se continúa el calentamiento durante 30 min. y después de enfriarse la solución clara rojo púrpura que se obtiene, se diluye a 25 ml. con el reactivo n-butanol-HCl para después medir su densidad óptica contra un testigo, en un absorciómetro SPEKKER, usando celdas de 1 ml. y un filtro verde Ilford No. 5 a una longitud de onda de 550 micrones.

PRUEBA DE ADHESION DE LA ESPUMA (SHAUMHAFTVERMAGEN, O VALOR S.H.V.)

Este método fue desarrollado en esta cervecera y permite conocer

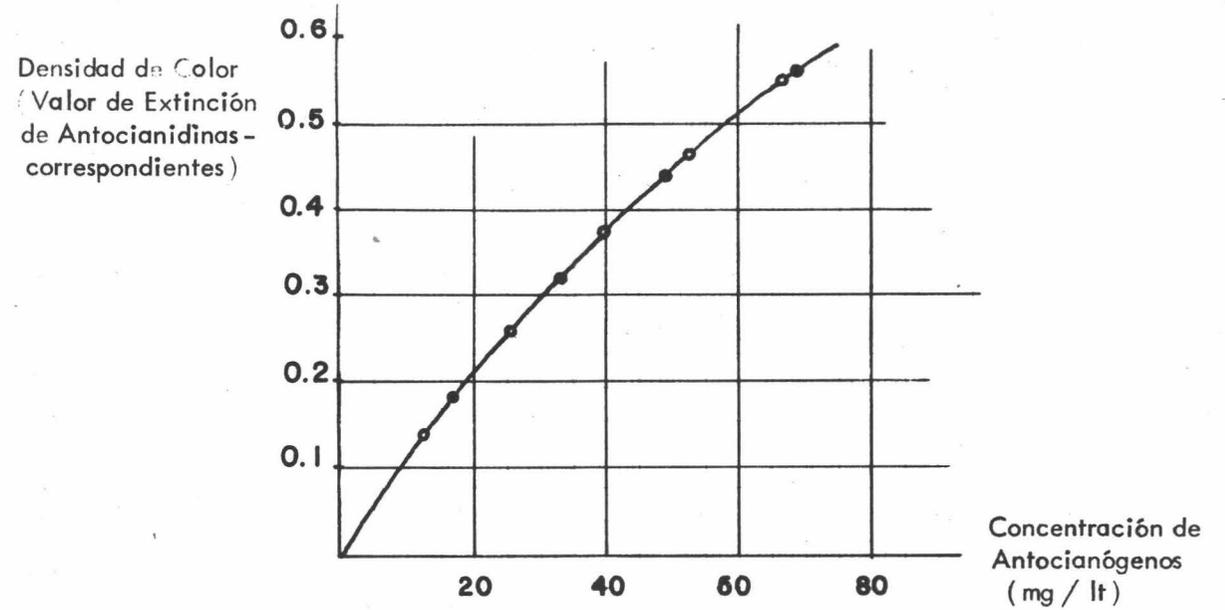


Fig. C.- Relación entre la Concentración de Antocianógenos y la Coloración dada por Antocianidinas obtenidas por tratamiento con ácido.

- o Cerveza diluída.
- . Leucocianidina.

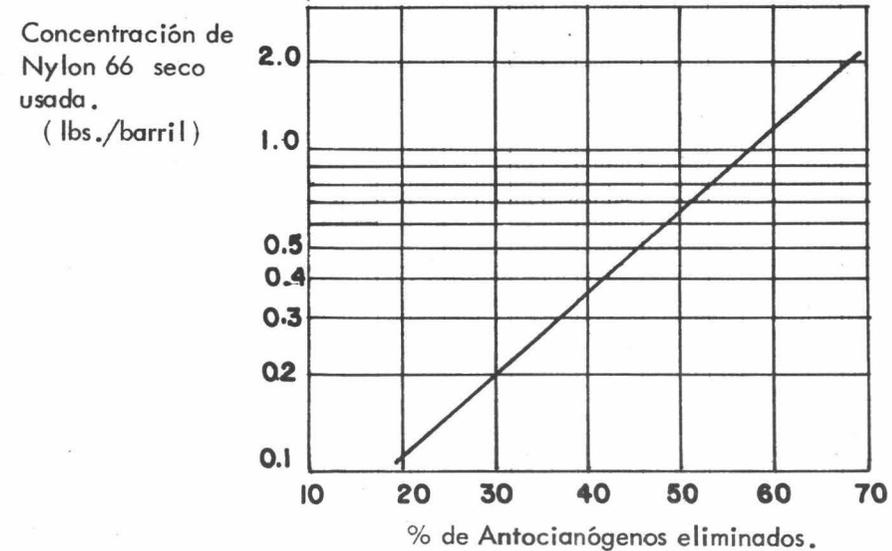


Fig. D.- Relación entre la cantidad de Nylon usada y la proporción de antocianógenos eliminados de la Cerveza.

la capacidad o habilidad de la cerveza para producir espuma resistente y estable. El método es como sigue : Un volumen de 300 ml. de cerveza filtrada se vacía en una botella "sifón", a prueba de presión, y carbonatada. Después se almacena a 0°C durante 20 horas, tras lo cual la cerveza se acondiciona a 20°C en baño maría por 30 min. y se vacía entonces en una probeta de 2,000-ml., en un lapso de exactamente 20 segundos, usando un embudo. 30 Min. - después se toma una fotografía de las "manchas" (clings) de espuma adherida a las paredes del cilindro usando una bombilla "flash" por dentro y un papel - del que se usa en fotocopiadoras envuelto por fuera el cilindro, cubriendo toda el área con espuma. La foto después es revelada y sobre ella se mide el -- área total cubierta por la espuma, y el área cubierta en una franja de 3.5 cm. de ancho sobre el nivel del líquido, usando un patrón cuadrículado en octavos de cm². El valor S.H.V. será la suma de ambos valores. Se ha visto en la práctica que el valor S.H.V. guarda una buena correlación con la estabilidad real de la espuma.

PRUEBA DE LA FORMALINA PARA LA PREDICCIÓN DE LA "VIDA EN ALMACEN" (SHELF LIFE)

Esta es una técnica química para la predicción de la "vida en almacén", precipitando componentes causantes de turbidez, y es como sigue : Un volumen de 580 ml. de cerveza desgasificada se vacía en una botella transpa-

rente de 633 ml. y se añaden 50 ml. de formalina. Después de embotellada la cerveza se mezcla perfectamente con la formalina mediante agitación enérgica, y se almacena después a 0°C. Después de 3 y 6 días se mide la turbidez total (turbio total), y estos valores son un índice de la tendencia de la cerveza a ponerse turbia.

PRUEBA DE FORZAMIENTO (FORCING TEST)

Este método usa condiciones drásticas de temperatura para acelerar la aparición de turbidez en las muestras. Se vacían 630 ml. de cerveza desgasificada en una botella transparente, la cual es tapada y almacenada luego a 0°C durante 48 horas para inducir el "turbio en frío", y a esta temperatura se mide el "turbio total". Luego la cerveza se acondiciona en baño maría a 20°C durante una hora y se mide el "turbio permanente". Después la cerveza se almacena nuevamente a 50°C durante 5 días y a 0°C durante 2 días más. Hecho ésto se mide nuevamente "turbio total" y "turbio permanente". El ciclo se repite dos veces más.

CAPITULO II

DATOS EXPERIMENTALES

Los datos que se obtuvieron en la fase experimental, de los análisis efectuados a todas las muestras se tabulan a continuación junto con una gráfica para ayudar a la comparación visual de los resultados. Todos los datos aquí reportados fueron certificados por la Gerencia de Control de Calidad de la Cervecería Musashino de Suntory Ltd., Japón, donde se realizaron las pruebas.

1.- Los resultados de los análisis efectuados a la cerveza tierna sin tratamiento fueron los siguientes :

EXTRACTO APARENTE	3.40%
pH	4.31
COLOR	7.75 Unidades E.B.C.
INDICE DE MARGOS	27.10 I.B.U.
NITROGENO TOTAL	44.3 mg./100 ml.
FRACCION C	28.07 mg./100 ml.
POLIFENOLES	138.2 p.p.m.
ANTOCIANOGENOS	25.0 mg./1000 ml.

LEVADURA EN SUSPENSION

 7.7×10^7 células/ml.

El extracto del mosto usado fue de $10.50 \pm 0.2\%$ en peso, y el límite de Atenuación fue de $82.0 \pm 1.0\%$. Se usaron cepas de levadura de *Saccharomyces carlsbergensis* floculativa e infloculativa en una relación de 1:1.

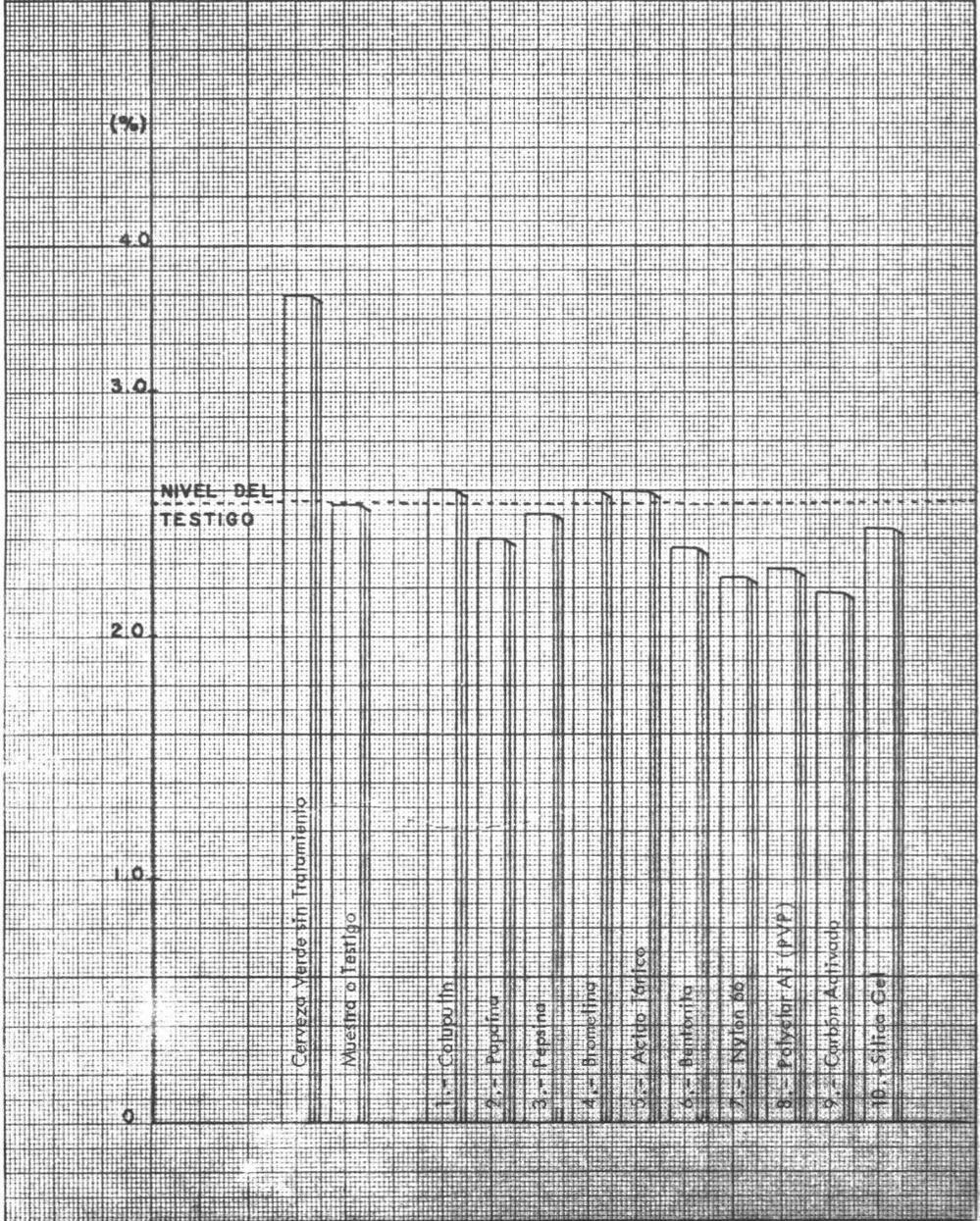
EFECTO EN EL EXTRACTO APARENTE

Tratamiento	Extracto Aparente (% en peso)	En relación al testigo %
1.- COLUPULIN	2.583	+ 3.2
2.- PAPAINA	2.385	- 4.7
3.- PEPSINA	2.470	- 1.3
4.- BROMELINA	2.573	+ 2.8
5.- ACIDO TANICO	2.583	+ 3.2
6.- BENTONITA	2.327	- 7.0
7.- NYLON 66	2.230	- 10.9
8.- PVP (POLYCLAR AT)	2.240	- 10.5
9.- CARBON ACTIVADO	2.165	- 13.5
10.- SILICA GEL	2.423	- 3.2
11.- TESTIGO O CONTROL	2.503	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

1
5
4
11
3
10
2
6
8
7
9

FIG. 1.- EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL EXTRACTO APARENTE.

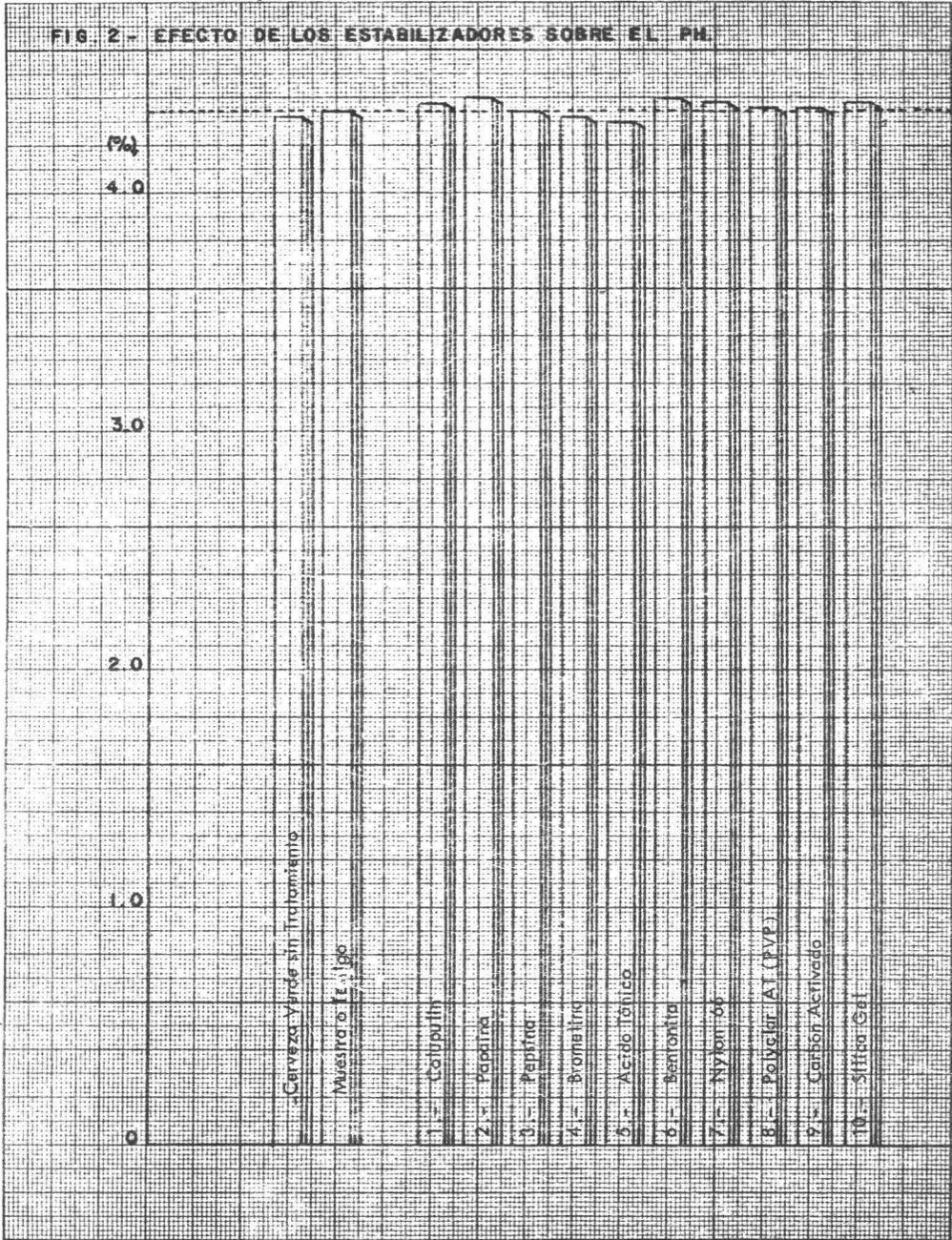


E F E C T O EN EL pH

Tratamiento	pH	En relación al testigo %
1.- COLUPULIN	4.37	+ 0.7
2.- PAPAINA	4.40	+ 1.4
3.- PEPSINA	4.33	- 0.2
4.- BROMELINA	4.32	- 0.5
5.- ACIDO TANICO	4.30	- 0.9
6.- BENTONITA	4.40	+ 1.4
7.- NYLON 66	4.38	+ 0.9
8.- PVP (POLYCLAR AT)	4.35	+ 0.2
9.- CARBON ACTIVADO	4.34	0
10.- SILICA GEL	4.37	+ 0.7
11.- TESTIGO O CONTROL	4.34	-

La variación con respecto al testigo no fue significativa en ninguno -
de los casos.

FIG. 2 - EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL PH.



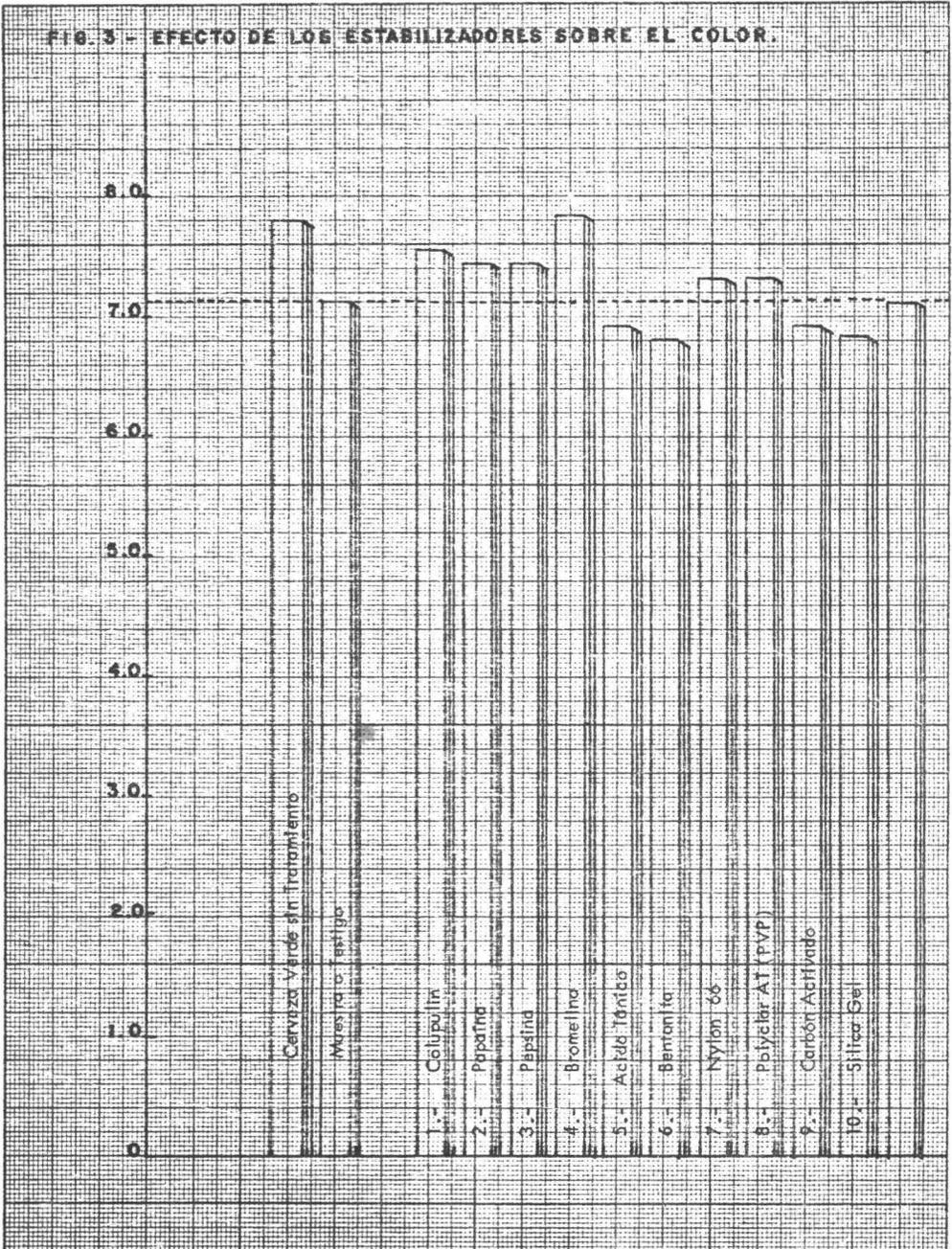
EFECTO EN EL COLOR

Tratamiento	Color (Unidades E.B.C.)	En relación al testigo %
1.- COLUPULIN	7.5	+ 5.6
2.- PAPAINA	7.4	+ 4.2
3.- PEPSINA	7.4	+ 4.2
4.- BROMELINA	7.8	+ 9.9
5.- ACIDO TANICO	6.9	- 2.8
6.- BENTONITA	6.8	- 4.2
7.- NYLON 66	7.3	+ 2.8
8.- PVP (POLYCLAR AT)	7.3	+ 2.8
9.- CARBON ACTIVADO	6.9	- 2.8
10.- SILICA GEL	6.8	- 5.6
11.- TESTIGO O CONTROL	7.1	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

4
1
2
3
7
8
11
5
9
6
10

FIG. 3 - EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL COLOR.



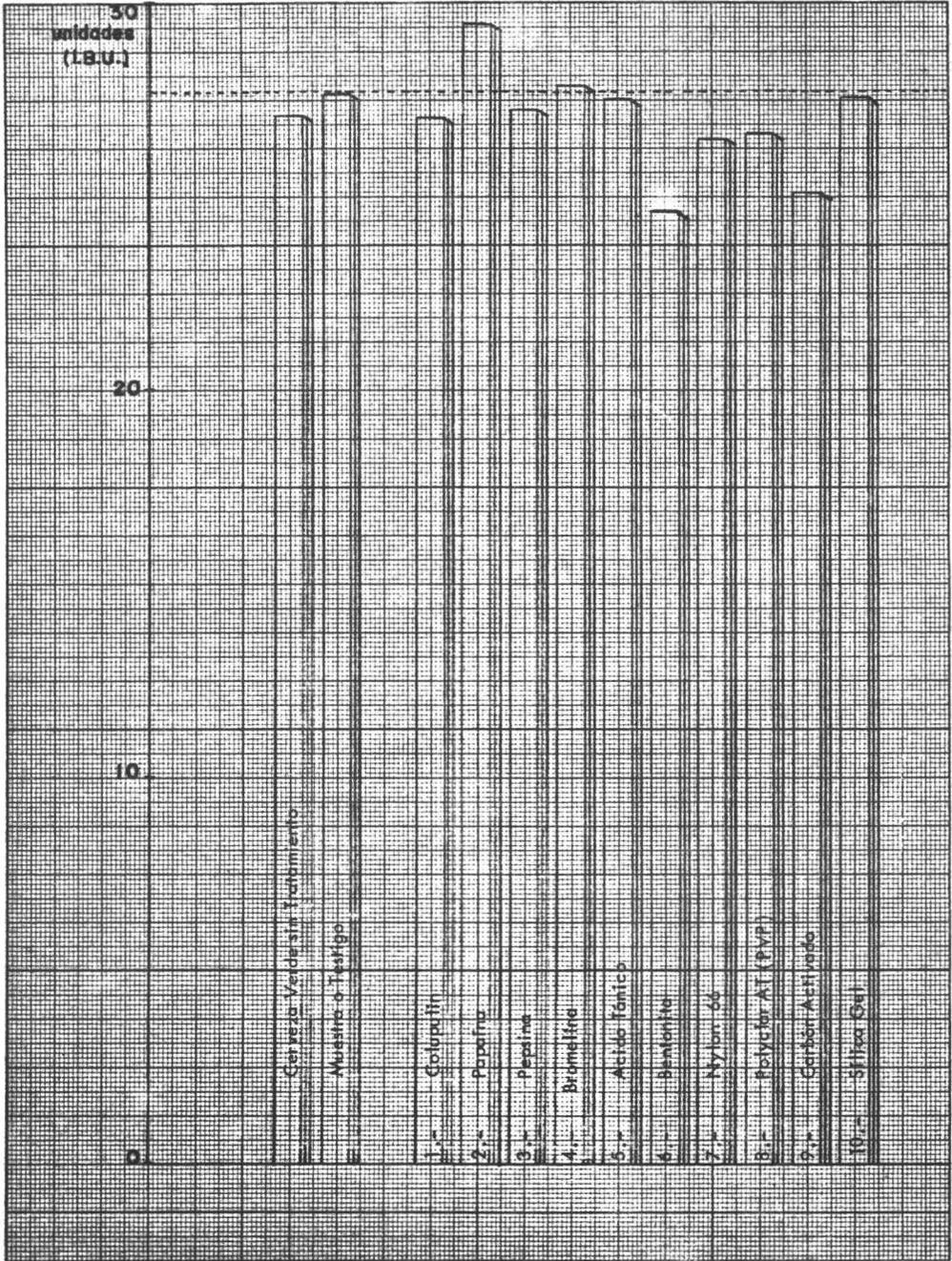
EFECTO EN EL INDICE DE AMARGOS.

Tratamiento	Indice de Amargos (I.B.U.)	En relación al testigo %
1.- COLUPULIN	26.90	- 2.6
2.- PAPAINA	29.40	+ 6.4
3.- PEPSINA	27.15	- 1.7
4.- BROMELINA	27.80	+ 0.7
5.- ACIDO TANICO	27.50	- 0.4
6.- BENTONITA	24.40	- 11.6
7.- NYLON 66	26.40	- 4.4
8.- PVP (POLYCLAR AT)	26.54	- 3.9
9.- CARBON ACTIVADO	25.04	- 9.3
10.- SILICA GEL	27.50	- 0.4
11.- TESTIGO O CONTROL	27.62	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

2
 4
 11
 10
 5
 3
 1
 8
 7
 9
 6

FIG. 4 - EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL INDICE DE AMARGOS.



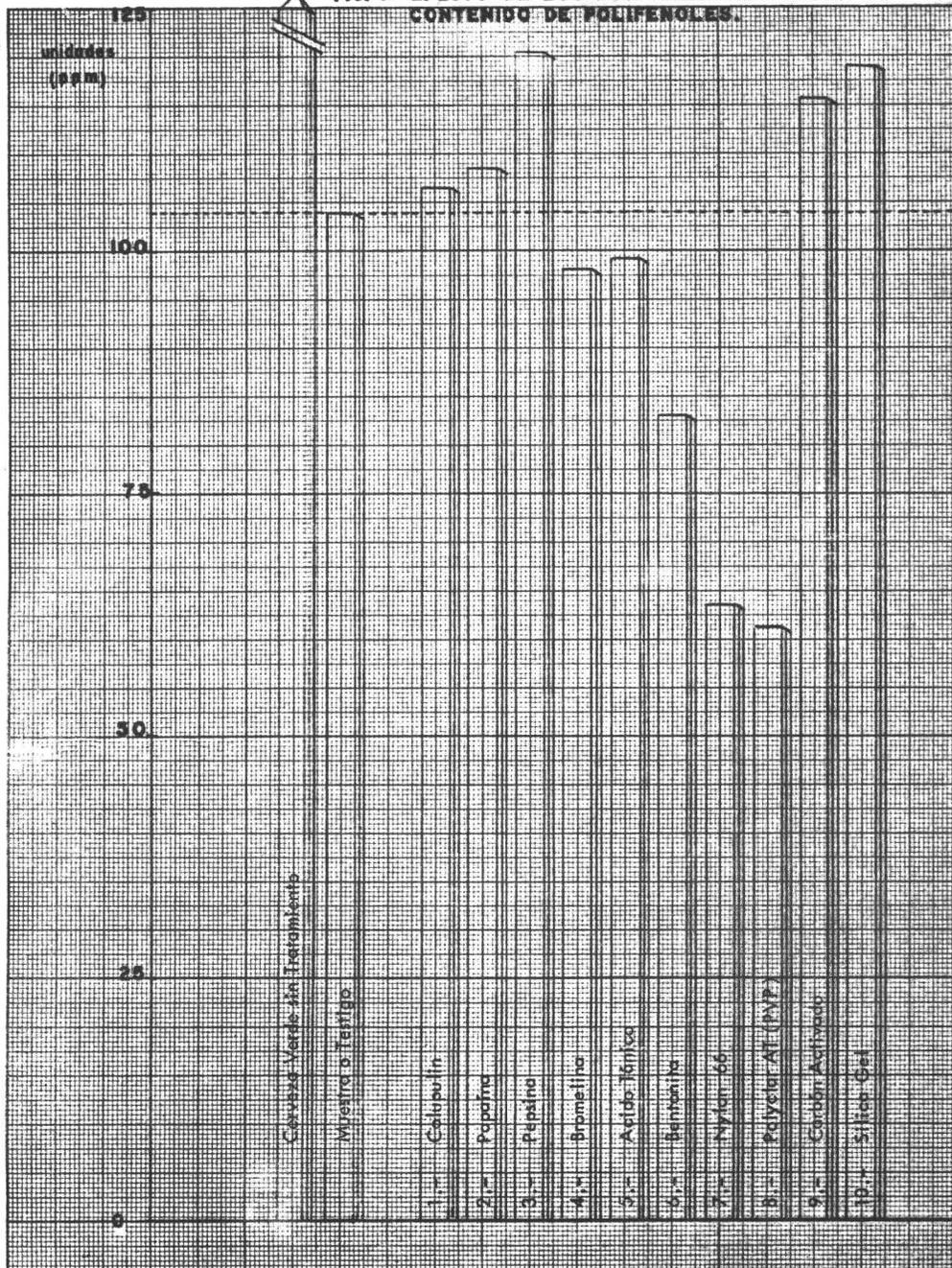
EFECTO EN EL CONTENIDO DE POLIFENOLES

Tratamiento	POLIFENOLES (p.p.m.)	En relación al testigo %
1.- COLUPULIN	106.60	+ 2.4
2.- PAPAINA	108.24	+ 3.9
3.- PEPSINA	123.00	+ 18.1
4.- BROMELINA	97.58	- 6.3
5.- ACIDO TANICO	98.40	- 5.5
6.- BENTONITA	82.82	- 20.5
7.- NYLON 66	63.14	- 39.4
8.- PVP (POLYCLAR AT)	60.68	- 41.7
9.- CARBON ACTIVADO	115.62	+ 11.0
10.- SILICA GEL	118.90	+ 14.2
11.- TESTIGO O CONTROL	104.14	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

3
10
9
2
1
11
5
4
6
7
8

FIG. 5- EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL CONTENIDO DE POLIFENÓLES.

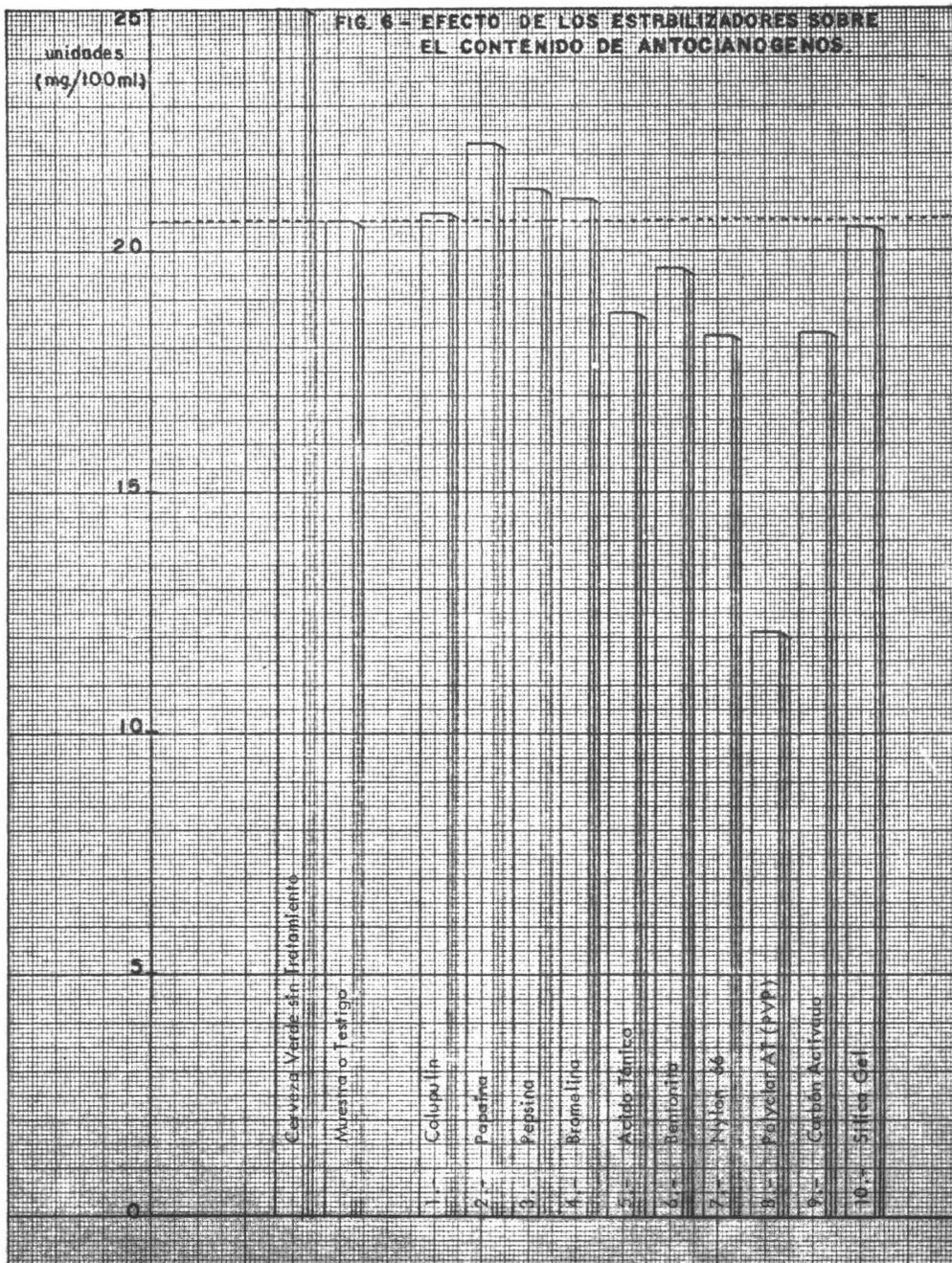


EFECTO EN EL CONTENIDO DE ANTOCIANOGENOS

Tratamiento	Antocianógenos (p.p.m.)	En relación al testigo (%)
1.- COLUPULIN	20.6	0
2.- PAPAINA	22.1	+ 7.3
3.- PEPSINA	21.2	+ 2.9
4.- BROMELINA	21.1	+ 2.4
5.- ACIDO TANICO	18.7	- 9.2
6.- BENTONITA	19.6	- 4.9
7.- NYLON 66	18.2	- 11.7
8.- PVP (POLYCLAR AT)	12.0	- 41.7
9.- CARBON ACTIVADO	18.2	- 11.7
10.- SILICA GEL	20.5	- 0.5
11.- TESTIGO O CONTROL	20.6	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

2
3
4
1
11
10
6
5
7
9
8



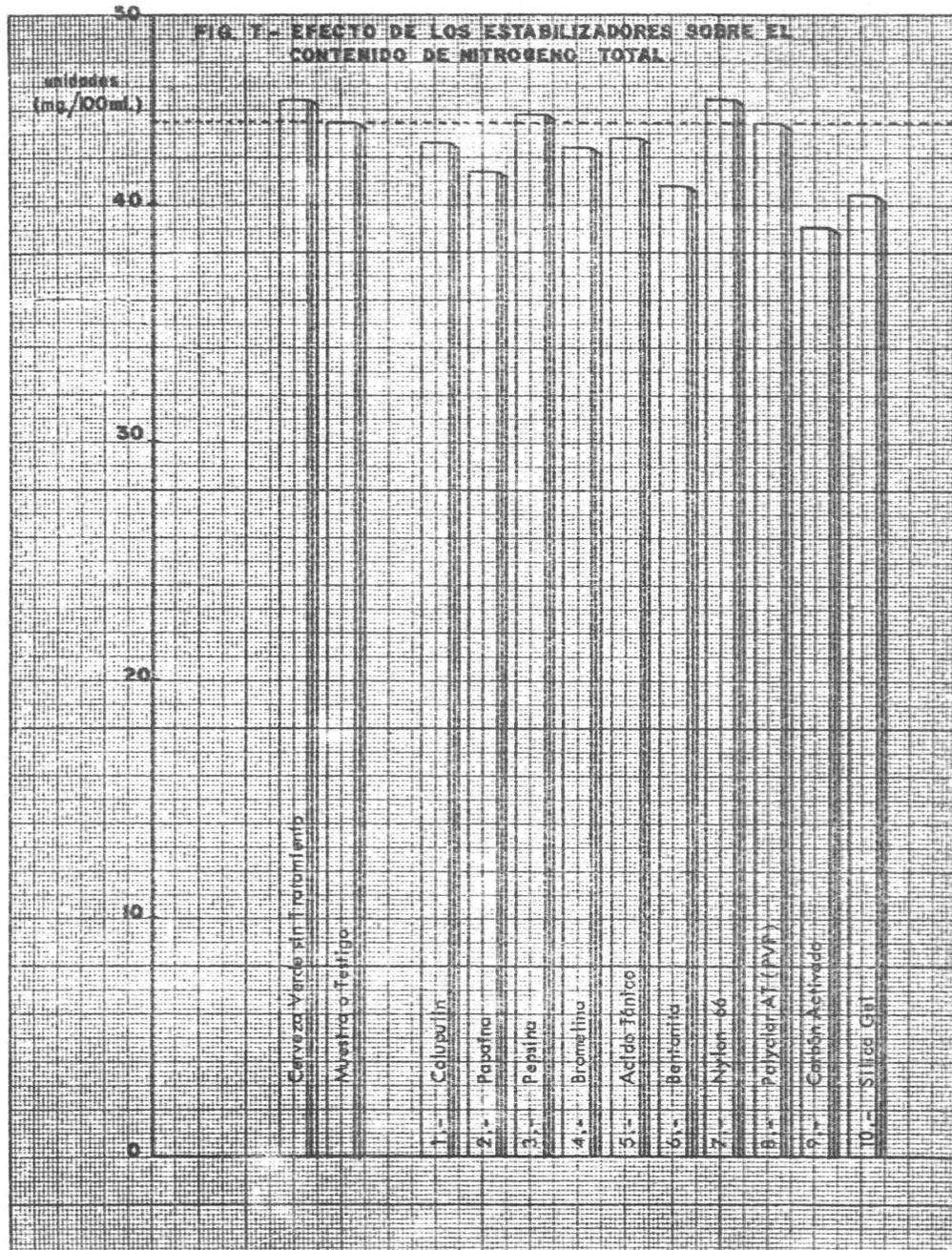
EFECTO EN EL CONTENIDO TOTAL DE NITROGENO.

Tratamiento	Nitrógeno Total (p.p.m.)	En relación al testigo (%)
1.- COLUPULIN	42.4	- 1.9
2.- PAPAINA	41.3	- 4.4
3.- PEPSINA	43.6	+ 0.9
4.- BROMELINA	42.2	- 2.3
5.- ACIDO TANICO	42.6	- 1.4
6.- BENTONITA	40.8	- 5.6
7.- NYLON 66	44.6	+ 3.2
8.- PVP (POLYCLAR AT)	43.2	-
9.- CARBON ACTIVADO	38.9	- 10.0
10.- SILICA GEL	40.3	- 6.7
11.- TESTIGO O CONTROL	43.2	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

7
3
11
8
1
5
4
2
6
10
9

FIG. 7.- EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL CONTENIDO DE NITROGENO TOTAL



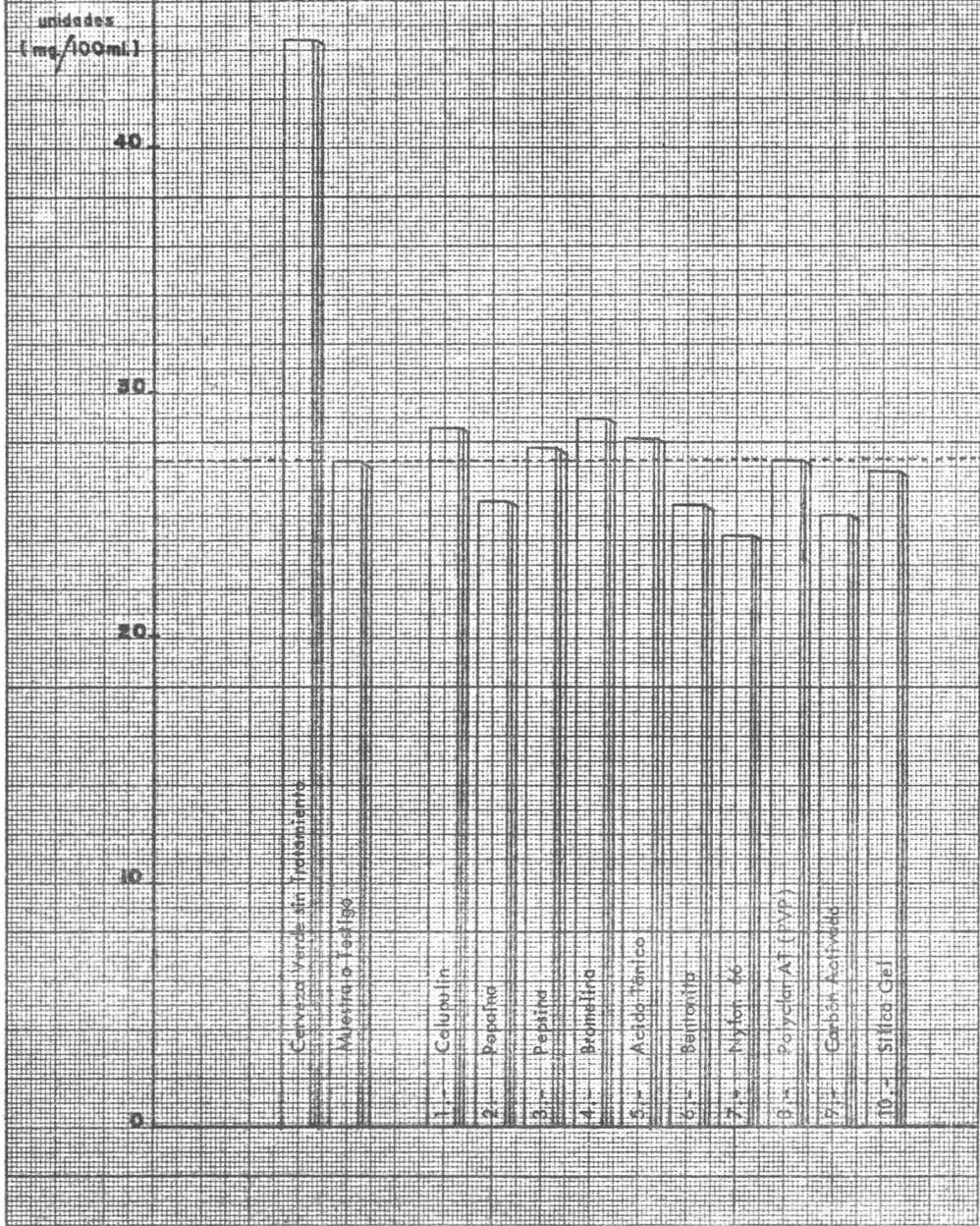
EFECTO EN EL CONTENIDO DE FRACCION "C"

Tratamiento	Fracción "C" (mg/100 ml.)	En relación al testigo (%)
1.- COLUPULIN	28.6	+ 5.1
2.- PAPAINA	25.6	- 5.9
3.- PEPSINA	27.7	+ 1.8
4.- BROMELINA	28.9	+ 6.3
5.- ACIDO TANICO	28.1	+ 3.3
6.- BENTONITA	25.4	- 6.6
7.- NYLON 66	24.0	- 11.8
8.- PVP (POLYCLAR AT)	27.2	0
9.- CARBON ACTIVADO	24.9	- 8.5
10.- SILICA GEL	26.7	- 1.8
11.- TESTIGO O CONTROL	27.2	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

4
1
5
3
11
8
10
2
6
9
7

FIG. 9 - EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE EL CONTENIDO DE FRACCIÓN C^{12} .



EFECTO EN LA ADHESION DE LA ESPUMA.

Tratamiento	Valor S.H.V. (cm. ²)	En relación al testigo (%)
1.- COLUPULIN	66.6	- 73.6
2.- PAPAINA	143.1	- 43.2
3.- PEPSINA	79.5	- 68.5
4.- BROMELINA	98.0	- 61.1
5.- ACIDO TANICO	169.8	- 32.6
6.- BENTONITA	160.3	- 36.4
7.- NYLON 66	233.7	- 7.3
8.- PVP (POLYCLAR AT)	287.1	+ 13.9
9.- CARBON ACTIVADO	-	-
10.- SILICA GEL	226.7	- 10.0
11.- TESTIGO O CONTROL	252.0	-

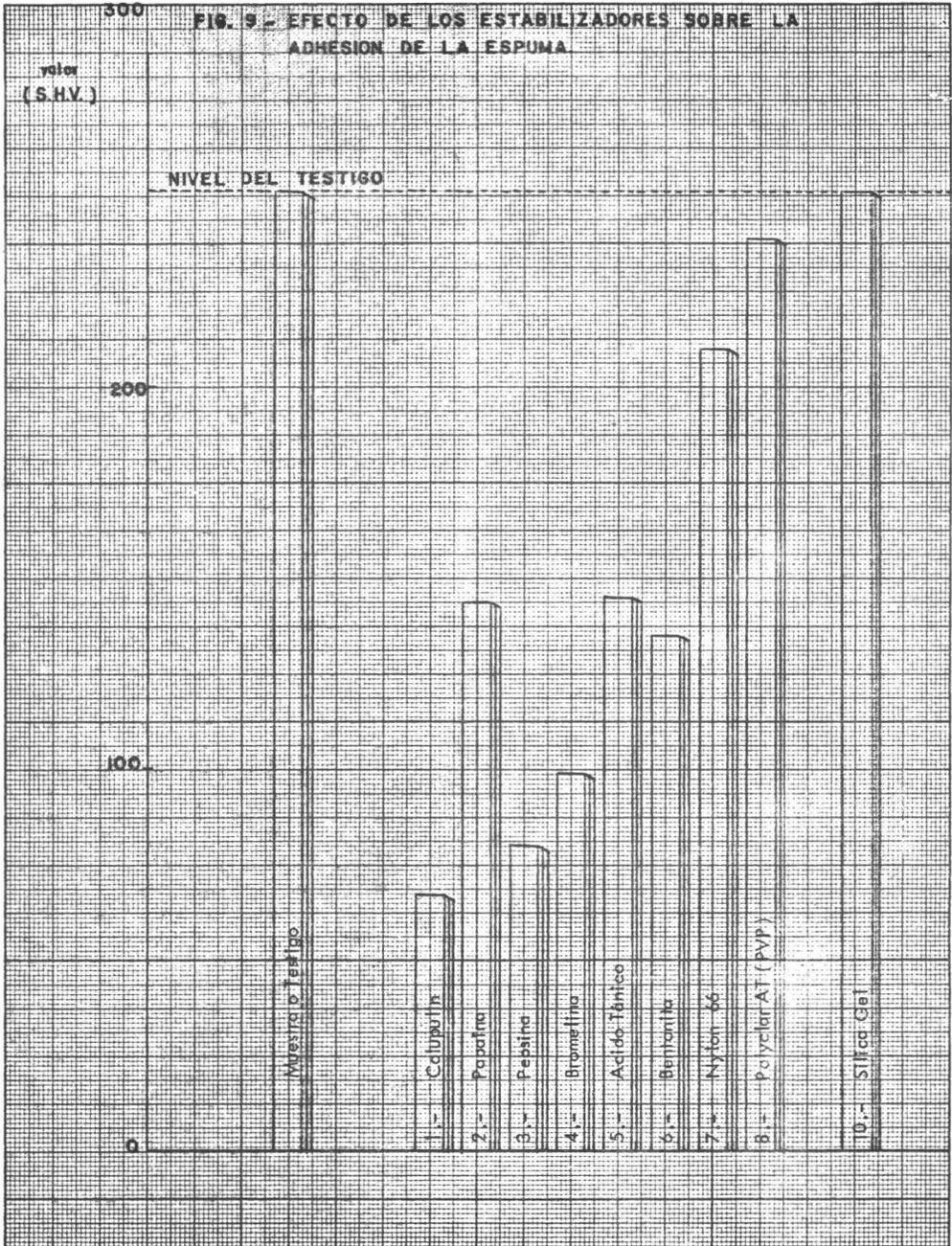
SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

8
 11
 7
 10
 5
 6
 2
 4
 3
 1

FIG. 9.- EFECTO DE LOS ESTABILIZADORES SOBRE LA ADHESION DE LA ESPUMA

valor (S.H.V.)

NIVEL DEL TESTIGO

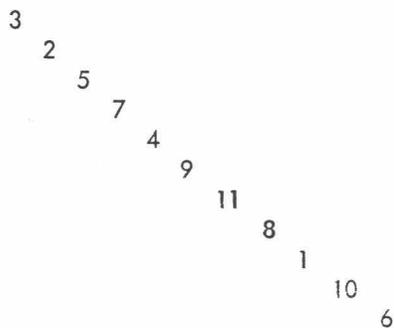


PRUEBA DE PREDICCIÓN CON EL METODO
DE LA FORMALINA

Tratamiento	TURBIO TOTAL (Helms)			
	Turbio Total (3 días)	En relación al testigo (%)	Turbio Total (6 días)	En relación al testigo (%)
1.- COLUPULIN	38.2	- 22.7	68.4	- 76.8
2.- PAPAINA	140.0	+ 183.4	246.6	- 16.5
3.- PEPSINA	155.5	+ 213.8	304.2	+ 2.9
4.- BROMELINA	77.7	+ 57.3	149.4	- 49.4
5.- ACIDO TANICO	131.4	+ 166.0	257.4	- 12.8
6.- BENTONITA	30.2	- 38.9	46.1	- 84.4
7.- NYLON 66	94.3	+ 90.9	215.3	- 27.1
8.- PVP (POLYCLAR AT)	46.4	- 6.1	116.3	- 60.6
9.- CARBON ACTIVADO	67.7	+ 37.0	152.3	- 48.4
10.- SILICA GEL	36.4	- 26.3	72.7	- 76.1
11.- TESTIGO	49.4	-	295.2	-

SECUENCIA EN ORDEN DECRECIENTE :

Tres días



Seis días

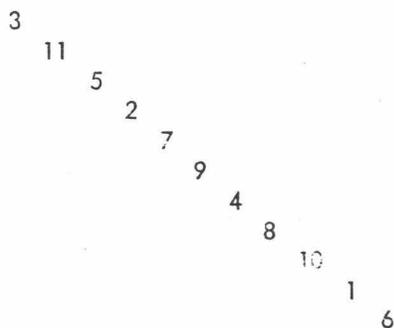
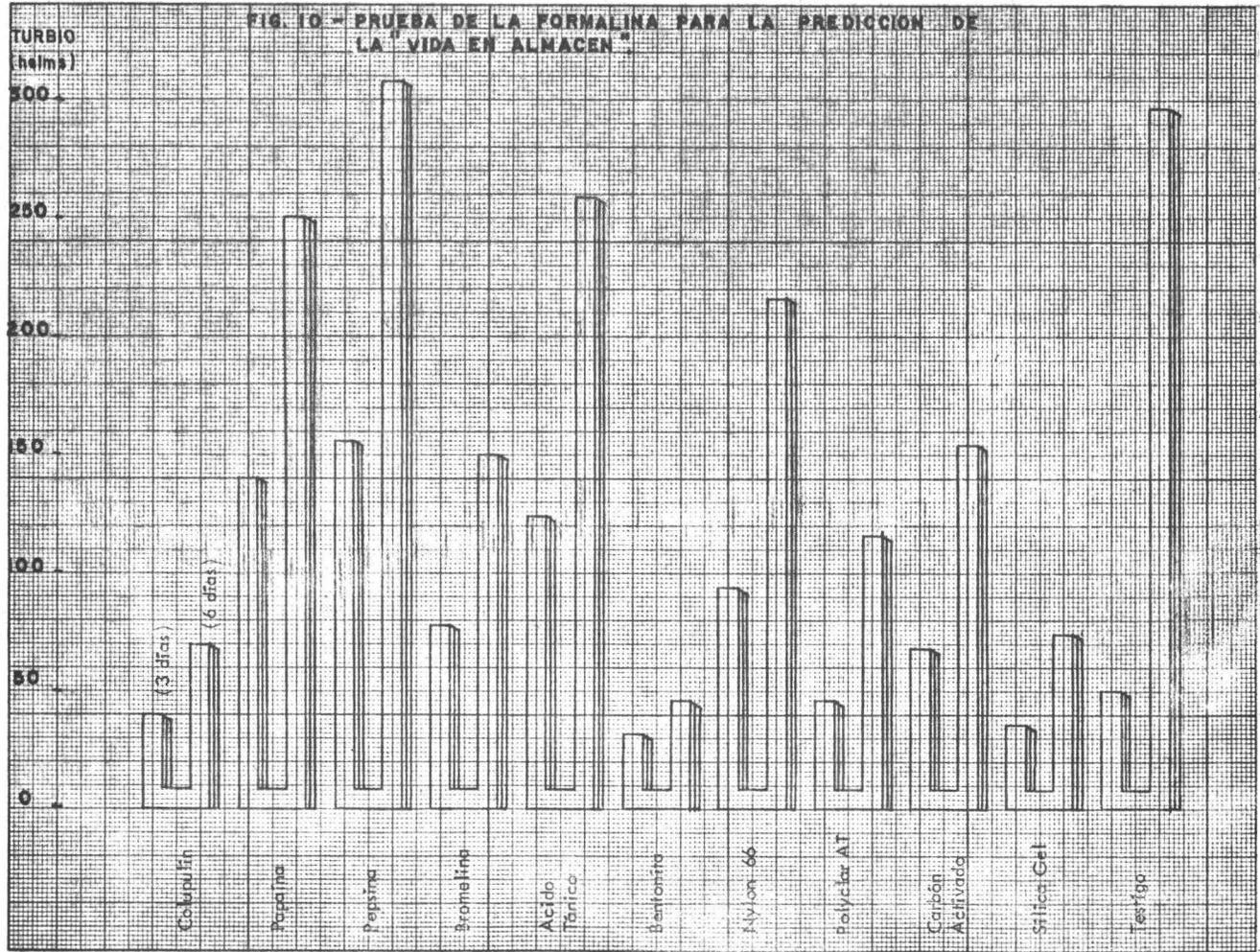


FIG. 10 - PRUEBA DE LA FORMALINA PARA LA PREDICION DE LA "VIDA EN ALMACEN".



PRUEBA DE FORZAMIENTO
PARA LA PREDICCIÓN DE LA "VIDA EN ALMACEN"

Tratamiento	0		1 Semana		2 Semanas		3 Semanas	
	Turbio total	Turbio perm.						
1.- COLUPULIN	25,6	22,7	116,3	48,6	249,5	105,5	380,9	154,8
2.- PAPAINA	45,7	38,1	171,0	81,0	348,1	119,5	*	150,5
3.- PEPSINA	34,5	22,7	279,0	130,3	*	248,4	-	*
4.- BROMELINA	37,1	27,4	334,8	156,6	*	223,9	-	*
5.- ACIDO TANICO	22,0	21,6	234,0	110,9	*	190,1	-	*
6.- BENTONITA	26,0	26,0	285,5	123,8	*	185,0	-	*
7.- NYLON 66	27,4	26,9	*	198,0	-	*	-	-
8.- POLYCLAR AT	22,0	20,9	189,0	82,8	*	136,8	-	161,3
9.- CARBON ACTIVADO	25,2	22,0	*	159,1	-	*	-	-
10.- SILICA GEL	27,7	26,0	276,5	120,6	*	182,9	-	*
11.- TESTIGO	27,0	24,1	*	217,8	-	*	-	-

* Medida sobre el límite del aparato (432 Helms)

PRUEBA DE FORZAMIENTO
(continúa)

SECUENCIA EN ORDEN CRECIENTE :

0 SEMANAS

Turbio total : 5 8 9 1 6 11 7 10 3 4 2

Turbio permanente : 8 5 9 1 3 11 6 10 7 4 2

1 SEMANAS

Turbio total : 1 2 8 5 10 3 6 4 7 9 11

Turbio permanente : 1 2 8 5 10 6 3 4 9 7 11

2 SEMANAS

Turbio total : 1 2

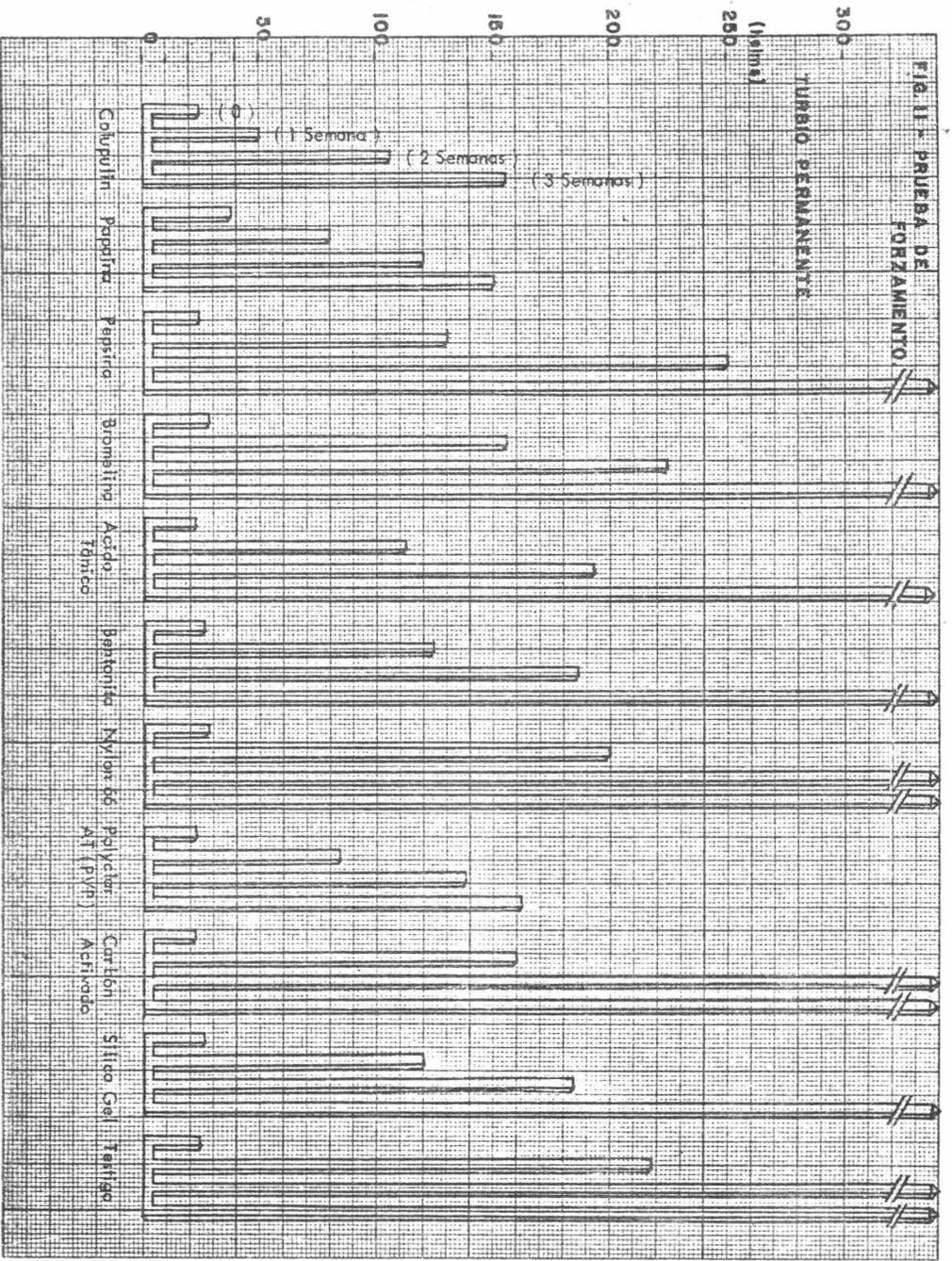
Turbio permanente : 1 2 8 10 6 5 4 3

3 SEMANAS

Turbio total : 1

Turbio permanente : 2 1 8

FIG. II - PRUEBA DE FORZAMIENTO PERMANENTE



ANALISIS ORGANOLEPTICO

Fue realizado por varios miembros del Panel de Catadores de esta —
Cervecería, quienes calificaron cada una de las muestras en sus características —
de aroma, sabor y dureza. Los resultados reportados son valores promedio de —
las calificaciones individuales :

<u>Tratamiento</u>	<u>Aroma</u> <u>(0-10)</u>	<u>Sabor</u> <u>(0-10)</u>	<u>Dureza</u> <u>(0-5)</u>
1.- COLUPULIN	6.0	5.7	1.3
2.- PAPAINA	5.9	5.9	0.5
3.- PEPSINA	5.1	5.6	1.5
4.- BROMELINA	5.4	5.0	1.5
5.- ACIDO TANICO	5.4	5.3	1.8
6.- BENTONITA	4.4	3.9	1.3
7.- NYLON 66	5.3	5.3	1.8
8.- PVP (POLYCLAR AT)	5.1	4.9	1.5
9.- CARBON ACTIVADO	5.4	5.0	1.0
10.- SILICA GEL	4.9	4.4	1.8
11.- TESTIGO O CONTROL	4.9	4.6	2.5

Secuencia en orden decreciente de calidad :

Aroma : 1 -- 2 -- 4 = 5 = 9 -- 7 -- 3 -- 8 -- 10 = 11 -- 6

Sabor : 2 -- 1 -- 3 -- 5 = 7 -- 9 = 4 -- 8 -- 10 = 11 -- 6

Dureza : 2 -- 9 -- 6 -- 1 -- 8 = 4 = 3 -- 10 = 7 = 5 -- 11

CAPITULO III

CONCLUSIONES .

Como el principal objetivo de este trabajo ha sido generar datos que nos ayuden a seleccionar el proceso de estabilización más adecuado para mejorar la estabilidad no biológica de la cerveza producida en esta cervecera, consideremos como análisis más importantes los de las pruebas de predicción de la "vida en almacén" o shelf life, y en especial los de la "prueba de forzamiento" que parece ser la más confiable y aproximada a la realidad. Los resultados obtenidos con estas pruebas son indicadores directos de la duración de la cerveza, desde su terminación hasta que comience a enturbiarse, dándonos cuenta de esta manera del efecto estabilizador de cada uno de los estabilizadores probados.

De acuerdo con la evolución del desarrollo de turbidez a través de los pasos de la prueba, la resina POLYCLAR AT demostró ser la mejor en el mejoramiento de la vida en almacén de la cerveza. Este adsorbente, una polivinilpirrolidona adsorbe selectivamente taninos o polifenoles, los cuales, como ha sido demostrado son componentes directos causantes de turbidez. El efecto del Polyclar AT en la estabilidad o adhesión de la espuma fue también el me

¡or, sobrepasando incluso el valor obtenido con la muestra testigo. El efecto en otras propiedades es completamente admisible para nuestros fines, dado que no afectó considerablemente el extracto aparente, color, y removi6 iso-humones en sólo un 3.9% en relación a la muestra testigo. El efecto en Nitr6geno Total y Fracci6n C (amino6cidos) fue tambi6n bueno. En los an6lisis organol6pticos la muestra del Polyclar AT fue promedio, pero mejor que el testigo.

El COLUPULIN mostr6 tambi6n poseer buenas propiedades como mejorador de la "vida en almac6n", pero su efecto en la estabilidad o adhesi6n de la espuma fue el m6s dañino; 73.6% menor que el del testigo, y el efecto en la Fracci6n C fue tambi6n malo. Sin embargo sus efectos en color y propiedades organol6pticas fueron muy buenos. Otro aspecto concerniente con el uso del Colupulin es que es una enzima que se disuelve en la cerveza y no puede ser separada; entonces, su uso est6 restringido en muchos pa6ses.

La PAPAINA tuvo tambi6n un muy buen efecto mejorando la "vida en almac6n" y no removi6 sustancias amargas ni colorantes. Sus efectos en la estabilidad de la espuma fueron malos, pero las caracter6sticas organol6pticas fueron buenas.

El ACIDO TANICO es el estabilizador que se usa actualmente en esta cervecer6a, como hab6amos mencionado. Parece ser que mejora la "vida en almac6n" en un tiempo relativamente corto, pero m6s tarde aparece la tur-

bidez. Sus efectos colaterales en Color, Índice de Amargos, Nitrógeno Total, Fracción C y Adhesión de la Espuma no fueron tan buenos. Los resultados de los análisis organolépticos fueron aceptables.

La SILICA GEL o STABQUICK fue el siguiente estabilizador en el orden de mejoramiento de la "vida en almacén", pero su efecto en el color -- fue el peor; en Índice de Amargos y Adhesión de la espuma tuvo también una acción nociva. Las características organolépticas tampoco fueron muy buenas. La Silica Gel principalmente remueve polipéptidos de la cerveza.

La BENTONITA tuvo un moderado efecto mejorando la "vida en almacén", malo sobre Color, Nitrógeno Total y Fracción C; el peor en Índice de Amargos y promedio en Adhesión de la Espuma. Organolépticamente fue la peor muestra por su aroma y sabor.

EL NYLON 66 no mejoró sensiblemente la "vida en almacén" de la cerveza al comienzo de las pruebas de predicción, pero parece tener un muy buen efecto en períodos más largos. Como era de esperarse, removió antocianos de la cerveza en una buena proporción (27%), pero en este caso la PVP fue aún más efectiva. Por otra parte, en estos experimentos el Nylon 66 exhibió también una gran selectividad por aminoácidos y polipéptidos de bajo peso molecular contenidos en la Fracción C, más aún que Silica Gel, Carbón-Activado y las enzimas tratadas. Posiblemente la razón es que el grado de re

sina usada (D.S. 3850) no fue muy adecuado para fines de estabilización, ya que el Nylon 66 ha sido reportado como un buen estabilizador por varios autores. Sus efectos en Color y Nitrógeno Total fueron buenos, pero no así en Índice de Amargos y no dañó mucho la Adhesión de la Espuma.

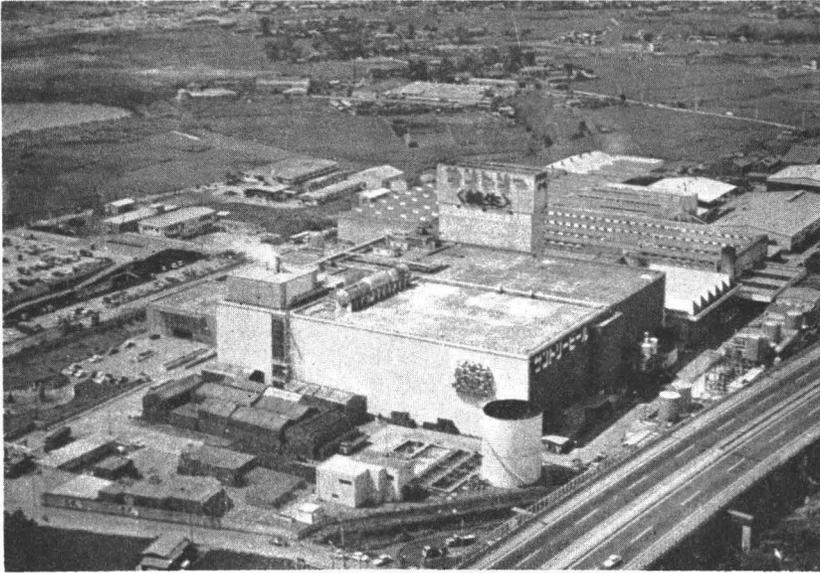
La PEPSINA no tuvo efectos apreciables en la mayoría de las propiedades estudiadas, pero afectó considerablemente la estabilidad de la espuma. Se supone ésto fue debido a las condiciones de temperatura y acidez que se tuvieron durante la prueba, dado que las enzimas, y especialmente la Pepsina, necesitan de condiciones muy especiales para actuar, y cuando son diferentes se inhiben. Trolle (34) encontró que la Pepsina era la enzima más efectiva a temperaturas de pasteurización (alrededor de 60°C); la enzima es activada a pesar de que su pH óptimo es de 2. Sin embargo, en nuestros experimentos -- preferimos utilizar las mismas condiciones que se tienen en escala industrial -- dentro de la planta.

La BROMELINA mejoró sólo un poco la estabilidad de la cerveza -- sin afectar sensiblemente el Color, contenido de iso-humulones y Fracción C, -- pero redujo el contenido de Nitrógeno Total y dañó considerablemente la estabilidad de la espuma. Las propiedades organolépticas fueron abajo del promedio.

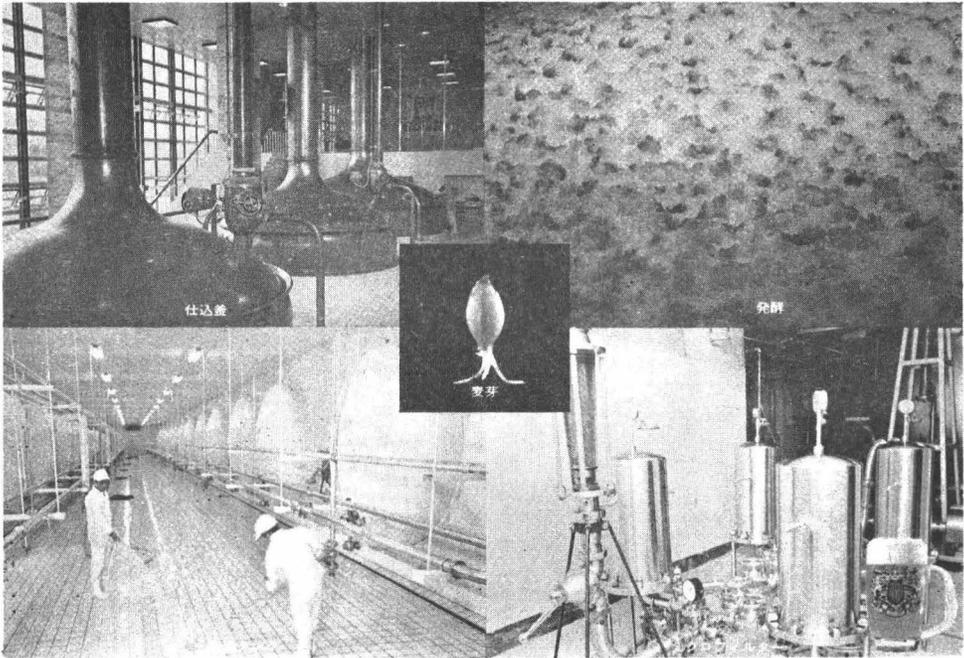
EL CARBON ACTIVADO, como era de esperarse, fue el adsorbente-

más activo; sin embargo, falta de selectividad disminuyó el contenido de sólidos considerablemente, con la consecuente pérdida de cuerpo de la cerveza y daño en Color, Índice de Amargos, Nitrógeno Total, Fracción C y otros componentes. El aroma y sabor resistieron su acción dañina en más o menos buen grado.

Los mejores resultados correspondieron entonces a POLYCLAR AT y a COLUPULIN, pero debido a las consideraciones anteriores sobre la preparación enzimática, el adsorbente se prefiere. También se toman en cuenta consideraciones económicas y de facilidad de trabajo, ya que la resina puede ser filtrada, lavada y reactivada varias veces. De todas las consideraciones anteriores se concluye que el estabilizador más adecuado para ser usado en esta -- cervecería dentro de los probados en este trabajo, es la resina polivinilpirrolidona o POLYCLAR AT, ya que proporciona una buena estabilidad a la cerveza y no afecta sensiblemente otras propiedades importantes. Sin embargo, un tratamiento combinado usando una enzima y un adsorbente se sugiere como aún -- más efectivo que el tratamiento con un estabilizador único.



Cervecería Musashino De Suntory Ltd. en Kanagawa-Ken, Japón, donde se realizó este estudio.



Sala de Cocinado
Sala de Fermentación

Grano de Cebada
Germinado

Mosto en Fermentación
Microfiltros



SUNTORY
LIMITED

寿

NEW ASAH BLDG., 2-22, NAKANOSHIMA, KITA-KU, OSAKA, JAPAN CABLE ADDRESS: "SUNTORY OSAKA" TELEX: 522-4881 AKADAMA OSA TELEPHONE: 203-2271

Distrito de Tokyo, a 27 de junio de 1973.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente nos permitimos hacer constar y certificamos que el Sr. FRANCISCO JAVIER GONZALEZ LOPEZ realizó en los Laboratorios de esta Cervecería de Musashino Kojyo, Suntory Ltd. la investigación a nosotros reportada bajo el tema: " EFECTO DE ALGUNOS ESTABILIZADORES EN LA CERVEZA " durante su entrenamiento técnico en esta planta, que fué del 27 de febrero al 27 de junio de 1973, y que los datos en el reportados corresponden fielmente a los obtenidos prácticamente. El tema de la Investigación fué seleccionado de común acuerdo entre ambas partes, tomando en cuenta nuestra necesidad de investigar sobre este campo, y el interés del Sr. González sobre el mismo. La Investigación fué realizada correctamente y los datos obtenidos son confiables en nuestra opinión.

Para los usos que se consideren pertinentes extendemos la presente constancia en el Distrito de Tokyo a los veintisiete dias del mes de junio de 1973.

Atentamente:

西垣 守

MAMORU NISHIGAKI
Ingeniero en Jefe de la
Sección de Control de Calidad.

HIDEO NAKAZAKI
Director de Suntory Ltd.
y Gerente General de la
Cervecería de Musashino.

A P E N D I C E

PROCESO DE ELABORACION DE CERVEZA.

La cerveza es una bebida obtenida por la fermentación alcohólica - de un mosto producido con malta de cebada, (en algunos países se usan adjuntos o aditivos tales como : [almidón de maíz, cebada sin maltear, arroz, jara- be de maíz, azúcar y glucosa u otras fuentes de azúcares o almidones), ade- más de agua y lúpulo, que contiene alcohol, ácido carbónico, ciertas cantida- des de sustancias no fermentescibles y casi siempre pequeñas cantidades de subs- tancias fermentescibles, y que se encuentra en un período de fermentación len- ta, que se puede suspender por completo.

PROCESO DE MALTEADO.-

La cebada es la materia prima más importante para la elaboración de cerveza; de ella se obtiene el extracto que, disuelto en el mosto y fer- mentado por levadura se convierte en cerveza. Las materias de reserva del grano de cebada -una semilla- consisten principalmente de carbohidratos, - sustancias albuminoides, sales y grasas. Solo una pequeña parte de ellas es - soluble en agua; la fécula, que es la principal sustancia extractiva del grano-

es insoluble en agua fría y para extraerla es preciso solubilizarla primero en — agua a alta temperatura (52 a 75°C), y después transformarla en azúcar fermen-tescible. Esto se realiza por la acción de enzimas que son producidas natural-mente durante la germinación de los granos de cebada; las hormonas vegetales como ácido giberélico contenidas en el epitelio son transportadas al endosperma y desde ahí atacan la capa de aleurona y se producen enzimas que atacan — la estructura del endosperma, cortando las moléculas de almidones y transfor— mándolas en azúcares. Estas enzimas son principalmente :

- α amilasa
- β amilasa
- proteinasas

En algunas malterías modernas se hacen aspersiones de ácido giberé— lico para acelerar el proceso.

Esta transformación es la principal finalidad del proceso de maltea— do, y éste a su vez es uno de los pasos fundamentales en la elaboración de la— cerveza: "La malta es el alma de la cerveza", dice un antiguo refrán alemán, y Windisch le llama la obra de arte de la elaboración de cerveza. Otra fina— lidad del malteado es tostar el grano hasta un cierto grado del cual va a depen— der el color y sabor de la cerveza. Así, la cerveza oscura se obtiene a par— tir de malta tostada. Los pasos principales de este proceso son :

- 1.- **LIMPIA Y CLASIFICACION DE LA CEBADA.**- Tiene por objeto la eli
minación de basuras y tierra, y la clasificación de los granos; los de menor tamaño no se utilizan para maltear.
- 2.- **REMOJO.**- La cebada contiene originalmente una cierta cantidad de agua, llamada "de constitución", aún estando em período latente o de dormancia. Al absorber el grano más agua, llamada "de vegetación", se inician las funciones vitales de la germinación. Pero este proceso - de absorción es muy lento; el agua asciende por tráqueas situadas entre el pericarpio y la testa y penetra en el grano impregnando las membra-
nas celulares de una a otra, hasta las del interior. Durante la fija-
ción física del agua en el grano se producen fenómenos químicos y bio-
lógicos que tienen efectos sobre el desarrollo posterior de la germina-
ción, por lo cual este paso también es importante. El agua templada-
(25°C) acelera la absorción que se realiza en aproximadamente una se-
mana, conteniendo al final los granos de 40 a 45% de humedad en pe-
so. Tan pronto como penetra en el grano la cantidad de agua de vege-
tación" necesaria para que sean posibles los fenómenos de disolución y
difusión, comienza la actividad vital del embrión. Esto ocurre poco-
después de iniciado el remojo y a partir de este momento debe conside-
rarse al grano de cebada como un ser vivo. El primer signo de esta ac-
tividad es una respiración enérgica de los granos, necesidad que debe-

satisfacerse adecuadamente induciendo el acceso de aire necesario para evitar el asfixiamiento de los granos y la formación de productos intermedios de la respiración que son nocivos (alcoholes, ácidos orgánicos, éteres, etc.), en lugar de los productos normales : CO y agua. - La aireación adecuada evita también que los granos absorban demasiada humedad, y esto puede ayudarse igualmente realizando volteos periódicos del grano.

Posteriormente se lava la cebada germinada con agua de cal o algunos lo hacen con agua ácida, para eliminar las impurezas, solubles e insolubles que se desprenden de los granos por la fricción, taninos, resinas y esporas de hongos y bacterias que puede contener la cebada.

- 3.- GERMINACION.- Al iniciarse la vida del grano de cebada, el embrión se alimenta en primer término de las sustancias de reserva contenidas en la semilla; este período de vida recibe el nombre de germinación y es una metamorfosis cuya iniciación y continuación presuponen el cumplimiento de ciertas condiciones de humedad, calor y oxígeno, y comprende una serie de fenómenos físicos, químicos, enzimáticos y biológicos, con una gran evolución de calor. La acción de las oxidases muy enérgica y requiere de acceso abundante de oxígeno, pero una respiración abundante no va a la par con la velocidad de desagregación de la materia, sino que es más rápida; el fabricante de malta de-

be controlar la dosificación de oxígeno, el cual regula la velocidad de formación de enzimas, que es la finalidad principal del malteado, haciendo esta operación óptima al evitar la excesiva transformación de las sustancias de reserva.

La temperatura ideal oscila alrededor de 20°C. Otro factor que se debe cuidar es la eliminación de ácido carbónico que retrasa la germinación.

Al final de la germinación se obtiene lo que se llama "malta verde", que contiene aproximadamente 42% de humedad.

4.- SECADO Y HORNEADO.- El secado de la malta tiene por objeto eliminar el exceso de humedad para con ello y con el aumento de temperatura detener los procesos de la germinación. La humedad de la malta evoluciona más o menos de 42% a 3%.

El horneado tiene por objeto tostar la malta para producir modificaciones en el color, sabor y aroma.

La temperatura durante ambos procesos es conveniente programada en varios pasos sucesivos, desde digamos 50°C a 85°C, en un tiempo de 20 horas para maltas pálidas.

Durante el primer período en que la malta verde tiene mucha agua y la temperatura es relativamente baja, prosigue el crecimiento del embrión y

la transformación de la materia de reserva, mucho menos ésto en las maltas tipo Bohemia que en las Dortmund o Munich. La acción enzimática continúa en las partes aún no disueltas del endospermo se produce disolución de la celulosa por acción de las citasas, sacarificación de la fécula por las diastasas, inversión de la sacarosa por las inversas, desintegración de albúminas por las peptasas y desdoblamiento de las grasas por las lipasas. A temperaturas un poco más elevadas se hacen reversibles algunas de estas reacciones.

Si la temperatura sube lo suficiente y disminuye en proporción la cantidad de agua llega un momento en que cesan los fenómenos biológicos en el grano y solo se producen reacciones químicas que dan por resultado la formación en el grano de malta de sustancias aromáticas y colorantes. En estos fenómenos intervienen los azúcares, las sustancias albuminoides, las grasas y los aminoácidos. Se debe evitar la caramelización de los azúcares pues esto producirá sabor amargo en la cerveza.

Las torres u hornos de desecación son normalmente de tres pisos con suelos-criba con calefacción indirecta por circulación de gases de combustión o aire caliente. A esta malta tostada se le llama Darrmalz, del alemán, y su volumen es más o menos 1.3 veces mayor que el de la cebada original.

Como el malteado es por sí mismo un proceso completo y complicado, la mayoría de las cervecerías la compran a fábricas de malta, que la producen según especificaciones de los cerveceros en varios países.

Ya en la cervecería, la malta y los otros granos que se usan como materia prima siguen el proceso que se describe en el diagrama anexo y que des cribimos ligeramente a continuación :

CRIBADO.- Tiene por objeto realizar una nueva limpia y selección de los granos. Esto se realiza por medio de varias cribas o tamices horizontales y sobrepuestos, con movimientos de vaivén, a través de las cuales pasa el grano, se selecciona por tamaños y se separa del polvo e impurezas. Normalmente el grano pasa por un separador magnético que retiene piezas metálicas.

MOLINOS.- Para que la extracción de las sustancias de la malta y cebada en el mosto sea lo más rápida y completa posible es preciso tirturarlas bien. Pero tomando en cuenta que entre más finos sean los polvos más difíciles serán las operaciones de filtrado y clarificación, es necesario establecer un óptimo del grado de molienda. Si se produce demasiada harina al filtrar se formarán grumos pastosos que al filtrar dificultarán el paso del mosto y la lixiviación del bagazo, con pérdida de extracto.

Los molinos utilizados tienen generalmente tres pares de rodillos con cribas seleccionadoras entre ellas que separan tres fracciones : harina primaria, harina secundaria y salvado que se usan en la proporción adecuada en la preparación del mosto.

Una báscula automática, controlada por las autoridades fiscales, --

pesa y registra la malta que llega al molino y de ahí se deduce el pago de impuestos y se determinan rendimientos.

TANQUES SEPARADORES.— La cebada y malta contienen algunas sustancias solubles en agua, pero en su mayor parte son insolubles. Se pueden hacer solubles gran parte de ellas por la acción de enzimas que ya vienen contenidas en la malta. Esto se realiza por medio del "braceado", y las sustancias que pasan a la solución forman lo que se llama "extracto", y la solución acuosa de este extracto es el mosto.

Existen dos procesos para realizar el braceado :

DECOCCION.— Se usa en cervecería en muchos países.

INFUSION.— Se usa en cervecería en Inglaterra y para whisky en muchos países.

En el proceso de decocción como se usa en la Cervecería Musashino, que es en realidad de dos decocciones, se cargan las materias primas en uno de los tanques, siendo la temperatura de la masa 52°C . Luego se pasa una parte del mosto al otro tanque y se eleva la temperatura del primero hasta 75°C , permaneciendo así por 10 minutos; se sigue elevando hasta llegar a 100°C donde se mantiene un corto período y después se baja hasta 69°C , tras de lo cual se pasa el mosto al primer tanque, cuyo contenido sufrió durante el transcurso de ese tiempo la siguiente evolución de temperatura : se mantuvo a 52°C y --

cuando el otro tanque comenzó a enfriarse de 100°C a 69°C , éste bajó su temperatura a 48°C , e inmediatamente se calentó a 69°C y se unió con el otro mosto. Se mantienen unidos durante 15 minutos durante los cuales ocurre la saccharificación principal. Luego se separan nuevamente y la temperatura de uno se eleva nuevamente hasta 100°C , ahora en un solo paso y se mantiene así durante 15 minutos, tras lo cual se baja a 77°C . El mosto del otro tanque se mantiene a 69°C y solo hasta el final se hace subir su temperatura a 77°C y se une con el otro, resultando de la mezcla de ambos un mosto que contiene aproximadamente 20% de sólidos totales.

Estos tanques son de cobre, están agitados mecánicamente y son calentados por medio de chqueta de vapor.

CALDERA DE COCCION.— Como las sustancias que interesa extraer de la malta, cebada y adjuntos ya se encuentran disueltas en el mosto, los sólidos insolubles deben eliminarse para facilitar las siguientes operaciones, y esto se realiza filtrándolo a través de un filtro de placas y lonas. Al terminar de pasar el mosto la torta retenida en el filtro se lava con agua caliente para arrastrar todos los solubles que hayan quedado. Así, el volumen del mosto se incrementa en cerca de un 78%. Este mosto se hierva luego en uno de los tanques con objeto de concentrar y esterilizar el mosto, de ayudar a su clarificación al coagular las proteínas, de destruir las enzimas, principalmente la diastasa, y de facilitar la incorporación de los principios amargos y aromáti-

cos contenidos en el lúpulo.

Al iniciar la ebullición, algunas veces se adiciona ácido sulfúrico - en una proporción tal que el pH final del mosto después de hervir sea 5.2, porque a este pH el punto isoeléctrico es el óptimo para la coagulación de las proteínas. Durante la ebullición del mosto se realiza la adición de lúpulos; en el caso de la Cervecería Musahino se hacen tres adiciones de lúpulo : la primera con concentrado de lúpulo al iniciar la ebullición; la segunda 30 minutos después con lúpulo concentrado y con granulado, y la tercera 60 minutos después de la primera, con lúpulo natural prensado. Se hace de esta manera para la mejor fijación en el mosto de los principios amargos y aromáticos.

El mosto concentrado sale a 11.35 de plato, es decir, por ciento de sólidos en relación peso a volumen, y a 102°C aproximadamente.

ENFRIADORES.- Tienen como función bajar la temperatura del mosto hasta una temperatura adecuada para iniciar la fermentación. Normalmente la temperatura evoluciona de 102°C hasta 7 ú 11 °C. A partir de este punto los riesgos de contaminación del mosto se hacen enormes, debido a las muy favorables condiciones del mosto como sustrato para que se desarrollen microorganismos, por lo que hay que extremar los cuidados. Antiguamente se enfriaba el mosto en grandes charolas donde el mosto formaba una capa de 8 a 12 cms., por radiación del calor al aire; pero como el mosto está así muy expuesto a in

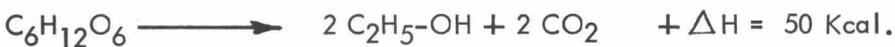
fecciones y a oxidación, ahora se utilizan intercambiadores de calor de placas, de acero inoxidable y perfectamente sellados, rápidos y eficientes.

TANQUES DE FERMENTACION.-

El mosto obtenido se transforma en cerveza por la fermentación. Como agente fermentativo se emplea la levadura de cerveza : *Saccharomyces Cerevisiae*; como substrato de la fermentación, los hidratos de carbono fermentescibles (azúcares) y las materias nitrogenadas fermentescibles (amidas, aminoácidos, sales amoniacales, etc.), que contiene el mosto. En la elaboración de cerveza es preciso conducir la fermentación de manera que no solo el producto final, la cerveza, reúna las cualidades deseadas, sino que la levadura se conserve lo más pura y sana posible, en plena actividad.

Existen infinidad de razas o especies de *Saccharomyces Cerevisiae*, de las cuales cada fabricante selecciona una o una mezcla adecuada para el tipo de cerveza que produce.

La serie de reacciones químicas y enzimáticas se pueden resumir en una :



pero en realidad es una serie mucho más compleja, con formación de varios productos intermedios, entre ellos ácidos láctico, succínico y acético, glicerina, alcohol, isoamílico, varios ésteres, etc., con evolución de energía.

Durante la fermentación se fija aproximadamente un tercio del Nitrógeno Total final de la cerveza por la fijación de productos intermedios.

Los principios de Hansen, quien en 1881 inició la selección de levaduras, para el buen manejo de la fermentación, siguen siendo válidos :

- 1º Siembra de levaduras de razas puras y exentas de bacterias
- 2º Empleo de mostos esterilizados
- 3º Eliminación de todas las causas de contaminación procedentes del exterior.

La fermentación puede ser alta o baja, es decir, en el fondo o en la parte superior del líquido, realizándose la primera a menor temperatura que la segunda. En la Cervecería Musashino se utiliza levadura de fermentación baja, y la fermentación comienza a 9°C, aumentando luego a 12 ó 14°C, donde se mantiene estable algún tiempo; y después baja hasta 3°C, al final de la fermentación tumultuosa. Se distinguen tres etapas principales de la fermentación :

- 1º Niederkräusen (Etapa inicial; poca espuma)
- 2º Hochkräusen (Etapa tumultuosa; mucha espuma)
- 3º Niedergehende (Etapa final tranquila y lenta; poca espuma)

En la Cervecería Musashino, se usan levaduras flocculativa e infloculativa, en una proporción de 1 : 1. La levadura se propaga desde el laboratorio

rio, se renueva, 3 o 4 veces por año, y la misma levadura se usa sólo seis veces.

TANQUES DE REPOSO..- La "cerveza verde" se trasiega a los tanques de reposo al final de la fermentación tumultuosa, donde continúa la fermentación lenta y madura la cerveza. En estos tanques se mantiene la cerveza durante 30 a 60 días a 2°C, y bajo una atmósfera a presión de anhídrido carbónico, producto de la fermentación, a 0.5 Kg/cm²; la cerveza así se satura del gas.

En la cerveza verde se encuentran disueltos varios gases, que como el ácido sulfhídrico y el diacetil producen mal sabor y aroma, los cuales se lavan durante la maduración con el CO₂. También ocurren reacciones químicas que mejoran la calidad de la cerveza, y precipitan materiales causantes de turbidez por la baja temperatura y en función del tiempo. El extracto de la cerveza se abate de 2.5% a 1.8 %.

Después de madurada la cerveza y antes de ser filtrada se añade en la Cervecería Musashino, el estabilizador (ácido tánico), dosificándolo continuamente a la corriente entubada de cerveza. De la misma forma se agrega CO₂ para homogeneizar la cerveza hasta 0.40 % de este gas.

TANQUES DE FILTRACION..- Después de madurada la cerveza posee ya todas sus propiedades organolépticas, pero todavía es turbia en apa--

riencia, por lo que debe filtrarse para dar una vista atractiva, removiendo los restos de levadura y pequeños sólidos. Existen varias maneras de clarificar la cerveza, por ejemplo usando :

- 1 - Filtro de pulpa de celulosa y asbesto.
- 2 - Filtro de placas y lonas usando Kieselgühr.
- 3 - Centrifugación.
- 4 - A través de Kieselgühr con otros filtros.

El método más común usado por las grandes cervecerías es usando -- Kieselgühr, que es una tierra compuesta por los esqueletos fósiles de pequeñas diatomáceas, y es el proceso usado en la Cervecería Musashino, y no el antiguo de tanques.

Deben cuidarse los siguientes aspectos :

- 1.- Que la cerveza filtre tan brillante y estéril como sea posible.
- 2.- Evitar pérdidas de CO_2 .
- 3.- Evitar la oxidación de la cerveza.

Este filtrado no es solamente una operación de tamizado del líquido con retención de partículas de diámetro relativamente grande, sino que se realiza también una ADSORCION en la superficie del medio filtrante; algunas -- partículas sumamente pequeñas y sustancias con una alta tensión superficial -- son retenidas. Así el filtro sigue las leyes de equilibrio de la adsorción y se --

satura después de un cierto tiempo.

La cerveza pasa de aquí a "tanques de espera" que están a presión - (1.0 Kg/cm²).

MICROFILTROS.- Esta operación ha venido a sustituir en muchas cervecerías modernas a la pasteurización con calor en botella. Se basa en el uso de membranas con poros extremadamente finos (diámetro de poro = 1.2 micrones y espesor = 100 micrones) que retienen partículas menores aún que las células de levadura, como bacterias y esporas.

Se compone de una batería de dos prefiltros en paralelo, conectados en serie con dos microfiltros que a su vez están en paralelo. Cada conjunto está formado por una serie de platos perforados de acero sobrepuestos, con membranas entre ellas. Así los prefiltros tienen 40 de estos pares y los microfiltros 60.

Este equipo es muy costoso y su operación delicada; inclusive el agua de lavado debe de prefiltrarse. Pero compensa ampliamente esas desventajas con su excelente eficiencia para esterilizar la cerveza, mejor aún que la pasteurización convencional, con la ventaja de hacerlo en frío.

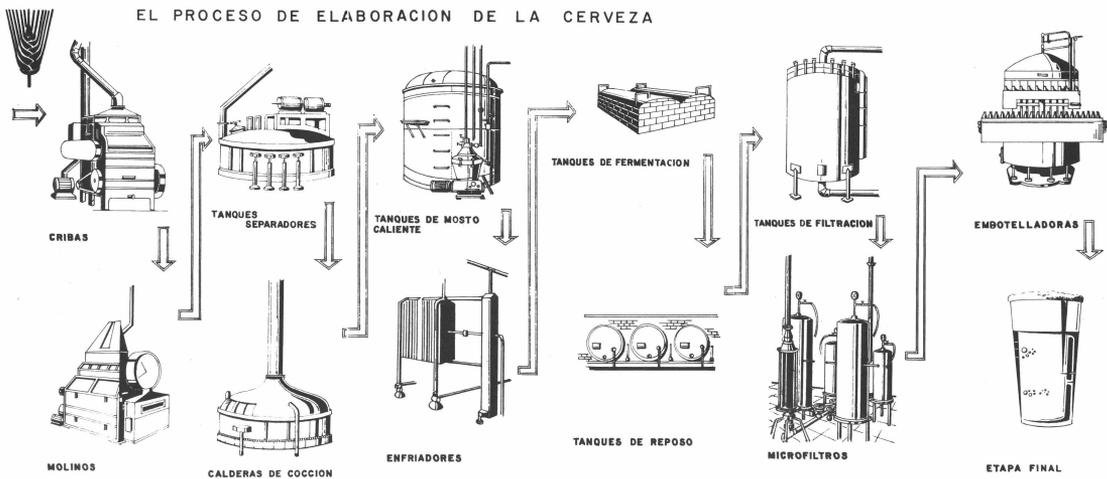
EMBOTELLADORAS.- Ya que para pasar los microfiltros se requiere dar al líquido una gran presión por la resistencia que estos representan, aún a la salida su presión es alta : 2.5 Kg/cm²; después de esta etapa la cerveza -

se pasa a un tanque de espera a esta presión, y de ahí pasa a los embotelladoras, a las llenadoras de barriles y a las llenadoras de latas.

Las llenadoras de botellas en particular son equipos bastante complicados, rápidos y eficientes. En una fábrica de tamaño medio se podrían tener por ejemplo tres líneas de embotellado, cada una con una embotelladora con capacidad para llenar 500 botellas por minuto. El llenado de las botellas debe ser homogéneo y en condiciones de asepsia. Además, en el espacio vacío del cuello de la botella es deseable que no quede aire ocluido para evitar la oxidación de la cerveza y posibles contaminaciones, por lo que antes de tapar la botella se provoca la espumación de la cerveza, con lo que se logra que el aire sea evacuado y ese espacio ocupado por anhídrido carbónico inerte.

PRODUCTO FINAL.- Una bebida chispeante, pura, clara y refrescante en el momento de ser destapada la botella.

EL PROCESO DE ELABORACION DE LA CERVEZA



BIBLIOGRAFIA

- 1.- de Clerk, J.
A TEXTBOOK OF BREWING, Chapman and Hall Ltd.; London (1958)
2 volúmenes.
- 2.- Lloyd, H.H.
BREWING SCIENCE AND PRACTICE, Chapman and Hall Ltd.; I --
(1950), 4th Impression.
- 3.- Gutcho, M.
ALCOHOLIC MALT BEVERAGES, Food Processing Review No. 7, --
Noyes Development Co.; New Jersey (1969).
- 4.- Posada, J., Almenar, J., García Galindo, J.
A PRACTICAL APPROACH ON PROTEIN STABILIZERS, E.B.C. Pro-
ceedings of the Congress; Estoril (1971) p. 379.
- 5.- Gray, P.P., Saletan, L.T. and Stone, I.
STABILITY CHARACTERISTICS OF ENZYME-TREATED BEERS, E.B.
C. Proceedings of the Congress, Rome (1959) p. 307.
- 6.- Bengough, W.I. and Harris, G.
GENERAL COMPOSITION OF NON-BIOLOGICAL HAZES OF --
BEERS AND SOME FACTORS IN THEIR FORMATION, Part I, J. --
Inst. Brew.; 61 (1955) p. 134.
- 7.- Harris, G.
GENERAL COMPOSITION OF NON-BIOLOGICAL HAZES OF --
BEERS AND SOME FACTORS IN THEIR FORMATION, Part. II. --
Chromatographic Separation of Hop and Malt Tannins, J. Inst. ---
Brew.; 62 (1956) p. 390.
- 8.- Harris, G. and Ricketts, R.W.
BEER HAZE-THE PROBLEM AND A SOLUTION, E.B.C. Proceedings
of the Congress; Rome (1959) p. 290.

- 9.- Grabar, P., Daussant, J., Enari, T.M. et Nummi, M.
L'ORIGINE DES TROUBLES AU FROID, E.B.C. Proceedings of the Congress.; Madrid (1967) p. 379.
- 10.- Nummi, M., Loisa, M. and Enari, T.M.
FRACTIONATION OF HAZE - FORMING COMPOUNDS IN BEER, E.B.C. Proceedings on the Congress; Interlaken (1969) p. 349.
- 11.- Chapon, L. et Chemardin, M.
RÔLE DES TANNŒIDES DE L'ORGE DANS LA GENÈSE DES TROUBLES DES BIÈRES, E.B.C. Proceedings of the Congress.; Brussels -- (1963) p. 182.
- 12.- Chapon, L. et Chemardin, M.
ÉTUDE SUR LE TROUBLE AU FROID., E.B.C. Proceedings of the -- Congress; Madrid (1967) p. 389.
- 13.- Claesson, S. and Sandegren, E.
INVESTIGATIONS OF HAZE IN BEER., E.B.C. Proceedings of the Congress; Brussels (1963) p. 221.
- 14.- Claesson, S. and Sandegren, E.
PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS OF HAZE PROBLEMS., E.B.C. Proceedings of the Congress; Interlaken (1969) p. 339.
- 15.- Woof, J.B. and Pierce, J.S.
STUDIES ON THE MECHANISM OF HAZE FORMATION., E.B.C. Proceedings of the Congress; Madrid (1967) p. 365.
- 16.- Curtiss, N.S. and Clark, A.G.
NYLON TREATMENT OF BEER, J. Inst. Brew., 66 (1960) p. 226.
- 17.- Harris, G. and Ricketts, R.W.
STUDIES OF NON-BIOLOGICAL HAZES OF BEERS., X part, WIDER ASPECTS OF THE NYLON TREATMENT OF BEERS., J. Inst. - Brew., 66 (1960) p. 313.
- 18.- Kringstad, H. and Damm, E.
SEPARATION OF HAZE-PRODUCING SUBSTANCES FROM BEER - BY MEANS OF GEL-FILTRATION., E.B.C. Proceedings of the Congress; Stockholm (1965) p. 129.

- 19.- Scriban, R., Stienne, M. et Strobbel, B.
LE RÔLE DES EFFECTEURS DANS LE TRAITEMENT PROTEOLYTIQUE
DE LA BIÈRE., E.B.C. Proceedings of the Congress; Interlaken (1969)
p. 397.
- 20.- Thompson, C.C. and Forward, E.
EUROPEAN BREWERY CONVENTION: HAZE AND FOAM GROUP.
TOWARDS THE CHEMICAL PREDICTION OF SHELF - LIFE., J. ---
Inst. Brew., 75, (1969) p. 37.
- 21.- Harris, G. and Ricketts, R.W.
STUDIES ON NON-BIOLOGICAL HAZES OF BEERS. VIII part. RA
PID ESTIMATION OF ANTHOCYANOGENS IN BEER, J. Inst. ---
Brew., 65 (1959) p. 331.
- 22.- Bishop, L.R.
THE MEASUREMENT OF TOTAL POLYPHENOLS IN WORTS AND -
BEERS, J. Inst. Brew., 78 (1972) p. 37.
- 23.- Ribereau-Gayon, J.
ENOLOGIA, Salvat Editores; Madrid (1954).
- 24.- Ullmann, Fritz, Dr.
ENCICLOPEDIA DE QUIMICA INDUSTRIAL, Editorial Gustavo Gili,
S.A.; Barcelona (1908).
- 25.- Notas personales recabadas durante el entrenamiento técnico en la Cerve
cería Musashino de Suntory Ltd. en Japón.

REFERENCIAS

- 1.- Allouf, F., Munier, R. y Macheboeuf, M.; Proc. Eur. Brew.- Conv., Nice, 1953, 38.
- 2.- Bengough, W. I. y Harris, G.; J. Inst. Brew, 1955, 134.
- 3.- Biserte, G., Scriban, R. y Poque, M.T.; Brasserie, 1959, 14, 243.
- 4.- Bishop, L.R.; J. Inst. Brew, 50 (1944) 244
- 5.- Bishop, L. R.; J. Inst. Brew, Vol. 78 (1972) 37 y 38.
- 6.- Bishop, L. R.; Proc. Eur. Brew Conv., Lucerne (1949) 244
- 7.- Brauwissenschaft, 1955, p. 101
- 8.- Brygmestern, 12 (1955) 37 y 65.
- 9.- Carutti, G.; Birra e Malto, Feb. 1959, 30.
- 10.- Chapon, L.; Int. Tijds. Brouw. Mout., (1962) 22, 32.
- 11.- Charin, S. y Malzew, P., a través de Wock. Brau. (1938) 55, 191.
- 12.- Claesson, S. y Sandegren, E.; Investigations of Haze in Beer; E.B.C. Proceedings of the Congress, Brussels 1963, 221.
- 13.- Curtis, N. S.; Proc. Eur. Brew. Conv., Stockholm 1965, 423.
- 14.- Debaisieux, P.; Bull. Assoc. Éc. Brass., Louvain 1945, 41-2.
- 15.- Enders, C., Saji, T. y Haitay, B.O.; Wochschr. Brau. 1939, (56)-329.

- 16.- Gray, P.P. y Stone, I.; J. Inst. Brew (1958) 253.
- 17.- Hall, R. D., Harris, G. y Ricketts, R. W.; J. Inst. Brew 1959, 247.
- 18.- Hartong, B.D. ; Proc. Eur. Brew. Conv., Lucerne 1949, 56.
- 19.- Harris, G. y Ricketts, R. W.; J. Inst. Brew, 1959, 252.
- 20.- Harris, G. y Ricketts, R. W.; J. Inst. Brew., 65 (1959) 331-3.
- 21.- Hartong, B. D., Enders, C. y Saji, T.; Wochschr Brau. 55 (1938) - 132.
- 22.- Lamsen; Western Brewer, 46 (1916) 149.
- 23.- Le Corvaisier, H.; Bull. Assoc. Éc. Brass., Louvain 49 (1953) 17.
- 24.- Lhoest, W., Lontie, R. y de Clerck, J.; Bull. Assoc. Éc. Brass., Louvain 49 (1953) 121.
- 25.- Ljungdahl, L. y Sandegren, E.; Proc. Eur. Brew Conv., Baden - Baden, 1955, 98.
- 26.- Mendlik, F.; J. Inst. Brew., 1950, 134.
- 27.- Moufang, E.; J. Inst. Brew., 1913, 321.
- 28.- Proc. Amer. Soc. Brewing Chemists, 1952 (p. 98) y 1953 (p. 119).
- 29.- Sandegren, E.; Proc. Eur. Brew. Conv., Copenhagen, 1957, 23.
- 30.- Scriban, R. ; Brasserie, 11 (1956) 191 .
- 31.- Scriban, R., Stienne, M. y Strobbel, B.; Proc. Eur. Brew. Conv., In terlaken 1969, 397.
- 32.- Swain, T. : "Chem. and Ind.", 1954, 1144.
- 33.- Thompson, C.C. y Forward, E. ; J. Inst. Brew. 75 (1969) 37.
- 34.- Trolle, B.; Proc. Eur. Brew. Conv., Lucerne 1949, 32.

- 35.- Urion, E., Chapon, L., Chapon, M.S.A. y Metche, M.; Proc. Eur.-Brew. Conv., Copenhagen 1957, 281.
- 36.- Van Roey, M. G.; Bull. Assoc. ÉC. Brass., Louvain 1949, (45) 53.
- 37.- Waldschmidt - Leitz, E.; Proc. Eur. Brew. Conv., Copenhagen 1957, 141.
- 38.- Wallerstein, L.; U. S. Patents Nos. 995, 820 y 995, 823- 6 (1911); - Proc. 2º Internat. Brewers Congress, Chicago I (1911) 294.
- 39.- Woof, J. B. y Pierce, J. S. : EBC Proceedings of the Congress; Madrid 1967, 365.
- 40.- Wührer, P.; Birra e Malto, Mar. 1954, 25.