

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE OXIGENO E INOCULO  
OPTIMOS EN MOSTO CERVECERO



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
GEORGINA SOLIS MARTINEZ

México, D.F.

1977



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.

Tesis  
ABO  
FECHA 1977  
PROG. Mt.

375



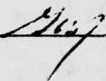
PRESIDENTE: ENRIQUE GARCIA GALIANO  
VOCAL: ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN  
SECRETARIO: JORGE SOTO SORIA  
PRIMER SUPLENTE: RUBEN BERRA GARCIA-COSS  
SEGUNDO SUPLENTE: ALEJANDRO GARDUÑO TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA:

Planta Piloto de la Cervecería Modelo S.A.


NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

Georgina Solís Martínez.

  
\_\_\_\_\_

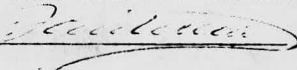
NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS:

Enrique García Galiano.

  
\_\_\_\_\_

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR TECNICO:

José Luis Santillan Salazar

  
\_\_\_\_\_

A mis padres

A mis hermanos

A mi escuela y maestros

## I N D I C E

	PAG.
I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	3
Materias primas.....	5
Operaciones del malteo.....	7
Elaboración de mosto.....	11
Fermentación.....	19
Oxígeno disuelto en mosto.....	27
III. EXPERIMENTACION Y METODOS.....	45
IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	57
V. BIBLIOGRAFIA.....	69
Generalidades (libros).....	69
Generalidades (revistas).....	69
Métodos (libros).....	72
Métodos (revistas).....	72

## C A P I T U L O I

### INTRODUCCION

Actualmente la industria cervecera en nuestro país ha ido incrementando su producción y calidad, motivado ésto por la mayor demanda de un creciente mercado y de la inquietud de sus técnicos por ofrecer al consumidor un buen producto.

Dentro de la elaboración de la cerveza, la fermentación alcohólica es una etapa de suma importancia tanto para la eficiencia de la planta - como para alcanzar las características organolépticas deseadas en el producto; es por eso necesario revisar continuamente los parámetros que la afectan como son: la calidad del extracto, la cepa de levadura, temperatura de inoculación, pH al que se encuentra el mosto, cantidad de oxígeno inicial, etc.

La finalidad de este estudio está encaminada a la obtención de la cantidad de inóculo de levadura óptima para una eficiencia adecuada en la fermentación y una buena calidad del producto, así como la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto para propiciar adecuados arranques en los ciclos fermentativos que influyen también en la eficiencia de la planta.

Para ésto se desarrollaron una serie de experiencias a nivel de -

escala piloto en la planta piloto de la Cervecería Modelo, S.A., efectuando todos los análisis necesarios en el laboratorio de dicha planta, esperando que los resultados obtenidos sean aplicables o sirvan de guía en la escala industrial.



## C A P I T U L O   I I

### GENERALIDADES

La historia de la cerveza narra que la primera región en la que se elaboró esta bebida fue la Mesopotamia, tres mil años antes de nuestra era. Se llamó vino de malta, vino de cebada, cervisia, etc. y es lógico pensar que los métodos de elaboración hayan sido primitivos; sin embargo, ya en esa época se exigía que fuese brillante y clara y para lograrlo se filtraba por medio de arcillas.

Fueron los egipcios los que la perfeccionaron agregándole pequeñas cantidades de sustancias amargas.

Los celtas la relacionaban con la salud humana, llamándola cervisia, vocablo que se deriva de una doble raíz: de "cera", Ceres, deidad benevolente y pródiga de las cosechas y los cereales y de "vis", la fuerza; es decir la cerveza era tanto como la energía, la fuerza que otorgaba Ceres.

Durante el medievo, la elaboración de la cerveza fue una labor familiar encomendada a la mujer o a un grupo de monjes. Los campesinos y burgueses aprendieron pronto a hacer cerveza, se constituyeron en uniones gremiales y más tarde en 1258, los cerveceros de París fundaron una organización cuyo reglamento fue publicado diez años después en "El Libro de los --

Oficios" por el preboste Etienne Boileau. Este reglamento fue redactado -- primordialmente con el propósito de asegurar a los consumidores materias -- primas "buenas y leales".

En el México precolombino existían algunas bebidas que, dentro de lo rudimentario de su preparación, tenían cierta similitud con la cerveza.- Una de ellas era el tesgüino, llamado también tejuino o izquiate, que es de un claro y lindo color ámbar, más denso que ligero, y que se bate con un molinillo antes de beberse para que levante gran espuma; otra, el sendecho, - que era semejante al bier de los antiguos germanos, sólo que éstos utiliza- ban la cebada en lugar del maíz, y del que aseguraban los cronistas que "daba vigor al cuerpo, quitaba males y no embriagaba".

En 1825 se fija la existencia de pequeñas fábricas de cerveza en varias ciudades del interior del país, y en 1845 se habla de cervecerías de fermentación alta en la capital. La malta que se empleaba era hecha de ce- bada mexicana, secada al sol y que mezclada con piloncillo, constituía la - materia prima para fabricar la cerveza.

Actualmente se puede definir a la cerveza, como una bebida refres- cante, producto de la fermentación alcohólica a base de azúcares fermenta- bles que provienen de cereales malteados y adjuntos; y que contiene entre - otras materias primas, lúpulo que le proporciona su amargor característico, la cual debe contener ciertas cualidades organolépticas como cuerpo, clarí- dad, sabor fresco, brillantez, espuma cremosa y durable, así como un olor - muy agradable.

## MATERIAS PRIMAS

Las materias primas en la elaboración de la cerveza son: malta, - adjuntos y lúpulo. También se debe considerar al agua dentro de este grupo, ya que siempre se encuentra efectuando una acción determinante en cada proceso en que interviene.

AGUA.- Para que sea empleada en una cervecería debe tener la pureza del agua potable, es decir, estar libre de: olores y sabores objetables, proporciones inadecuadas de materias suspendidas, materiales orgánicos descompuestos, bacterias indeseables y cantidades excesivas de sílice y hierro. Su importancia en el proceso radica en que las sales que contiene se encuentran en forma iónica, existiendo además la acción recíproca entre los iones del agua y los iones procedentes de las materias primas, siendo la suma de los iones individuales el efecto final.

La materia orgánica no influye en el proceso, pero cantidades excesivas indican contaminación, siendo ésto un peligro si se usa para lavar la planta, las tinajas, etc.

La influencia más importante de las sales disueltas en el líquido es su acción en el pH del mosto y de la cerveza; por ejemplo, un pH alto es desfavorable para algunas reacciones en el proceso, como en la maceración, - donde la sacrificación no se realizará completamente, la separación de los granos agotados se hará difícil y lenta y el rendimiento del extracto será menor.

MALTA.- Es una cebada de buena calidad, en la que se ha desarrollado un proceso de germinación controlada, en este estado se le conoce como malta verde, la cual después de pasar por el secado y limpieza está lista para embarcarse a la cervecería.

Algunas de las razones por las que se escogió a la cebada, se deben a su morfología, pues posee una cascarilla o cubierta que protege al embrión durante ciertas etapas del proceso; además dicha cascarilla forma un lecho muy aceptable para la filtración del mosto. Otro motivo se debe a -- que es un cereal de distribución mundial que tolera diferentes condiciones climatológicas.

Botánicamente pertenece a la familia de las Gramíneas y atendiendo a su morfología, se clasifica en:

- a) Cebada de dos hileras
- b) Cebada de seis hileras

Aunque existen cebadas de cuatro hileras, éstas se consideran -- dentro del grupo de seis hileras.

Las cebadas de dos hileras son las mejores para la cervecería, lo cual se debe al poco contenido de cascarilla y alto poder diastático; reciben también el nombre de cebadas de primavera por la época en que son sembradas generalmente en Europa.

Las cebadas de seis hileras, aunque con mayor contenido de casca-

rilla que el tipo anterior (lo cual favorece la filtración del mosto), son ampliamente usadas y reciben entonces el nombre de cebadas de verano.

Químicamente el grano está constituido por: almidón, proteínas, celulosa, hemicelulosa, gomas, pectinas, pentosanas, otros azúcares, lípidos cenizas, taninos, fitina y agua.

### OPERACIONES DEL MALTEO

- 1.- Limpieza y selección de la cebada.
- 2.- Remojo.
- 3.- Germinación.
- 4.- Secado.
- 5.- Limpieza de la malta seca.

1.- La limpieza y selección del grano se efectúan por medio de máquinas cribadoras o tamizadoras.

- 2.- Las condiciones esenciales para provocar la germinación son:
- a) Humedad de 45%
  - b) Temperatura de 15 a 20°C
  - c) Aereación.

Para lograr la primera condición, la cebada llega a la sección de remojo, (tanques cónicos) en donde normalmente permanece durante 24 horas, a manera de llevar la cebada de humedades de 10-12% que trae al recibo a humedades de 40 a 45%.

3.- Durante el proceso de germinación, se modifican los componentes químicos del grano, activándose las enzimas naturales contenidas en él y desarrollándose otras durante su proceso, mismas que después de ser liberadas actúan sobre el almidón y las proteínas para hacerlas solubles, desdoblado al almidón para convertirlo en oligosacáridos y éstos a su vez en disacáridos (maltosa en este caso).

Las principales enzimas desarrolladas son las diastاسas, que transforman el almidón en maltosa.

El control de la germinación se efectúa mediante rocío, aereación y temperaturas adecuadas. El proceso normalmente tiene una duración de seis días a temperaturas de 15-20°C, con aereación constante, con una humedad relativa de 95-98% y con riegos escalonados de acuerdo con la germinación misma.

4.- Secado.-En este paso el factor más importante es la temperatura, ya que de ésta depende que las enzimas desarrolladas durante el proceso de germinación, permanezcan latentes y no se eliminen, anulando totalmente el objeto del mismo, ya que debe ser una temperatura suficiente y adecuada para que la malta alcance una humedad final de 4%.

Después del proceso de germinación, la malta pasa por dos períodos de secado; en el primero, se lleva a la parte superior del secador (primer piso) en donde permanece durante 24 horas llevando la humedad hasta 12% aproximadamente. Después es transferida al segundo piso en donde continúa su secado por otras 24 horas hasta lograr alcanzar la humedad requerida de

4%.

5.- Limpieza de la malta seca.- Se le quita pajillas, raicillas - tostadas, polvo, etc., por medio de otra criba similar a la usada en la -- limpieza de la cebada, con el objeto de dejarla limpia para su envío a la - cervecería.

Lo anterior se muestra en el diagrama número 1.

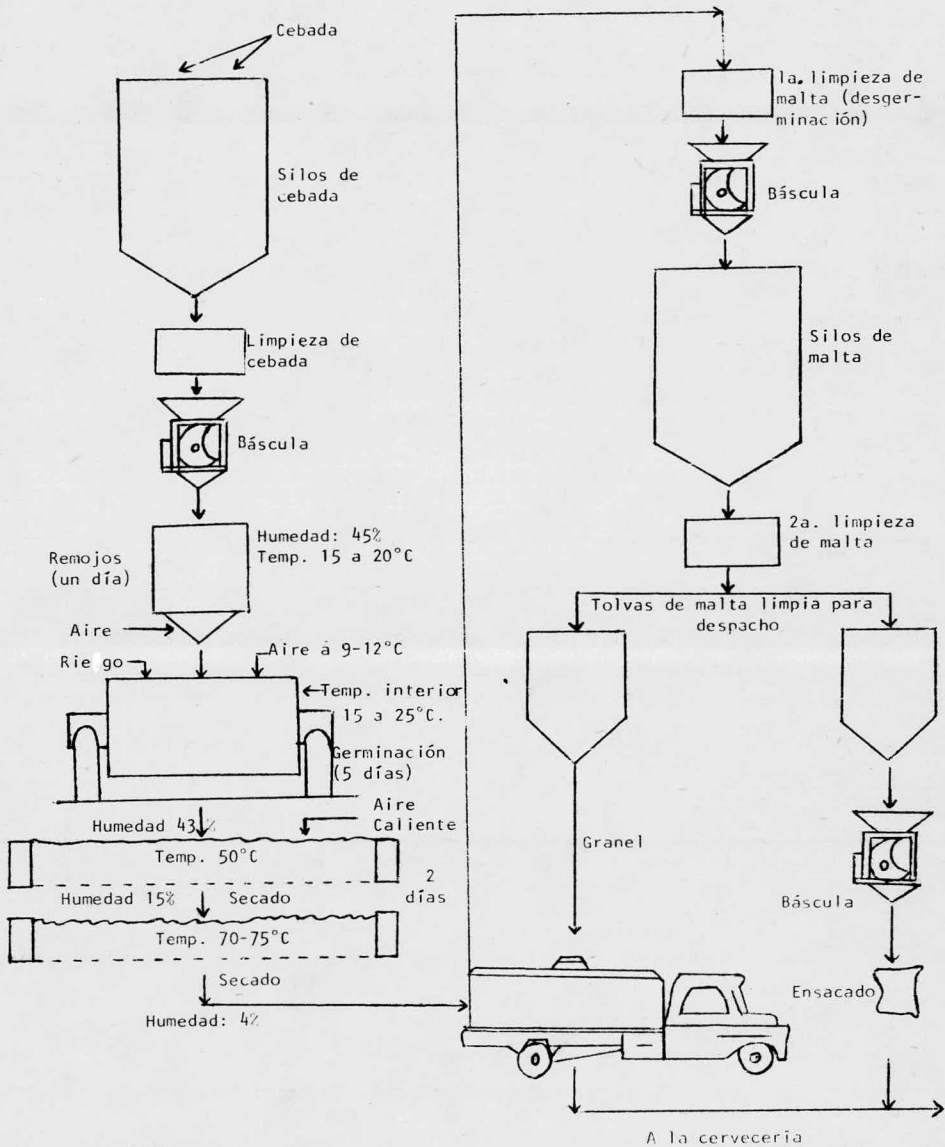
ADJUNTOS.- Se emplean para corregir la composición del extracto y o reducir costos. Los principales en cervecería son el arroz y el maíz.

El arroz es el cereal con mayor contenido de almidón y por consi-- guiente, proporciona un alto extracto (77-83% y más del 90% calculado en pe so seco), como sus gránulos son los más pequeños, son los más difíciles de- sacarificar.

Otros adjuntos son la tapioca, trigo y azúcares como glucosa, azú car invertido y sacarosa.

LUPULO.- El lúpulo (Humulus lupulus) es una planta trepadora -- que pertenece a la familia Moraceae y al orden Urticales. En cervecería só lo se usa la flor femenina. Durante su desarrollo, las glándulas lupulinas que tienen sus conos secretan varias resinas o ácidos amargos cristalinos,- siendo las principales: humulona y lupulona.

DIAGRAMA NUMERO 1: MALTEO





La humulona o ácido alfa o resina alfa es una mezcla de tres compuestos íntimamente relacionados: humulona, cohumulona y adhumulona.

La lupulona o ácido beta o resina beta, consiste de por lo menos dos componentes: lupulona y colupulona y hay evidencia de la existencia de un tercer componente: adlupulona.

El poder amargo y antiséptico del lúpulo se debe a estos dos complejos y su presencia no se ha encontrado en ninguna otra planta.

El complejo humulona es el principal principio amargo en el lúpulo y también tiene un valor preservativo más alto que el complejo lupulona.

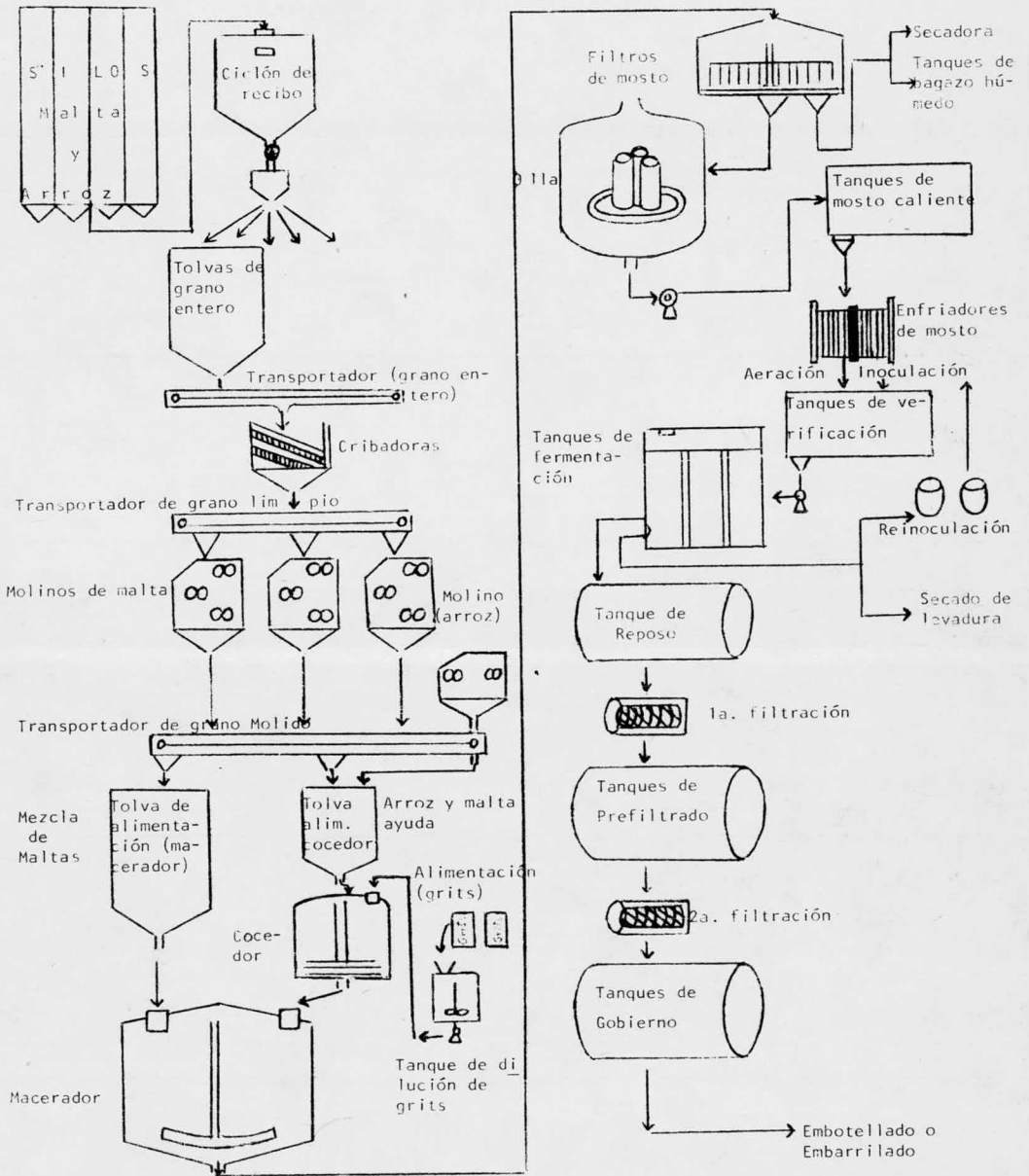
Además de resinas, la lupulina secreta también aceites esenciales, los cuales son responsables del aroma del lúpulo y la cerveza.

#### ELABORACION DE MOSTO

El mosto es un líquido fermentable y en el caso de elaboración de cerveza, se obtiene a partir de malta y adjuntos, para lo cual se efectúan ciertas operaciones, las cuales están representadas en el diagrama número 2 y que son:

1.- ALMACENAMIENTO.- Se hace en silos de donde se va tomando la cantidad necesaria para una buena formulación.

DIAGRAMA NUMERO 2: ELABORACION DE CERVEZA



2.- LIMPIEZA.- Para eliminar por medio de ventiladores, cribadoras y separadores magnéticos, las impurezas que pudiera contener el grano y llegar listo a la molienda.

3.- MOLIENDA.- Se desea que la cascarilla se dañe lo menos posible, mientras que el endospermo es reducido a harina, para que la conversión sea lo más completa posible durante la maceración. Estas dos condiciones: cascarilla entera y harina fina sólo se pueden obtener con una malta correctamente modificada, por consiguiente la primera condición para una buena molienda es una buena modificación de la malta.

Una segunda condición para una molienda satisfactoria, es que la malta sea secada hasta 4% de humedad y en el caso de malta muy oscura al 1.5% ya que de lo contrario se apelmazará en los rodillos.

Un tercer prerrequisito es que la malta tenga tamaño uniforme.

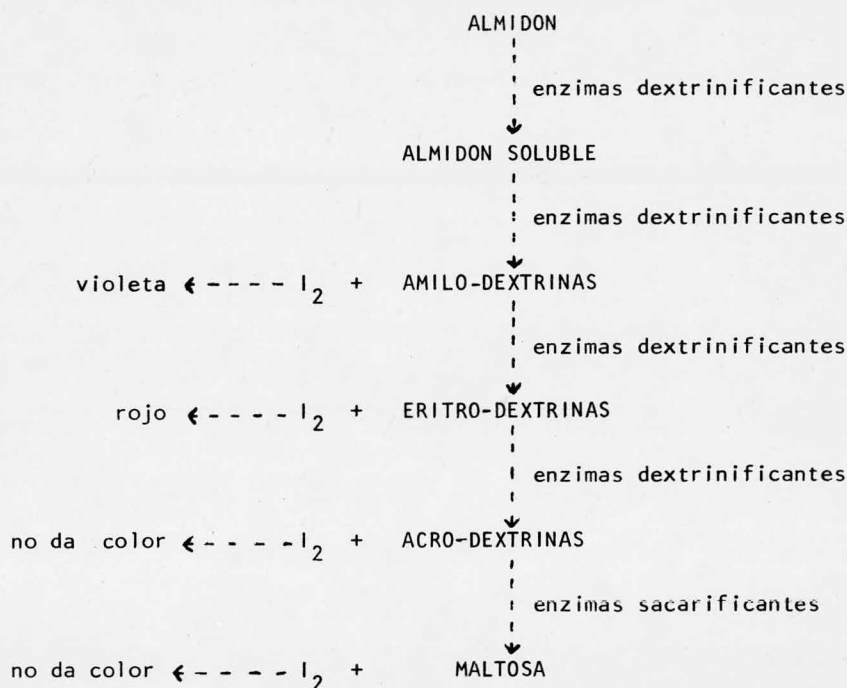
4.- MACERACION.- Tiene por objeto obtener una gran cantidad de extracto de la más alta calidad posible. Las reacciones que ocurren se llevan a cabo en equipos llamados cocedor y macerador.

El cocedor es un tanque de dimensiones variables, provisto de un sistema de agitación y otro de calentamiento. En este reactor se lleva a cabo la gelatinización del almidón. La temperatura de gelatinización varía con el tipo de almidón y el tamaño de los gránulos. Esto se nota fácilmente debido a los cambios de viscosidad que sufre una suspensión de almidón al ir elevando gradualmente la temperatura, durante estos momentos se efec-

túa una hinchazón de la molécula y ésto se observa claramente en el microscopio. Anteriormente se atribuía la licuación a la fosfatasa y la amilofosfatasa, pero actualmente se ha aclarado que dicho fenómeno se debe principalmente a la acción enzimática de la alfa amilasa. Para licuar es necesario que exista una gelatinización anterior. La temperatura óptima de la alfa amilasa es de 70°C con un pH de 5.8, siendo destruída rápidamente a 80°C. La beta amilasa trabaja al máximo a un pH de 5.4 y a una temperatura de - - 65°C.

Durante la maceración primero se lleva a cabo una etapa llamada - peptonización, la cual ocurre entre los 45 y 50°C y no es más que la degradación de la materia nitrogenada. Previo a ésto se tiene una pausa a 30°C, denominada reposo láctico, en el cual se busca la solubilización del cuerpo harinoso de la malta. La sacarificación es la conversión del almidón gelatinizado a dextrinas y maltosa y puede tener lugar sólo si anteriormente el almidón fue licuado.

Para saber el momento en el cual la sacarificación se completó, - se hacen pruebas para ver la coloración que se forma al mezclar los productos de degradación del almidón con el iodo, así se tiene;



Puede decirse que la sacarificación se llevó a cabo, cuando no da coloración con el iodo.

En la gráfica número 1 tenemos los límites de actividad enzimática durante la maceración.

5.- FILTRACION DE MOSTO.- Se efectúa en dos pasos:

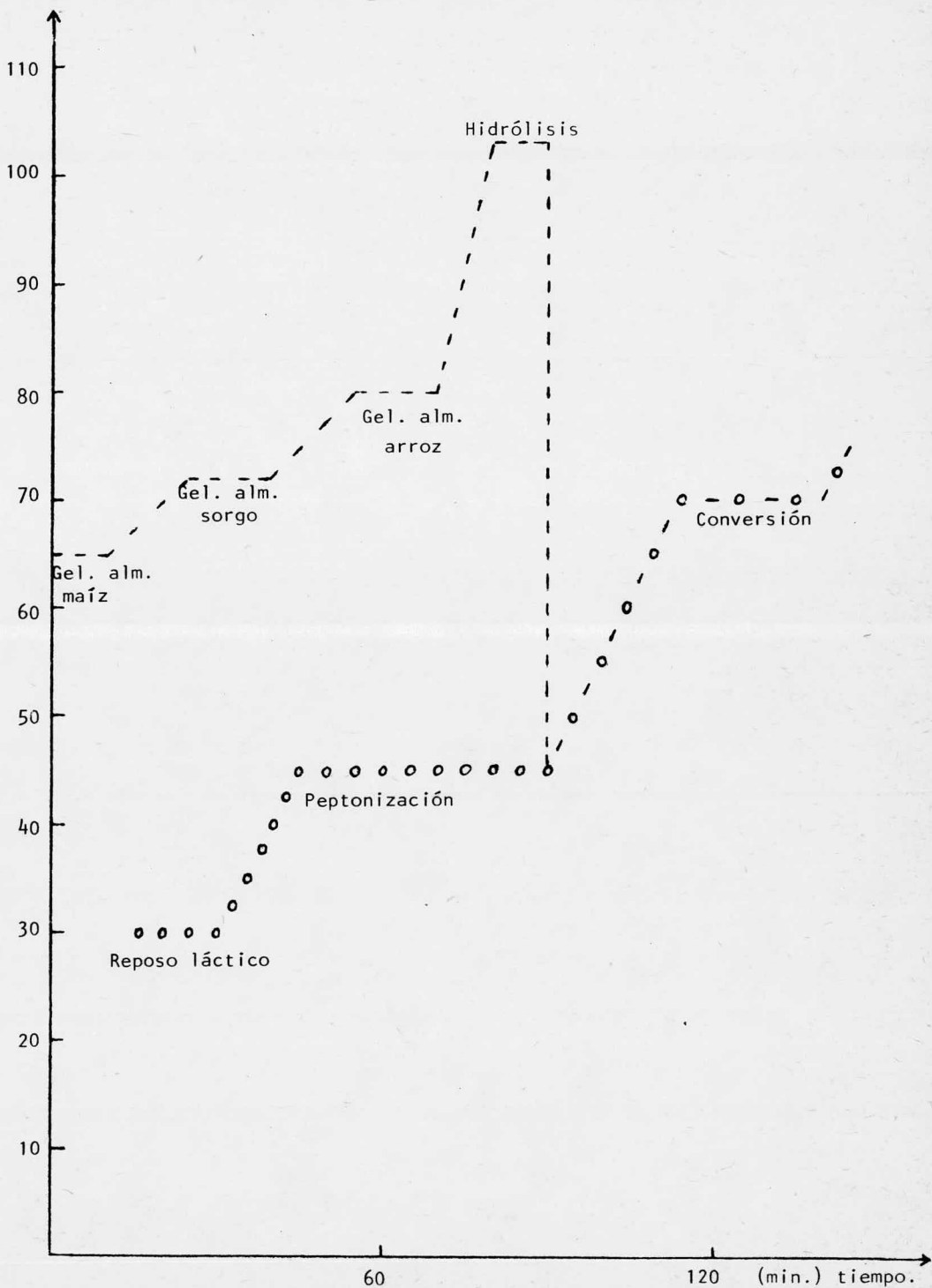
1º.- El mosto es desalojado y

2º.- Los granos suspendidos son rociados para eliminar el mosto que tenían absorbido. Se debe tener cuidado ya que se ha observado que la oxidación del mosto tiene un efecto desfavorable en la calidad final de la cerveza, el mayor peligro a la oxidación se tiene durante el rociado, debido a la presencia de los taninos en la cascarilla; la velocidad de oxidación

GRAFICA NUMERO 1. ACTIVIDAD ENZIMATICA EN EL COCEDOR Y EL MACERADOR.  
 CERADOR.

- - - cocedor
- o o o macerador
- o-o mezcla total

Temp. ° C.



aumenta rápidamente cuando el pH se incrementa. En la práctica este fenómeno se puede prevenir en el rociado, manteniendo el nivel del líquido arriba de la cama filtrante.

Los factores que hacen que el mosto filtre rápidamente son: una molienda no muy fina (por consiguiente la malta debe estar bien modificada), una adecuada degradación de las proteínas en la maceración y tal vez una completa conversión del almidón.

6.- OLLA DE COCIMIENTOS.- Algunos de los principales objetivos en esta operación son:

- 1.- Coagulación de las proteínas
- 2.- Esterilización del mosto y destrucción de enzimas
- 3.- Extracción de los principios del lúpulo
- 4.- Concentración del mosto
- 5.- Estabilización del mosto para evitar cambios inesperados durante el procesamiento posterior.
- 6.- Formación de sustancias coloridas.

En la olla de cocimientos se agregan otros materiales como:

Acidos.- con el propósito de reducir el pH del mosto.

Sulfitos.- para evitar el aumento de color del mosto durante la ebullición. Si se agrega en exceso, pueden producirse cervezas que tienden a "azorrillarse" y para evitar esto, hay que hervir vigorosamente para que el  $\text{SO}_2$  se elimine. Si se utilizan hidrosulfitos, éstos tienden a incrementar el coágulo formado en la olla.

Cloruro de sodio.- con el fin de suavizar el sabor de la cerveza.

Carbón activado.- entonces la levadura tenderá a ser más oscura, debido a que va a absorberlo, también tiende a mejorarse la estabilidad coloidal de la cerveza.

Musgo irlandés.- se usa sobre todo cuando se tiene problemas de turbiedades finas, originadas por materiales mal modificados.

Goma arábiga.- Se ha hecho algunas veces suponiendo que ésto favorece la retención de espuma en el vaso.

Colorante.- Cuando el colorante tiene un alto contenido de hierro, es conveniente agregarlo en este momento, para que salga precipitado junto con las heces que se forman durante el hervor.

Azúcar.- se hace lentamente con el propósito de que no se concentre demasiado en una sola zona y pueda caramelizarse. El uso de cantidades excesivas tiende a afectar las características de floculación de la levadura.

Jarabes.- porque se cree que forman complejos entre la levulosa y algunos aminoácidos. Están hechos a base de azúcar invertido de caña.

Calcio.- para hacer la cerveza menos propensa al gushing, se agrega en forma de cloruro o de sulfato.

Zinc.- para que la levadura disponga de este material que actúa como cofactor durante la fermentación, en la cual el zinc va a ser totalmente eliminado sin aparecer ningún residuo en el producto final. También se sabe



que durante la fermentación este metal provoca que se liberen cantidades menores de sulfuro de hidrógeno, que en un momento podría actuar como precursor de mercaptanos.

7.- TANQUES DE MOSTO CALIENTE.- en estos tanques se busca eliminar parte del coágulo formado durante la ebullición en la olla.

8.- ENFRIAMIENTO DE MOSTO.- ocurre una reducción en el volúmen al cambiar la temperatura, la cual es del orden del 4%. Existen enfriadores -- abiertos y enfriadores cerrados. En los abiertos hay mayor evaporación y la eficiencia de enfriamiento es menor si se le compara con los cerrados, además ofrecen la posibilidad de eliminar compuestos aromáticos presentes en el mosto, cosa que en el enfriador cerrado no se puede hacer. Una de las mayores desventajas que presenta el enfriador abierto es la contaminación, ya que -- por más que se tenga sistemas de filtración de aire elaborados para alimentar la habitación donde se encuentran los enfriadores abiertos, o se usan sistemas de lámparas ultravioleta siempre existirán condensaciones que van a tender a caer nuevamente en el mosto enfriándose.

Una vez enfriado el mosto está listo para pasar a la fermentación.

## FERMENTACION.

La fermentación es un proceso metabólico que se caracteriza por la degradación incompleta de los hidratos de carbono; dependiendo de cuales sean los productos principales formados, se habla de fermentación cítrica, oxá-

lica, etc. Las fermentaciones de este tipo se llaman fermentaciones oxidativas porque el oxígeno sirve como aceptor, mientras que otras fermentaciones en las cuales el aceptor es otra sustancia diferente al oxígeno, como por ejemplo los aldehidos en especial, se llaman fermentaciones de escisión, o fermentaciones anoxidativas.

Así tenemos la siguiente clasificación:

Fermentaciones anoxidativas	}	Fermentación alcohólica
		" láctica
		" propiónica
		" butírica
Fermentaciones oxidativas	}	Fermentación acética
		" cítrica
		" fumárica
		" oxálica

La fermentación seguida en el proceso cervecero es la alcohólica, que consiste en la hidrólisis del azúcar a anhídrido carbónico y etanol al resguardo del oxígeno libre. Entre los organismos capaces de producir fermentación alcohólica están: *Saccharomyces* y otras especies de levaduras, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Cándida* y ciertas especies de *Mucor* y algunas bacterias.

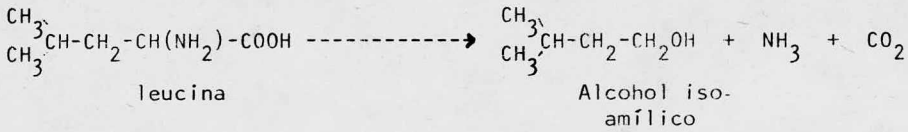
Traube (1) opinaba que la fermentación alcohólica se debe a enzimas que son producidas por células de levadura; pero fue Buchner (2), quien aportó la prueba verdadera, para lo cual separó las enzimas de las células -

de levadura, triturando estas últimas con polvo fino de cuarzo y exprimiendo el líquido bajo una presión muy elevada. Este líquido resultó ser capaz de someter una solución de azúcar a una fermentación potente y breve. La enzima de este líquido se llamó zimasa.

Esto demuestra que no son las células de levadura como tales, sino las enzimas en el protoplasma celular las que producen la fermentación.

—La levadura es un organismo unicelular de forma ovalada con diámetro de 5 a 10 micras; su principal fuente de energía es la oxidación de los azúcares a alcohol y  $\text{CO}_2$ . Aún cuando la respiración anaeróbica es normal -- tratándose de levaduras, debe estar presente cierta cantidad de oxígeno. -- Cuando éste es abundante, todos los azúcares fermentables, así como los ácidos, aldehidos y alcohol son oxidados a agua y  $\text{CO}_2$ . Las hexosas que la levadura puede fermentar directamente son: d-glucosa, d-fluctosa, d-manosa y ocasionalmente d-galactosa. Los disacáridos como la maltosa y sacarosa y los trisacáridos como la rafinosa, sólo pueden ser fermentados si existen las enzimas necesarias en la célula para hidrolizar estos azúcares o hexosas.

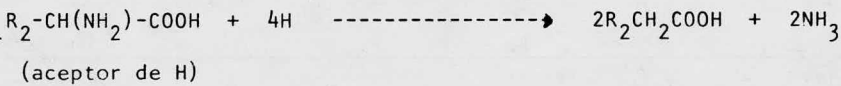
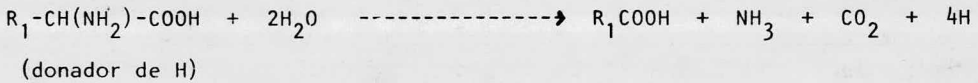
Desde 1806, Pasteur mostró que la levadura puede utilizar el amoníaco como única fuente de nitrógeno y a partir de él, formar todos sus compuestos nitrogenados necesarios. Más tarde, Erlich (3) encontró que cuando se suministra a la levadura un aminoácido individual como fuente de nitrógeno, el microorganismo desamina y descarboxila a la molécula, con la formación de un alcohol con un átomo menos de carbono que el aminoácido, y usa el amoníaco liberado para efectuar los procesos anabólicos en su metabolismo de nitrógeno.



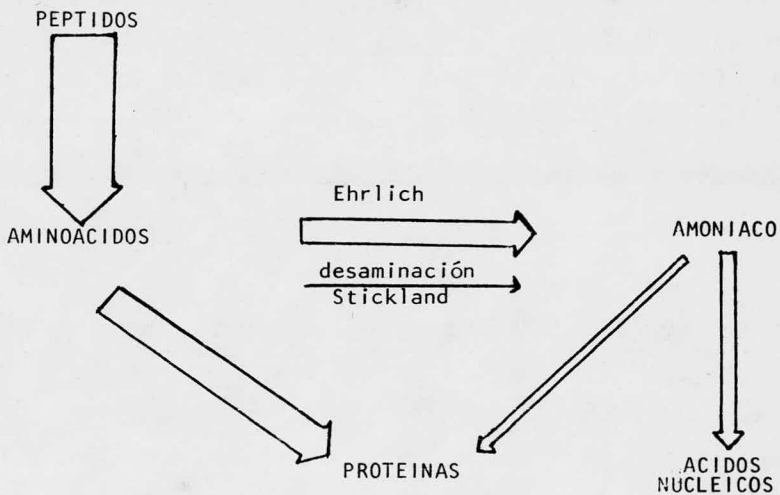
Los resultados de Erlich fueron confirmados por Thorne para otros-aminoácidos.

El punto principal de esta teoría es que el amoníaco es el compuesto inicial requerido por la célula de levadura para su metabolismo del nitrógeno.

Entre más compleja es la mezcla de aminoácidos aumenta más rápido-la velocidad de asimilación, según la reacción de Stickland:



La hipótesis de Thorne de asimilación de nitrógeno por la levadura de cerveza se representa como sigue:



El grosor de las flechas indica la importancia relativa de los diferentes mecanismos de operación.

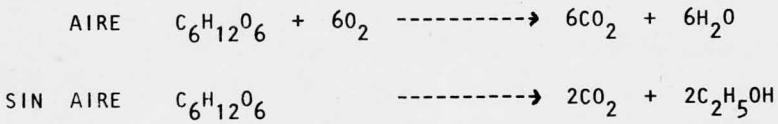
Algunas levaduras también pueden usar urea y nitratos como fuente de nitrógeno sin embargo con nitratos, el medio de cultivo debe ser fuertemente aerado, ya que la levadura reduce los nitratos a nitritos que son tóxicos.

En fermentaciones cerveceras normales, el consumo de nitrógeno es siempre más rápido que la fermentación de azúcares y hay ciertas cantidades de excreción en el final de la fermentación.

El pH interno de la célula de levadura es muy constante, de 5.9 a 6.0, pero los ácidos formados por el microorganismo son excretados durante la fermentación y pueden reducir el pH del medio a 3 o aún a 2, si no ha sido regulado, pero en medio fuertemente regulado como es el mosto, el pH no

cae abajo de 3.9 a 4.4.

El mecanismo de la fermentación indica que la levadura respira aeróticamente en presencia de aire y efectúa una fermentación alcohólica en ausencia de éste.



Debido a que se destruye mucho menos azúcar en el proceso aeróbico, se dice que la respiración aeróbica es la oxidación del etanol formado durante la respiración anaeróbica a  $\text{CO}_2$  y agua.

Dependiendo de la variedad y condiciones externas una levadura puede fermentar sin multiplicarse o multiplicarse sin fermentar. La multiplicación de las células cesa mucho antes de que termine la fermentación.

La levadura de cerveza se divide en dos grupos principales: alta y baja. Para distinguirlas se agrega el trisacárido rafinosa al mosto. Las levaduras bajas fermentan completamente este azúcar, mientras que la levadura alta sólo fermenta la fructosa y deja un residuo de melobiosa.

Desde el punto de vista de atenuación, tenemos la clasificación siguiente:

Fluculante ----- atenuación débil  
No fluculante ----- atenuación fuerte.

Los cambios que se presentan durante la fermentación son:

1.- ATENUACION.- debida a que la gravedad específica del azúcar inicial es mayor a la gravedad específica del alcohol formado y a que el  $\text{CO}_2$  escapa como gas.

La atenuación depende casi totalmente del contacto entre la levadura y el mosto. El contacto es roto por la floculación cuando la levadura -- cae al fondo en las fermentaciones bajas o sube a la superficie en las fermentaciones altas. La raza de levadura y los constituyentes del mosto determinan la cantidad de floculación. La velocidad de expulsión del  $\text{CO}_2$  la cual es acelerada por la presencia de partículas amorfas, acelera la purga de la levadura en fermentaciones altas y la disminuye en las fermentaciones bajas.

2.- ACIDEZ.- la caída del pH durante la fermentación se debe a la formación de  $\text{CO}_2$  y ácidos orgánicos por la levadura, en el curso de sus actividades metabólicas, principalmente ácido láctico.

3.- MATERIA NITROGENADA.- la disminución del contenido de nitrógeno se debe a la asimilación de los aminoácidos y péptidos de molécula pequeña, también influye la precipitación de proteínas debido a la caída de pH, - la formación de alcohol y la concentración en la superficie de las burbujas de  $\text{CO}_2$  y las células de levadura. Invariablemente se encuentra la levadura cubierta con materia de origen protéico, combinada con resinas, taninos, etc.

El microorganismo excreta materia nitrogenada durante la fermentación; como se dijo antes, las mejores fuentes de nitrógeno son las sales de amonio y los aminoácidos. Nielsen y Hartelius (4) demostraron que la levadu-

ra no excreta nitrógeno en forma de sales de amonio, en consecuencia, usando éstas como fuente de nitrógeno y determinando separadamente amoníaco y nitrógeno que se encontrara en forma que no fuera amoníaco en el medio fermentado, se puede determinar la cantidad de nitrógeno excretado. Así se encontró que la levadura excreta aproximadamente un tercio del nitrógeno asimilado.

4.- DIOXIDO DE CARBONO.- su solubilidad depende de la temperatura y de la composición de la cerveza.

5.- OXIGENO Y rH.- la levadura absorbe rápidamente el oxígeno -- presente en el mosto y después de 48 horas de fermentación, el contenido de oxígeno es prácticamente nulo. El valor del rH, el cual expresa el grado de oxidación del mosto o cerveza; es mayor de 20 en mosto frío y cae a 10-11 - cuando empieza la fermentación activa.

6.- CAMBIOS MISCELANEOS.- las resinas del lúpulo son eliminadas no toriamente durante la fermentación por la caída del pH y por la adsorción en la superficie de las células de levadura.

El color siempre disminuye por la fermentación, debido en parte a la eliminación de materia colorida en la nata que se forma en la superficie, y en parte a la acción reductora de la levadura en los taninos oxidados.

Los métodos aconsejables para regular la fermentación son:

- 1.- La selección de la raza de levadura.
- 2.- Temperatura.
- 3.- La atenuación se puede acelerar por agitación, también se usa-



pasar el mosto a otro tanque después de unas horas de fermentación; últimamente se adiciona mosto fresco al mosto en fermentación, este proceso se llama en Alemania Darauflassen.

4.- El tamaño del tanque, ya que las atenuaciones más altas se obtienen en tanques pequeños porque hay un contacto estrecho entre el mosto y la levadura antes de que ésta sedimente.

5.- Para evitar autólisis, la levadura se debe almacenar a temperatura baja y por el tiempo más corto posible.

6.- La presencia de oxígeno.

#### OXIGENO DISUELTO EN MOSTO

La aereación de mosto caliente se ha practicado en varias cervecerías para mejorar la estabilidad a la turbidez en frío de la cerveza. Se practica casi siempre en conjunción con la filtración de mosto frío, y su principal objeto es oxidar y precipitar proteínas que forman turbidez, las cuales pueden entonces eliminarse por filtración antes de la fermentación, esta práctica aunque fue recomendada por Pasteur, tiene un efecto adverso en las substancias reductoras del mosto.

Se ha dicho que la apariencia microscópica de la levadura es la mejor guía para detectar un correcto nivel de oxigenación, debido al bien conocido fenómeno, de que los niveles incorrectos de oxígeno elongan las células, entre otros fenómenos morfológicos.

La levadura necesita oxígeno para la rápida reproducción, la cual debe ocurrir inmediatamente después de la inoculación; si el oxígeno es insuficiente en el mosto, el crecimiento será escaso, la fermentación será más lenta y la cosecha de levadura será menor de lo que se esperaba. (Fig. 1).

Una extra aereación del mosto que va a los tanques de fermentación o la aereación de la fermentación dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación, ha remediado muchos casos de debilitamiento del microorganismo.

El grado de aereación afecta la estructura, así como el contenido enzimático y la actividad de la levadura. La fermentación de la glucosa a etanol y dióxido de carbono, no requiere oxígeno y puede ocurrir anaeróbicamente.

Se conoce la necesidad de proveer ácidos grasos insaturados para el crecimiento anaeróbico; la levadura puede crecer por muchas generaciones en un medio favorable bajo condiciones anaeróbicas. El mosto no es favorable ya que contiene insuficientes ácidos grasos y esterol, y el uso de mosto no aereado proporciona progresivamente cosechas menores de levadura.

La cantidad de oxígeno necesario varía de acuerdo al tipo de levadura y a las condiciones de fermentación. Aunque el aire es usado comúnmente para la aereación, hay ventajas en el uso de oxígeno comprimido.

La formación de  $\text{CO}_2$  en la fermentación protege al mosto del exceso de oxígeno por lo que se obtienen cosechas de levaduras mayores en tanques descubiertos, puesto que los tanques cubiertos originan una superficie espumosa muy estable que llena el espacio y por consiguiente restringe el acceso

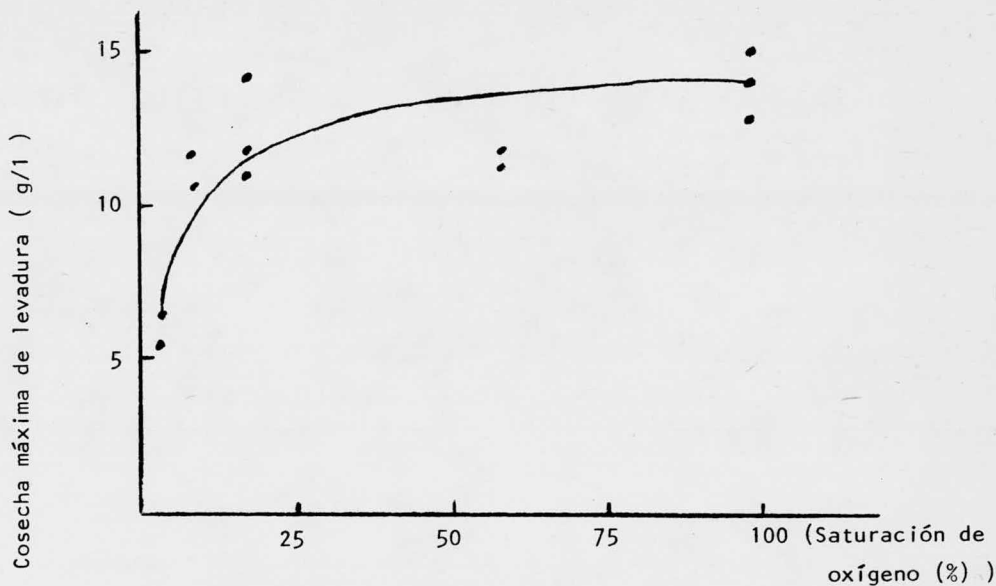


Fig. 1 Relación entre el % de saturación de oxígeno en mosto antes de la fermentación y la cosecha de levadura obtenida.

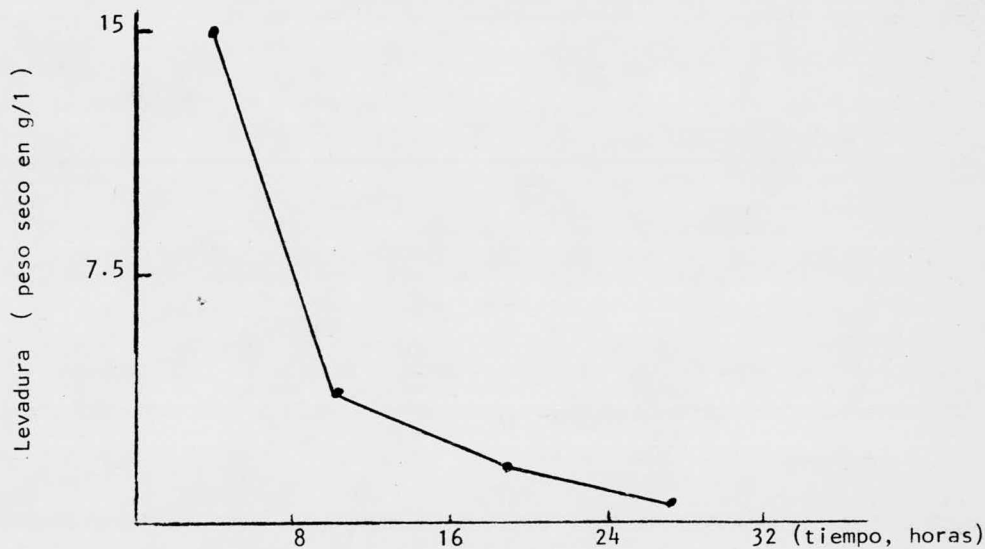


Fig. 2 Relación de tiempo requerido para llevar el mosto de 10 a 4º Plato y la cantidad de levadura presente.

de oxígeno.

Una observación importante en relación a la oxigenación, es que la levadura puede adaptarse rápidamente al uso de oxígeno y se ha sugerido que esto explica porque aún la levadura anaeróbica tiene algunos citocromos.

La cantidad de levadura adicionada al mosto al momento de la inoclación influye grandemente en la velocidad de fermentación. Por ejemplo, la levadura alta inoculada a 1 lb/brl ( 0.3 Kg/hl) en el mosto a 17° C atenúa a 75% en 84 horas; a 4 veces esta cantidad de inóculo se alcanza la misma atenuación en 44 horas.

Los resultados dados en la figura 2 muestran la relación entre la cantidad de levadura presente al comienzo de la fermentación y el tiempo requerido para la misma.

En conexión a la raza de levadura, 6 tipos de comportamiento han sido reconocidos:

Grupo A.- Levaduras que sedimentan muy tempranamente en la fermentación a causa de la floculación, pero la fermentación sigue por la acción continua del microorganismo sedimentado.

Grupo B.- levaduras que sólo sedimentan cuando el mosto esta bien atenuado y la fermentación cesa simultáneamente.

Grupo C.- levaduras que sedimentan en poca cantidad al final de la fermentación, dejando mucha levadura en suspensión,

Grupo D.- levaduras que pasan de la suspensión a la superficie al comienzo de la fermentación y ésta se detiene prematuramente.

Grupo E.- las que forman una superficie con levadura en cierta cantidad, pero mucha se queda en suspensión; cuando el mosto está bien atenuado, la levadura en suspensión se sedimenta.

Grupo F.- las que forman una superficie con levadura en cierta cantidad pero la mayor parte de ésta permanece suspendida y no sedimenta.

Existen diferencias en cuanto si se necesita o no agitar durante la fermentación. En el caso de levadura que flocula y sedimenta fuertemente, la agitación es esencial.

Otro tipo de información recopilada, es:

(1).y(2) Las características deseadas en la fermentación son:

- 1.- etapa lag corta antes del crecimiento exponencial.
- 2.- características apropiadas de floculación
- 3.- adecuado poder fermentativo.
- 4.- producción de sabor y olor característicos.

Durante la fase lag, el nitrógeno almacenado dentro de la célula es reorganizado para iniciar el metabolismo celular. Muchos aminoácidos forman enzimas vía dinucleótidos y se piensa que las mitocondrias y microsomas pueden ser centros activos de estas reacciones. La velocidad de la fermentación sólo se puede controlar por modificaciones externas, como lo son la composición del mosto, la cantidad de levadura adicionada, etc. y no haciendo a las células individuales efectuar más de lo intentado originalmente.

Bajo condiciones estrictamente anaerobias, el crecimiento del microorganismo está limitado a 4 ó 5 generaciones, pero trazas de oxígeno son suficientes para incrementar ésto apreciablemente. El número final de células de levadura por unidad de volúmen depende de la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto, pero no del tamaño del inóculo. Una aereación adecuada ayuda a la síntesis de maltasa, pero una sobreaeración puede conducir a un debilitamiento fisiológico de la levadura y a una excesiva floculación.

(3) La aereación de la levadura durante el almacenamiento aumenta la supervivencia del microorganismo. Si se usan células que no requieren oxígeno para producir levadura en condiciones estrictamente anaerobias, las células que se cosechan eventualmente son más grandes que las de crecimiento aeróbico, además la masa de levadura es más oscura que la cosechada de un mosto aereado y pierde su vitalidad más rápido que aquella levadura producida aeróbicamente.

Es posible que en fermentaciones contínuas y bajo ciertas condiciones de aereación, ocurra una elongación celular y en los propagadores que son aereados se produzcan células elongadas con algunas deformaciones. Cambios similares en la forma resultan de la alteración en la relación carbón asimilable y nitrógeno asimilable, y así como la cantidad de oxígeno puede alterar notablemente la habilidad de la levadura para utilizar los compuestos nitrogenados, parece que los efectos del oxígeno son probablemente indirectos.

No hay necesariamente una relación entre la forma de la levadura y la calidad de la cerveza producida, parece que un cambio en la forma refleja una relación entre la levadura y el medio de crecimiento.

Una aereación excesiva origina una disminución en la cosecha de la levadura y un aumento en la floculación.

La magnitud del oxígeno requerido se determina encontrando el oxígeno necesario para que crezcan las células que requieren este gas, en la misma cantidad que las células que no lo requieren. Cuando una levadura se hace crecer en medio aereado, posteriormente ya no requerirá aire, pues ya sintetizó los nutrientes indispensables, de modo que cuando se agrega al mosto aereado, su comportamiento servirá como patrón. La levadura a prueba se hace crecer en un medio anaerobio, por consiguiente necesitará oxígeno en el mosto, entonces se variarán las concentraciones del gas disuelto y se escogerá aquella cantidad con la cual se iguale al patrón.

La cantidad de oxígeno requerido varía considerablemente de una raza a otra y va de 2 a 30 ppm. Se proponen cuatro clases de ellas:

Clase 01.- levadura en la cual el requerimiento es satisfecho si el mosto tiene la mitad de saturación con aire.

Clase 02.- su requerimiento es satisfecho por mosto saturado de aire.

Clase 03.- su requerimiento es satisfecho por mosto saturado de oxígeno.

Clase 04.- su requerimiento no es satisfecho por mosto saturado de oxígeno.

El sufijo 0 anterior al número, es usado para distinguir estos grupos de las clases previamente reconocidas por otros trabajadores con respecto

a floculación y utilización de aminoácidos. Para encontrar la clase a la que pertenece una levadura, se añaden células que requieran oxígeno en el mosto que fue saturado con gas conteniendo concentraciones diferentes de oxígeno, como la cantidad de oxígeno disuelto varía con la temperatura y composición del mosto, las condiciones de prueba recomendadas envuelven el uso de mosto de malta (gravedad específica 1.040) a 20°C.

Si el mosto está saturado con aire, la concentración de oxígeno disuelto es proporcional a la presión parcial de oxígeno en el gas usado, siguiendo la Ley de Henry. Como el aire contiene aproximadamente 21% de oxígeno, la cantidad que está presente en el mosto saturado se incrementa por el factor 100/21 cuando se usa oxígeno en lugar de aire.

Si las necesidades de oxígeno son completamente conocidas, la velocidad de fermentación está usualmente determinada por el contenido de nitrógeno asimilable en el mosto, así se tiene que si el contenido de nitrógeno disponible aumenta, las necesidades de oxígeno se incrementan.

La velocidad del metabolismo de azúcar está influenciada por el abastecimiento de oxígeno, hasta el límite que esto afecta el tamaño de la población de levadura,

La existencia de oxígeno es primeramente una necesidad para los esteroides y el mosto típico de malta contiene cantidades adecuadas de ácidos grasos insaturados, ácido nicotínico y otros nutrientes esenciales para la levadura los cuales no pueden ser sintetizados anaeróbicamente.



El hecho de que la levadura que ha crecido en un medio aereado no necesite oxígeno, denota que el microorganismo tiene la capacidad de producir y almacenar esteroides en presencia de aire y también de reutilizarlos cuando se añade a un medio sin oxígeno.

(4) Se ha reportado la necesidad de agregar otras fuentes de nitrógeno asimilable, puesto que si hay suficiente oxígeno, pero el nitrógeno sólo proviene de la malta, se producen fermentaciones restringidas.

Las levaduras que crecen vigorosamente durante las primeras etapas de la fermentación, floccularán más tarde y viceversa. Se resume que el control de las primeras etapas de fermentación, cuando la levadura sigue el crecimiento exponencial, producirá buenos prospectos para controlar las características de la cerveza final.

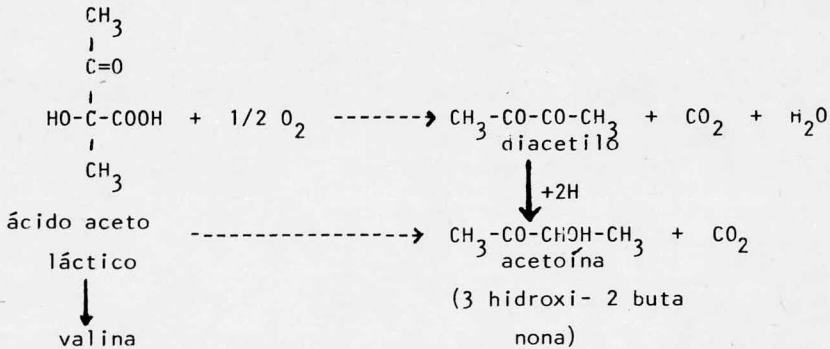
(5) Durante la glicólisis, se producen 135.5 Kcal/Kg de extracto fermentado, y por lo tanto se tiene:

96.0%	de	carbohidratos	fermentados	----->	$CO_2 + C_2H_5OH$
2.5%	"	"	"	----->	subproductos
1.5%	"	"	"	----->	producción de nuevas células de levadura.

Durante la fermentación, el 75% de subproductos es glicerina; otros subproductos son ácido pirúvico, ácido láctico, acetaldehído, ácido cítrico-

ácido málico, etc.

La formación de diacetilo está íntimamente relacionada con la síntesis de valina por la levadura.



Durante su metabolismo, la levadura produce alcoholes superiores: - por desaminación y transaminación de aminoácidos, se producen alcoholes, como compuestos del azufre, se tiene  $\text{SO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$ ; este último aumenta cuando la levadura no sintetiza metionina.

(6) Los factores más importantes en la aereación del mosto son:

- 1.- la cantidad de aire y su control
- 2.- la pureza del aire usado
- 3.- localización del enfriador y los tanques
- 4.- gravedad del mosto
- 5.- temperatura del mosto y su turbidez
- 6.- superficie de contacto entre el aire y el mosto
- 7.- tiempo de contacto entre el aire y el mosto

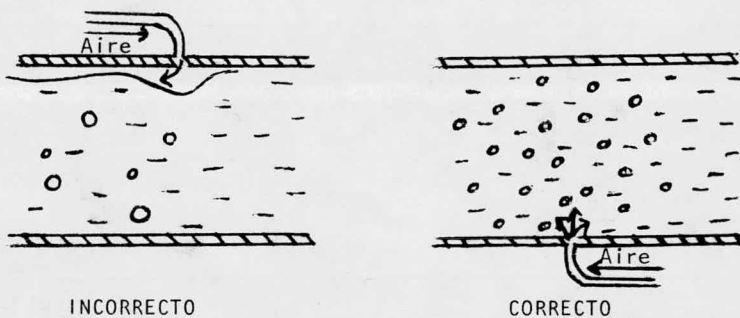
8.- presión del mosto en la línea de enfriamiento al momento de la aereación.

9.- turbulencia del mosto y su velocidad cuando pasa por el aereador

10.- longitud de la línea que conduce el mosto

El aereador debe estar lo más cerca posible a la salida del enfriador o inmediatamente después del filtro de mosto.

Los detalles de la inyección del aire en sistemas cerrados es de suma importancia, la siguiente figura ejemplifica ésto tal vez de modo exagerado.



(7) La aereación en caliente ( $60^{\circ}\text{C}$ ), produce una velocidad mayor de oxidación que la aereación en frío ( $15^{\circ}\text{C}$ ), elimina más proteínas, taninos y metales pesados que son responsables de la turbidez y otros problemas en cervecía. La aereación en caliente no mejora por sí sola la estabilidad de la bebida, sino por el contrario, tiene un efecto adverso, ya que los productos de oxidación no son eliminados y quedan sujetos a una reducción durante la fermentación. El coágulo caliente es generalmente perjudicial y debe ser

eliminado lo más completamente posible. Es importante recordar que el coágulo frío y los compuestos que causan la turbidez en frío de la cerveza, tienen una composición muy aproximada y que la eliminación de este coágulo antes de la fermentación sería muy benéfico.

Los cerveceros han encontrado empíricamente la cantidad de aire necesario en el mosto, la cual proporciona una fase lag más corta, adecuada cosecha de levadura y asegura buena atenuación. Al comienzo de la fermentación es necesario el oxígeno para dar la energía requerida, siendo innecesario o indeseable en las etapas posteriores a la fermentación.

Se ha determinado el oxígeno en mosto durante las primeras etapas de la fermentación, y se encontró que con una cantidad normal de levadura -- inoculada, todo el gas es consumido por la levadura en menos de una hora.

Las actividades de ciertos microorganismos son influenciadas por el potencial de oxido-reducción del medio, más que por la cantidad de oxígeno -- en la fase gaseosa, ésto se puede aplicar a las fermentaciones cerveceras, -- las cuales pueden estimularse por un alto nivel de oxidación de los constituyentes del mosto que resultan de la aereación del mismo, más que por efecto directo del oxígeno.

La adición de lecitina al mosto puede contrarrestar el efecto causado por la anaerobiosis en la viabilidad de la levadura. Parece que ésto -- depende de la cantidad de ácidos grasos insaturados, puesto que la lisolectina no es efectiva. Mostos con alto contenido de lípidos que fueron produ-

cidos comercialmente, proporcionan cosechas de levaduras con un mejoramiento en la viabilidad durante el curso de la fermentación anaeróbica. Se observó que la fermentación anaeróbica de mostos sin lupular, da cosechas del microorganismo de mayor viabilidad, que aquéllos derivados de mostos correspondientes pero lupulados. Durante la ebullición del mosto, el lúpulo libera sustancias que tienen efecto adverso a la vitalidad de la levadura.

Las levaduras bajas se caracterizan por una deficiencia respiratoria, por ejemplo, durante la fermentación aeróbica la respiración por *S. carlsbergensis* es tan baja que casi no se puede medir, en cambio bajo las mismas condiciones, *S. cerevisiae* muestra apreciable actividad respiratoria. Estas diferencias genéticas en sistemas respiratorios enzimáticos de distintas razas deben reflejarse en el nivel de oxígeno que cada una requiere para su crecimiento. En términos prácticos, una disminución de oxígeno en el mosto, tendrá o no efecto pequeño en la velocidad de fermentación baja y contrariamente, con levadura alta, una aereación insuficiente producirá una fermentación muy lenta.

La fermentación de mostos altamente aereados tienen una influencia directa en el sabor de la cerveza porque se acumulan subproductos como acetona, acetaldehído, etc., y una influencia indirecta por los cambios oxidativos en los constituyentes del mosto no fermentado, como por ejemplo, compuestos nitrogenados, sustancias amargas y taninos.

Empleando equipo el cual pueda medir oxígeno de manera precisa, se sigue la producción de ésteres y alcoholes superiores durante la fermentación

de un medio por *S. cerevisiae*. La producción, bajo condiciones anaeróbicas, se compara con la obtenida a diferentes aereaciones.

Los resultados obtenidos muestran que la formación de alcoholes superiores y ésteres, es máxima bajo condiciones anaeróbicas y es grandemente disminuída a tensiones muy bajas de oxígeno. Con aereación muy alta, la formación de ésteres es casi nula. La anaerobiosis favorece la formación de ésteres y la aerobiosis hace lo mismo en el caso de acetaldehído y acetoina. - Se ha reportado la existencia de los alcoholes aromáticos más altos (tirosol triptofol y feniletanol) en grandes concentraciones en cerveza producida por fermentaciones anaeróbicas.

(8) Cuando la mezcla que se encuentra en estado de fermentación llega al pH en el que la levadura flocula, suponiendo que los demás factores sean favorables, la coagulación se inicia y la levadura se asienta rápidamente en el fondo. Al mismo tiempo, la fermentación prácticamente cesa.

(9) Se estudió el origen de las substancias reductoras de la cerveza, y se encontró que ellas están principalmente presentes en estado soluble en la malta, pero las cantidades presentes son incrementadas por los extractos del lúpulo y como resultado de las reacciones que tienen lugar durante la ebullición del mosto.

Contrariamente a la opinión de anteriores investigadores, no ocurre durante la fermentación un aumento importante del poder reductor de la cerveza. La propia cerveza está sometida continuamente a los factores de --

oxidación desde la etapa de la maceración hasta el final del proceso cervecero incluyendo la fermentación.

(10) El oxígeno requerido por las células de levadura usadas en cervecería, se determina por la disponibilidad de oxígeno durante la propagación. - La células que no requieren oxígeno, fermentan satisfactoriamente tanto en mostos saturados con aire, como en mostos no aereados. Las células producidas durante la fermentación desarrollan una necesidad por el oxígeno, y fermentan débilmente cuando se añaden a mostos no aereados, debido a una restricción tanto de la velocidad como de la cantidad de crecimiento exponencial. - La cantidad de oxígeno disuelto requerido para un crecimiento satisfactorio, varía mucho con la raza de levadura. En todos los casos examinados, el requerimiento de oxígeno puede ser eliminado adicionando ergosterol o Tween 80 al medio de cultivo. Sin embargo, el Tween 80 solo, no tiene efecto. Parece que el oxígeno es esencial para la biosíntesis de esteroides.

(11) Se investigó la influencia de la temperatura de fermentación en la actividad enzimática de levaduras de fermentación baja, usadas en cervecería.

Las temperaturas de fermentación fueron 7.5, 10.0 y 12.5 °C. De acuerdo a su comportamiento debido a la temperatura, las enzimas así estudiadas pueden clasificarse en tres grupos.

1.- enzimas cuya actividad aumenta con una mayor temperatura de fermentación. Ejemplo: maltotriasa y maltasa.

2.- demuestran una disminución en la actividad enzimática con un

aumento de temperatura. Ejemplo: hexoquinasa.

3.- incluye aquellas enzimas cuya actividad aumenta notablemente sólo a temperaturas más altas de 12.5°C. Ejemplo: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

La optimización de la fermentación mediante temperaturas altas, es posible sólo dentro de límites estrechos, ya que la aumentada absorción de varios substratos y la acelerada velocidad de crecimiento de levadura es acompañada por una correspondiente mayor producción de subproductos indeseables, los cuales perjudican la calidad de la cerveza y especialmente su sabor.

(12) Si el deterioro de la levadura es la causa de un cambio gradual en la fermentación, debe notarse una reducción lenta de la cosecha de levadura, una mayor cantidad de ésta en suspensión y por consiguiente, la obtenida para la siguiente inoculación es insuficiente. También la gravedad final (extracto aparente) mostrará una tendencia a permanecer sobre el promedio normal.

Es muy importante el conocimiento de la viabilidad de levadura, ya que las células degeneradas pueden contribuir a sabores y olores desagradables, debido a liberación de subproductos autolíticos. Altos niveles de levaduras muertas en el inóculo, perjudicarán o retardarán la fermentación.

Se han usado muchos colorantes para determinar la viabilidad, sólo el azul de metileno parece tener amplia aceptación. Su uso se basa en el hecho de que las células que han perdido su capacidad para yemar, son teñidas



por el azul de metileno, sin embargo, ocasionalmente la distinción entre células teñidas y no teñidas es marginal y entonces se requiere ejercitar el juicio personal. Por eso se ha continuado la búsqueda de colorantes que permitan una mejor distinción. Los mejores resultados se han obtenido con la técnica de Gutstein.

(13) La levadura cervecera necesita trazas de oxígeno para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados y ergosterol. Debido a un incremento en la masa celular durante la fermentación inicial, la concentración de estos lípidos esenciales disminuye, y por lo tanto afecta la condición fisiológica de la levadura. Cuando la concentración de esterol de todas las células ha disminuído a 0.2 ó 0.3 mg. por 100 mg. de levadura seca, la levadura cambia su metabolismo. Este cambio metabólico es revelado por un aumento en la concentración de acetoína. La absorción de los nutrientes del mosto y consecuentemente la eficiencia del crecimiento es en este punto grandemente reducida. La relación entre el crecimiento de levadura y moles de etanol formado (rango de crecimiento molar), disminuye mucho durante la fermentación. Una pequeña relación entre este rango y el cambio en el metabolismo de la acetoína puede observarse. Este cambio metabólico ocurre cuando la relación entre el crecimiento de levadura y etanol formado está en el rango de 8.3 a 9.1 g./mol

La acetoína se forma durante la fase inicial y vigorosa de la fermentación y es eliminada nuevamente, en las últimas etapas así como durante el Reposo. Existe un alto grado de correlación entre el nivel máximo de acetoína y la concentración de etanol, en el punto donde la levadura cambia su metabolismo para eliminar la acetoína. Cuando este cambio ocurre tardía-

mente en la fermentación, aumenta la probabilidad de que la concentración de acetoína no pueda ser adecuadamente reducida. Altas concentraciones de acetoína afectan el sabor de la cerveza. La importancia de la acetoína está -- asociada con el hecho de que es un indicador de cambios fisiológicos de la célula de levadura. Se encuentra entre los primeros metabolitos cuya formación está afectada por el cambio importante de fisiología que tiene mucha relación con la actividad de la membrana. El cambio en metabolismo de la acetoína puede ser relacionado con el contenido de lípidos esenciales de la célula de levadura. La desviación de formación a eliminación de acetoína aparece cuando la cantidad de lípidos insaturados ha disminuído de modo que el crecimiento óptimo no es muy posible. El contenido de estos lípidos se puede aumentar administrando oxígeno durante el curso de la fermentación, o por adición de lípidos insaturados al medio de crecimiento. La presencia de ergosterol y de ácidos grasos insaturados de cadena larga tiene un efecto estimulante muy alto en el crecimiento de la levadura y la velocidad de fermentación, y estos componentes sólo son sintetizados en presencia de oxígeno.

El concepto de rango de crecimiento molar ó  $Y_{ATP}$ , se define como el peso seco en gramos de levadura producida por mol de ATP sintetizado. Aquí se considera que una mol de ATP teóricamente formado es igual a una mol de etanol producido.  $Y_{glucosa}$  (gramos de levadura seca por mol de glucosa consumida) es alrededor del doble del  $Y_{ATP}$ .

## C A P I T U L O III

### EXPERIMENTACION Y METODOS

Las fermentaciones se desarrollaron en la planta piloto de la Cervecería, para lo cual se muestreó mosto Corona antes de entrar a los enfriadores. Los tanques en los cuales se colocó el mosto, fueron previamente lavados y saturados con gas carbónico, evitando así la contaminación puesto -- que el agua empleada para tal efecto, llegaba casi al punto de ebullición. -- El gas carbónico evitó la presencia de aire.

El siguiente paso fue enfriar el mosto mediante su recorrido por un enfriador como lo muestra el diagrama número 3. El mosto caliente entró por la parte superior del serpentín, por el centro del cual y a todo lo largo, pasó un tubo delgado por el que circuló la salmuera en dirección opuesta a la del mosto. La salmuera estuvo compuestas por dicromato de potasio, sosa, cloruro de calcio e hipoclorito de sodio.

A la salida del enfriador, se inyectó aire, el cual pasó por un -- filtro Millipore antes de ponerse en contacto con el mosto. El mosto frío -- (9°C) y aerado fue recibido en tanques para fermentación, tratados de igual manera que los anteriores. Se tomó entonces una muestra para determinar pH, °Balling y color inicial. Se pasó un volúmen conocido de mosto a otro tanque, el cual contuvo un volúmen también conocido de agua carente de oxígeno, se de

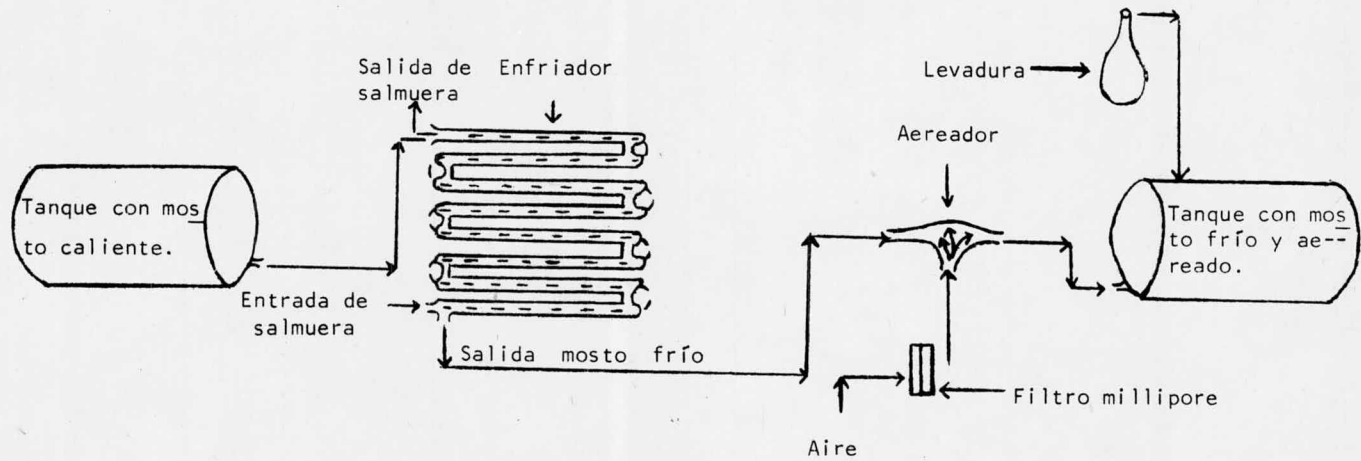


Diagrama No. 3

OPERACIONES REALIZADAS EN PLANTA PILOTO.

terminó el oxígeno disuelto con el analizador y mediante una ecuación se encontró la cantidad de este gas.

Se pesó el tanque con el mosto a fermentar para saber exactamente la cantidad de levadura a inocular, lo cual siempre se hizo en una relación del 1%. La levadura se trajo de las tinas de reinoculación en un matraz estéril. Se inoculó y se agitó fuertemente el tanque para un total contacto entre el microorganismo y el mosto. Una vez hecho esto, se guardó el tanque en un cuarto frío, donde la temperatura era menor de 10°C.

Se tomó muestras durante varios días, hasta el momento en que la lectura en ° Balling fue de 2.85, entonces se consideró como concluida la fermentación y se determinó pH y color final.

Posteriormente se vació el tanque de fermentación y se pesó la levadura cosechada, de la cual se tomó una parte para su estudio. A la levadura de inoculación y de cosecha, se les estudió de igual manera, determinando por ciento en peso y vitalidad.

Las determinaciones realizadas en el mosto fueron:

Grado Balling.- en cervecería se usan los sacarómetros, que son unos densímetros especiales para determinar °Balling, estos aparatos están graduados en por ciento de extracto en lugar de peso específico, evitando así consultar tablas de equivalencias.

El grado Balling nos indica el por ciento de extracto en agua desti

lada, los sacarómetros llevan una escala de corrección de temperatura a un costado de un termómetro dentro el mismo instrumento.

pH.- Se usó un potenciómetro Beckman Zeromatic II.

Color.- para esta determinación fue necesario filtrar estos mostos, pues la presencia de partículas dificultó la precisión, se efectuó con el Tintómetro Lovibond Type D.

Las determinaciones realizadas en levadura fueron:

Pociento en peso.- Una muestra perfectamente bien pasada, se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad siempre contante, después de este tiempo se decantó el líquido sobrenadante y se volvió a pesar; se determinó entonces el % en peso.

Vitalidad.- mediante la tinsión de Gutstein, para la cual son necesarias las siguientes soluciones:

- 1.- Solución al 1% de azul de metileno en agua destilada.
- 2.- Solución al 5% de ácido tánico en agua destilada.
- 3.- Solución de safranina 0 al 1% en agua destilada.

El procedimiento es el siguiente:

Hacer un frotis con la suspensión de levadura y dejarla secar al aire.

Fijar la preparación a la flama (pasando con cuidado el portaobje



A continuación se presentan métodos para determinar oxígeno disuelto en mosto:

#### MÉTODOS PARA DETERMINAR OXIGENO DISUELTO

(1,2,3) En la actualidad, los únicos métodos conocidos emplean una técnica gasométrica en la cual todo el gas, una vez extraído de la cerveza, queda fraccionado en sus componentes mediante los procedimientos gasométricos usuales.

Esos métodos exigen aparatos bastante complicados, absorben tiempo y contienen errores inherentes que pueden afectar su precisión al medir cantidades pequeñas de oxígeno disuelto.

En los presentes artículos se desarrolla un método que consiste en llevar una solución de carmín índigo, exactamente a su forma leuco mediante la acción de un fuerte agente reductor como lo es el hidrosulfito de sodio -  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Se añade entonces un exceso de leuco-indicador a la muestra, previamente recogida en un frasco apropiado. En todo el curso de la prueba, han de mantenerse condiciones anaeróbicas simples. La reacción se produce entonces entre el oxígeno disuelto y la leuco-base, siendo la cantidad de colorante regenerado, proporcional a la del oxígeno primitivamente presente en la muestra. El color resultante varía entre un verde claro y un violeta-subido, pasando por tonos intermedios de azul, según la concentración de oxígeno. Luego se efectúa la comparación con prototipos preparados por dilución de cantidades variables de una solución de colorante en agua destilada, en



frascos similares a los usados en la determinación.

La comparación con los prototipos se efectúa dentro de un comparador como lo muestra la figura número 3.

El colorante carmín índigo, fue elegido porque como indicador de reducción queda cerca de la escala redox de la cerveza. Se efectuaron experimentos para demostrar que el colorante no es reducido ni oxidado por la cerveza dentro de los límites del ensayo. Para mostrar la ausencia de reducción, cantidades del indicador oxidado, de tintes crecientes, que variaban entre 0.5 y 4 ml., fueron agregados a cervezas colocadas en frascos similares a los empleados para la determinación del oxígeno. La comparación con los prototipos, efectuada después de dos horas, mostró que la cerveza no ha-

MOSTO SIN TRATAR

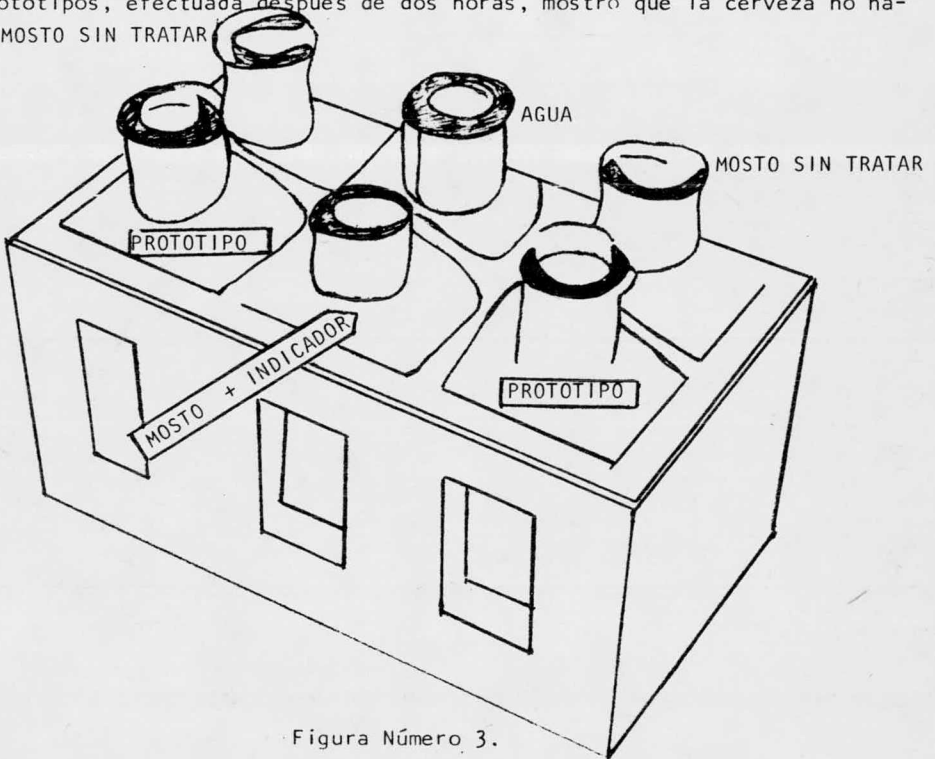


Figura Número 3.

bía tenido efecto reductor sobre el indicador oxidado.

Con el fin de determinar si los componentes de la cerveza ejercían alguna acción oxidante sobre el leuco-carmín, se extrajo el oxígeno por calentamiento de una muestra de cerveza a 75°C durante 30 minutos. Con las precauciones necesarias para excluir el aire se recolectaron muestras en frascos de ensayo, añadiéndoseles 5 ml. de leuco-carmín; dos horas después, no había tenido lugar regeneración del color.

Las variaciones de pH no parecen afectar la oxidación del leuco-colorante por el oxígeno dentro de la escala de pH de la cerveza. Antes de sacar las muestras de ensayo, a unas se les agregó cantidades pequeñas de ácido y a otras de álcali, llenándose a continuación dichos frascos con cerveza tomada de una misma muestra y determinándose finalmente el contenido de oxígeno de cada una; los valores de pH de las mezclas variaron entre 3.4 y 5.6; mientras que la regeneración del color progresaba más aprisa en las muestras de alcalinidad mayor, los colores definitivos al cabo de una hora, resultaron ser todos iguales.

Se estudió también la posibilidad de que los sulfitos de la cerveza pudieran interponerse en la determinación, entonces se agregó metabisulfito de potasio a las botellas antes de la recolección de la muestra y se efectuaron los ensayos en la forma descrita anteriormente. La mayor cantidad de metabisulfito empleada, equivalente a 100 partes de  $\text{SO}_2$  por millón, no dio señal de haber influido en la determinación del contenido de oxígeno disuelto en la cerveza.

Sabiendo que la levadura goza de propiedades reductoras, cabía - averiguar: a) la posibilidad de un efecto de tal naturaleza sobre el carmín índigo y b) si la levadura sería o no capaz de inhibir la oxidación del leuco-colorante por el oxígeno disuelto.

a). En una botella sellada se recolectó una muestra en fermentación, añadiéndosele entonces una cantidad conocida del colorante oxidado. - La comparación con los prototipos al cabo de dos horas mostró que el colorante no había sido reducido.

b). En cuatro tubos de centrífuga de 50 ml. unidos en serie, se recogió cerveza en fermentación, con contenido elevado de levadura en suspensión. Centrifugáronse dos de ellos para separar la levadura. A cada uno de los cuatro se agregó 2 ml. de la solución de colorante reducido, mezclándose con su contenido, pero teniendo cuidado de no perturbar el sedimento de levadura en los dos tubos centrígrafos. Dejáronse reposar todos una hora a 25°C. En otras palabras, se agregó el colorante reducido en un caso, a cerveza con mucha levadura suspendida; y en otro, a igual cerveza, cuya levadura había - quedado alejada de la esfera de reacción por centrifugación. Después de una hora, se centrifugaron los tubos que contenían levadura en suspensión a fin de permitir una comparación de la intensidad del color regenerado. La comparación mostró que la coloración era la misma en los cuatro tubos.

Este método de leuco-colorante podría aplicarse también a la determinación del contenido de oxígeno disuelto a líquidos que no sean la cerveza o el agua y en los cuales la presencia de cantidades considerables de -

materia orgánica u otras sustancias interferentes, veda el uso de otros métodos.

(4) El método gasométrico está basado en que los gases contenidos en la cerveza con excepción del dióxido de carbono, no reaccionan con sosa cáustica y su volúmen se mide con una bureta gasométrica.

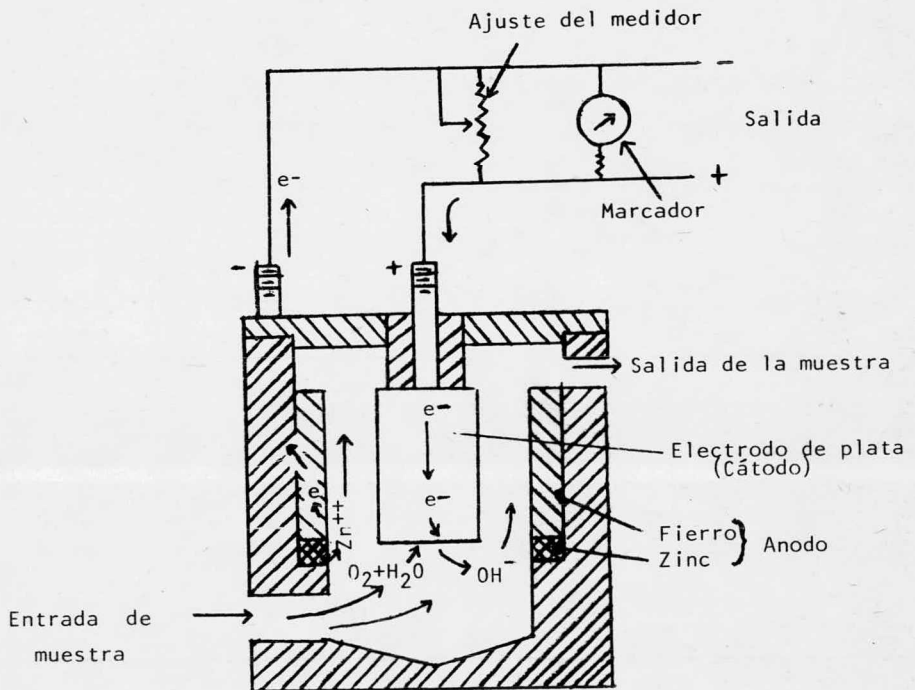
El método cromatográfico se efectúa absorbiendo el dióxido de carbono en un álcali y haciendo la separación del nitrógeno y oxígeno por cromatografía de gases.

Como estos métodos son muy largos y tediosos, se desarrolló uno polarográfico donde el oxígeno disuelto en soluciones electrolíticas es reducido en el electrodo de gota de mercurio produciendo dos curvas, cuyas corrientes de difusión dependen de la concentración de oxígeno.

(5,6,7,8,9,10) Se emplea un analizador que usa una celda electroquímica. Se genera una corriente de despolarización en proporción lineal a la concentración de oxígeno disuelto en la muestra. La medición de esta corriente en los circuitos del analizador es un indicio de la cantidad de oxígeno. La celda de medición se representa en el diagrama número 4.

El cátodo está hecho de plata y el ánodo es un anillo de zinc cubierto por uno de fierro. Los electrodos están montados dentro de un material de acero inoxidable. El anillo de zinc proporciona el voltaje necesario de polarización mientras que el de fierro sirve para prevenir pasividad en el ánodo.

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA CELDA DE MEDICION



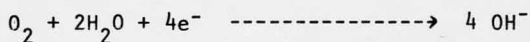
Reacción en el ánodo:  $2 \text{Zn}^{\circ} \longrightarrow 2 \text{Zn}^{++} + 4\text{e}^{-}$

Reacción en el cátodo:  $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^{-} \rightarrow 4 \text{OH}^{-}$

Diagram 4.

El electrolito es la corriente de la muestra. Fluye en la celda entre los electrodos de plata y de zinc. Cuando hay oxígeno disuelto en la muestra ocurre la oxidación de los iones de zinc en el ánodo, y se verifica la reducción del oxígeno difundiendo hacia el cátodo, produciendo iones hidroxilo.

Las reacciones que se realizan son las siguientes:



Ya que el zinc presenta una fuerte tendencia de ionización, la condición limitante de esta reacción es la velocidad a la cual el oxígeno di funde al cátodo. La velocidad de difusión del oxígeno es proporcional al con tenido de oxígeno disuelto. La corriente que fluye en el circuito medidor re sultante de los electrones desplazados es por lo tanto proporcional al oxi geno disuelto en la muestra.

(11) La conclusión es que la lectura dada según el método del carmín-índigo es el doble de la encontrada por el aparato calibrado con la titulación de Winkler.

Hasta ahora no se sabe cual de los dos métodos es el correcto y por consiguiente es necesario seguir estudiando sobre este tema.

## C A P I T U L O   I V

### RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Primero se expondrán las razones por las cuales se eligieron los métodos empleados.

La determinación del grado Balling usando el sacarómetro, se eligió por ser rápida y precisa, ya que los sacarómetros se checan periódicamente por picnometría. Además las cervecerías se rigen en su control a lo largo del proceso por este análisis, al igual que por el del pH.

Estos dos datos son muy importantes para los cerveceros, pues indican el momento al cual la fermentación ha llegado al punto en el cual se tienen las características establecidas por ellos para agrado del consumidor.

Por otro lado, son indicativos de que el proceso marcha debidamente, pues de antemano se sabe el tiempo necesario para su fin y la forma en que va disminuyendo el pH.

El color no es tan importante, ya que se puede modificar con adición de colorante o por mezclas con otras fermentaciones. Además si hubiera alguna falla en el proceso, primero se detectaría por el grado Balling o por el pH.

Para la determinación del color, se escogió el Tintómetro, porque aunque más impreciso (como lo son los métodos colorimétricos) que el Espectrofotómetro, es mucho más rápido.

En cuanto a la levadura, se hicieron determinaciones de % en peso, para saber la cantidad real de inóculo, puesto que la levadura aunque -- siempre fue la misma, (*Saccharomyces carlsbergensis*, empleada en esta cerveza), existía la posibilidad de ligeras variaciones.

Para la observación de la vitalidad se usó la técnica de Guts--- tein, porque como ya se dijo anteriormente es la más veraz.

La elección del método para la determinación de oxígeno disuelto, fue la más difícil y por lo tanto la que más tiempo requirió (aproximadamente seis meses).

El primer método probado consistió en preparar el carmín índigo en su forma leuco, para así agregarlo a una cantidad conocida de mosto oxigenado, y por colorimetría determinar la cantidad de oxígeno disuelto en la -- muestra.

Se requieren dos átomos de oxígeno para lograr la oxidación completa de una molécula de disulfonato índigo ( $C_{16}H_8N_2O_2(SO_3Na)_2$ ), cuyo peso molecular es 466, o sea que se necesitan 32 gramos de oxígeno para oxidar -- 466 gramos de indicador.

Para facilitar los cálculos, se preparó de manera que un ml. del



indicador fue equivalente a un mg. de oxígeno por 1000 ml. de mosto. Si se supone que a 85 ml. de mosto, agregamos 5 ml. del indicador; entonces 1000 ml. de mosto requerirán  $466/32\ 000$ , lo que es igual a 0.01456 gramos de indicador.

La cantidad del colorante necesario será:  $0.01456 \times 85 / 1000$ , que es igual a 0.001243 gramos / 1000 ml. de indicador, o sea que se disuelven 124 mg. en 100 ml. de agua. El colorante será azul muy intenso. Posteriormente se agregó hidrosulfito de sodio al 2.5% hasta obtener un color amarillo; después se agregó gota a gota el indicador oxidado hasta que el color fue verde pálido.

Para proteger al colorante del oxígeno, se usó parafina para sellar perfectamente bien el tubo que contenía al indicador.

En estas prácticas el volúmen de mosto fue de 160 ml. y la cantidad de colorante agregado fue de 10 ml. Después de haber permanecido la mezcla a  $25^{\circ}\text{C}$  durante una hora, se comparó con un tubo que fue tratado de igual forma, pero que no tenía indicador. El colorante oxidado se agregó mediante una pipeta o bureta hasta igualar los colores. El número de ml. de indicador añadido fue igual a la concentración de oxígeno disuelto en mg. /1000ml.

Con este método no se obtuvieron buenos resultados, ya que la preparación del leuco-colorante fue sumamente difícil de lograr en condiciones normales de trabajo, inclusive con una corriente de  $\text{CO}_2$  el resultado fue negativo, porque al mínimo contacto con el aire el indicador empieza a oxidarse. Además de que casi siempre a la hora de agregar el reactivo, éste ya

no era leuco, al final los colores obtenidos fueron sumamente intensos y difíciles de distinguir entre una y otra concentración.

El segundo método probado consistió en una modificación del anterior haciendo uso de un espectrofotómetro Spectronic 20 a una longitud de onda de 600 mmu. No se obtuvo nada, pues con una concentración de menos de -- una ppm, la aguja iba hasta el límite de la escala.

Posteriormente se recurrió al espectrofotómetro; Hitachi Perkin-Elmer, Coleman 139, más sensible que el anterior, tampoco se pudo lograr nada de valor, pues cuando se calibró con agua, las lecturas fueron muy cercanas entre sí y además no reproducibles, lo mismo sucedió al calibrar con 160 ml. de agua y un ml. de indicador oxidado. Cuando se aumentó la cantidad de indicador oxidado, los resultados fueron también malos. Se trató de calibrar con mosto y la aguja osciló demasiado.

Gracias a los artículos 1, 2 y 3 mencionados en la bibliografía de métodos, se encontró una manera más fácil de efectuar la determinación, sin embargo no satisfizo por completo nuestros deseos, pues ya que es un método colorimétrico, es inexacto y más en este caso donde ya se dijo que es muy difícil distinguir los colores entre una y otra concentración. Para esto, la muestra de mosto fue de 100 ml. y se trató igual que en los otros casos, se prepararon patrones de la siguiente forma:

Tomar un ml. de indicador. Aforar a 100 ml. = 1 ppm.

Tomar dos ml. de indicador. Aforar a 100 ml. = 2 ppm.

Seguir así hasta obtener las ppm deseadas.

Posteriormente se colocaron los tubos en el comparador y esto hizo fácil este método.

Otro método probado fue el que se valió del analizador Hays, que aunque fue el último en tratarse ya que sólo se usaba para medir oxígeno disuelto en cerveza, que es de 0.1 ppm cuando mucho, fue el que se escogió como mejor.

El primer paso fue hacer una curva de calibración, pero como ya dijimos que éstos aparatos sirven para concentraciones de oxígeno disueltamente pequeñas, fue necesario hacer diluciones de agua de la llave con agua carbonatada.

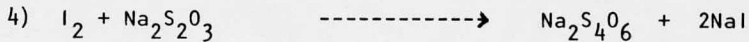
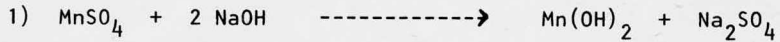
Se prepararon varios tanques con diferentes cantidades de agua de la llave y agua carbonatada, se tomó la lectura del aparato para cada tanque e inmediatamente se tomó una muestra del agua, después se determinó el oxígeno disuelto en la muestra mediante la titulación de Winkler, que consiste en:

A un volúmen de 300 ml. de muestra se agrega:

- 1) Dos ml. de sulfato manganoso
- 2) dos ml. de ioduro de potasio alcalino
- 3) se mezcla perfectamente
- 4) se deja reposar para que el precipitado se vaya al fondo
- 5) se agregan dos ml. de ácido sulfúrico al 50%
- 6) se mezcla muy bien para deshacer el precipitado
- 7) se miden 200 ml. para proceder a titular.

- 8) titular con tiosulfato de sodio 0.025 N. hasta decoloración, usando almidón como indicador.
- 9) los ml. gastados serán las ppm. de oxígeno disuelto.

Las reacciones que se llevan a cabo son:



Para la preparación de reactivos tenemos:

1) Sulfato manganoso.- Se disuelven 480 g. de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 400g.- de  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ó 364 g. de  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada, se filtra y se diluye a un litro.

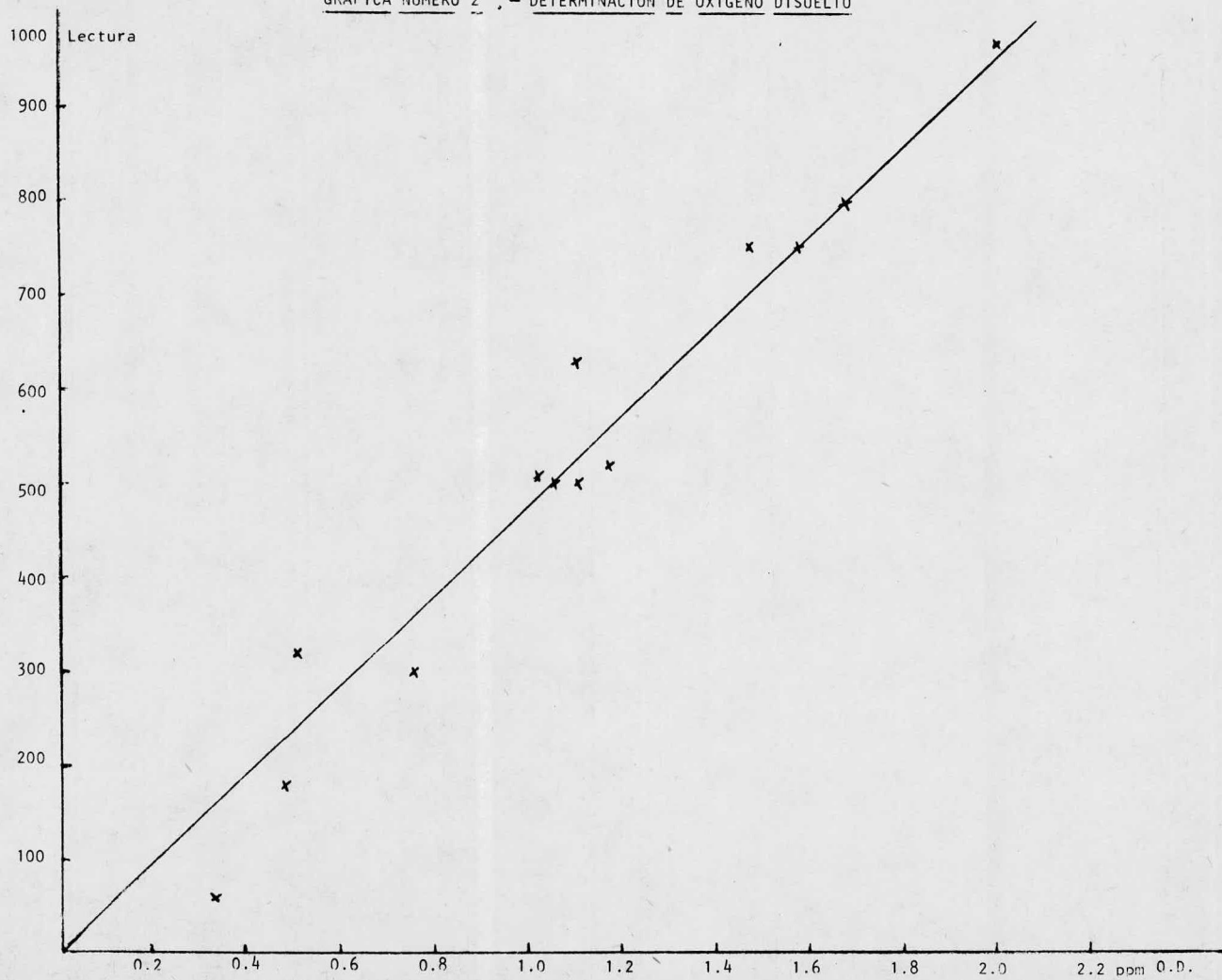
2) Ioduro de potasio alcalino.- Se disuelven 500 g. de NaOH (o 700 g. de KOH) y 135 g. de NaI (o 150 g. de KI) en agua destilada y se diluye a un litro.

3) Acido sulfúrico 50%.- Se mezclan volúmenes iguales de ácido sulfúrico y agua.

4) Tiosulfato de sodio 0.025 N.- Se disuelven 6.205 g. de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y se afora a un litro.

Los resultados obtenidos los muestra la gráfica Número 2.

GRAFICA NUMERO 2 , - DETERMINACION DE OXIGENO DISUELTO



Una vez hecha la gráfica se procedió a la determinación en los mostos que se iban a fermentar, para lo cual se pasó un volúmen conocido de mosto a un tanque que contuvo otro volúmen también conocido de agua carbonatada. Se mezcló bien, se tomó la lectura del aparato, y la gráfica mostró las ppm de oxígeno disuelto.

Por ejemplo:

#### DATOS

Volúmen de agua = 5.10 litros.

Lectura dada por el agua = 0

Volúmen de mosto = 1 litro

Lectura dada por la mezcla de agua y mosto = 820

#### CALCULOS

Usando la gráfica encontramos que para una lectura de 820, las ppm de oxígeno disuelto correspondientes eran 1.72. Enconces:

$$5.10 (0) + 1(X) = 6.1 (1.72)$$

$$X = 6.1 (1.72)$$

$$X = 10.5$$

El mosto tenía 10.5 ppm. de oxígeno disuelto.

Como se dudaba de la veracidad de este método, se comparó con el del carmín índigo, el cual mostró que la cantidad de oxígeno disuelto era el doble que la marcada por el analizador. Esto causó mucho desánimo, pues al no coincidir los resultados, se pensó que el trabajo estaba mal, sin embargo

después de muchos meses y no menos intentos, el artículo 11 de la bibliografía de métodos, concluía que la lectura dada según el método del carmín índigó, era el doble que la dada por el aparato calibrado con la titulación de Winkler.

Entonces se eligió el aparato Hays por ser más preciso, más reproducible y más rápido.

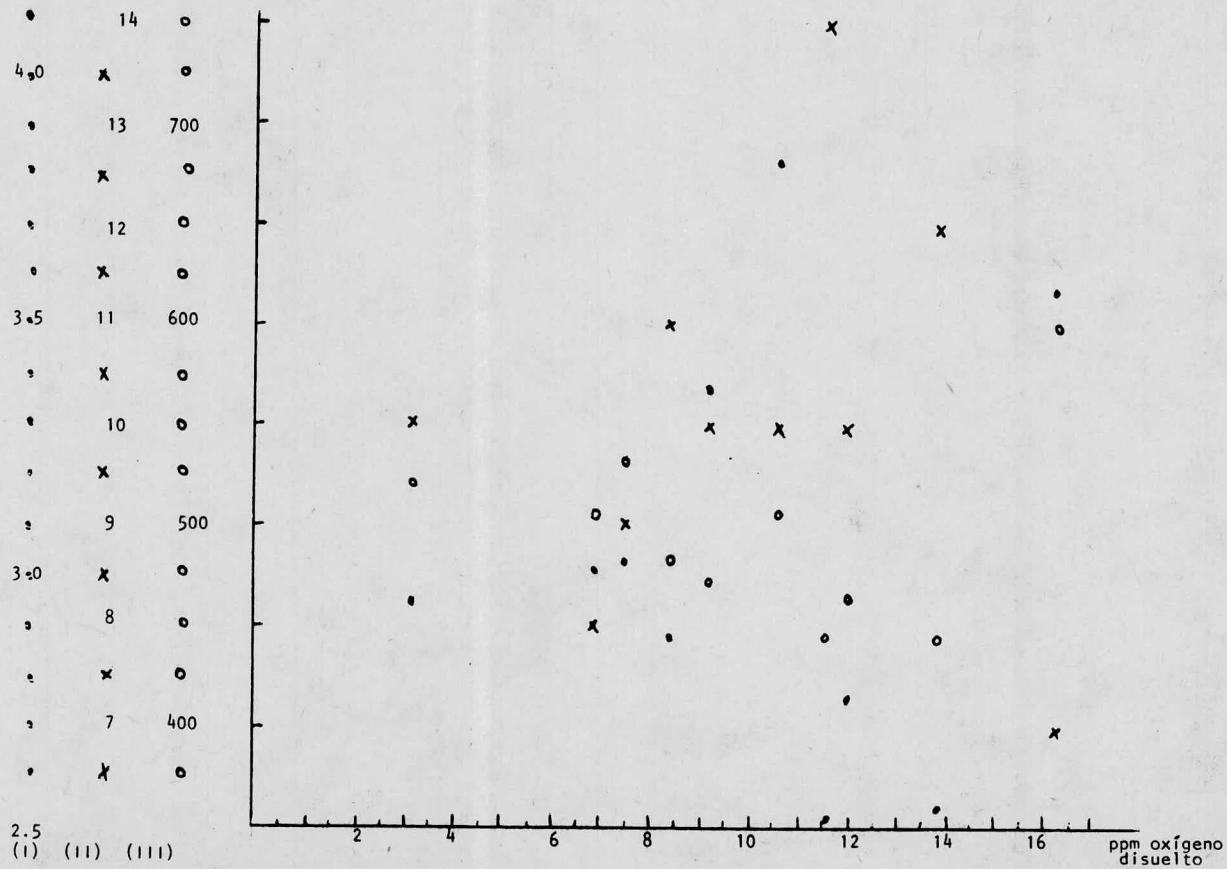
Después de haberse referido a los métodos, diremos que los resultados obtenidos de este trabajo, los muestra la gráfica número 3 y confirman las experiencias hasta ahora publicadas, es decir que la concentración de -- oxígeno disuelto en mosto no se ha encontrado prácticamente, si no que sólo se tienen suposiciones o datos empíricos.

El primer problema a resolver sería encontrar el método correcto para la determinación de oxígeno disuelto en mosto, pues como se menciona en la bibliografía consultada, hasta la fecha no se sabe cual es el método verdadero pues los resultados difieren de un método a otro.

Se requiere de un método rápido, puesto que el oxígeno disuelto en la muestra, inmediatamente reacciona con los componentes de la misma, de modo que si el método es largo, el resultado será más bajo de lo real, por -- ésto se podría pensar que el uso del analizador Hays es efectivo debido a -- que no se lleva mucho tiempo la determinación, sin embargo teniendo presente que este aparato funciona para concentraciones del gas muy bajas, y que por consiguiente es necesario efectuar diluciones, se duda de la fidelidad del -- método; por otro lado se tiene también el inconveniente del uso de agua car-

GRAFICA NUMERO 3

Representación gráfica de la relación entre el oxígeno disuelto y: (i) relación gramos de levadura cosechada/  
gramos de levadura inoculada, (ii) días de fermentación, (iii) gramos de levadura cosechada.





bonatada, pues aunque el aparato sólo determina oxígeno por tener un funcionamiento de oxido-reducción, el  $\text{CO}_2$  tenderá a desalojar al oxígeno del mosto, dando igualmente un valor más bajo del real.

Una vez escogido un método, aunque éste no sea el verdadero, nos encontramos con que los resultados son muy poco satisfactorios y las incógnitas muchas, así como también las diferencias de opinión entre los estudiosos del tema. Esto lo deja ver claramente Kirsop en el artículo número 3 de Generalidades proveniente de revistas, donde dice:

No hay casi nada publicado en relación al control del oxígeno en el momento de la inoculación. Es difícil saturar el mosto con aire tanto en el laboratorio como en condiciones de producción, particularmente si el gas está en contacto con el mosto sólo un tiempo relativamente corto. Además -- parte del oxígeno disuelto reacciona químicamente con los componentes del -- mosto de modo que el valor inicial disminuye con el tiempo. Es necesario estudiar detalladamente los factores que controlan la transferencia de gas del aire u oxígeno al mosto en condiciones cerveceras y de la medida con la cual la utilización química de oxígeno complica la situación. La literatura no es precisa en lo relacionado al contenido de oxígeno disuelto.

Actualmente se desconoce mucho de esto, por ejemplo:

1.- No se sabe el motivo por el que la cantidad de oxígeno disuelto parece variar cuando la cantidad de inoculación cambia.

2.- No se sabe si los resultados benéficos resultantes de la ex-

posición de la levadura al oxígeno son ampliamente influenciados por la presencia de nutrientes.

3.- No se sabe qué cantidad de constituyentes celulares de la levadura en aerobiosis son sintetizados cuando el microorganismo es expuesto al oxígeno, y si como una consecuencia hay posibilidad de cambios en el patrón del metabolismo de la misma y la excreción de algunos metabolitos que alteren el sabor de la cerveza.

Concluyendo, creo conveniente basado en lo anterior, seguir investigando este problema, ya sea modificando estas técnicas o viendo la posibilidad de estudiar otras; en todo caso, debemos estar abiertos a los avances tecnológicos futuros con instrumentación e ideas para resolver dichos problemas.

## CAPITULO V

### B I B L I O G R A F I A

#### A) GENERALIDADES (libros)

- 1.- J.S. Hoygh, D.E. Briggs & R. Stevens.  
Maliting an brewing science.  
Chapman and Hall LTD.  
1971. London England.
- 2.- W.P.K. Findlay.  
Modern brewing technology.  
Macmillan Press.  
1971. London England
- 3.- Jean de Clerck.  
A texbook of brewing.  
Chapman & Hall LTD.  
Vol. 1  
1958, London England
- 4.- Jørgensen - Hansen.  
Microbiología de las fermentaciones industriales.  
Editorial Acribia. 7<sup>º</sup> edición.  
1959, Zaragoza, España. Pag. 79.

#### B) GENERALIDADES (Revistas).

- 1.- J. de Clerck and W. Heindrycks.  
Determination of dissolve<sup>d</sup> oxygen in wort.

- Journal of the Institute of Brewing.  
Vol. LXIX. No. 3. Pag. 263. 1963.
- 2.- J. de Clerck and W. Heindrycs.  
Determination of dissolved oxygen in wort.  
Brewers Digest.  
Vol. 39. No. 5, May 1964. Pag. 68
- 3.- B.H. Kirsop.  
Oxygen in brewery fermentation.  
Journal of the Institute of brewing.  
Vol. 80, No. 3. May-June 1974. Pag. 252.
- 4.- B.H. Kirsop.  
Control of yeast activity during fermentation.  
The Brewers Digest.  
Vol. 49, No. 9, Sept. 1974. Pag. 92.
- 5.- Paul Gjertsen and Arne Schouboe.  
By-products of fermentation and their influence on beer.  
The Brewers Digest.  
Vol. 49, No. 1, Ja. 1974, Pag. 52.
- 6.- Otto Pretzl and Hans Reuther.  
Modern Wort aeration.  
American Brewer.  
Vol. 100, No. 6, June 1967, Pag. 27.
- 7.- W.D. Mc. Farlane.  
Processing variables as they may affect the oxidation of beer.  
Technical Quarterly.  
Vol. 4, No. 4, 1967, Pag. 239.
- 8.- Max Wallerstein.  
Algunas observaciones prácticas cerveceras vistas a la luz de la química moderna. Efectos del oxígeno y de la oxidación en los procesos de elaboración de cerveza.

Cerveza de botella de calidad. 10 años de investigaciones.  
Laboratorios Wallerstein. New York, U.S.A. 1948.

- 9.- Philip P. Gray, Irwin Stone y Harold Rothchild.  
Oxidación en la cerveza III. La oxidación durante el proceso de la elaboración de cerveza.  
Cerveza de botella de calidad. 10 años de investigaciones.  
Laboratorios Wallerstein. New York, U.S.A. 1939.
- 10.- M.H. David and B.H. Kirsop.  
Yeast growth in relation to the dissolved oxygen and sterol content of wort.  
The Brewers Digest.  
Vol. XLIX, No. 2, Feb. 1974, Pag. 57.
- 11.- Karl-Ullrich Heyse and Anton Piendl.  
Fermentation temperature and enzyme pattern of yeast.  
The Brewrs Digest.  
Vol. XLIX, No. 10, Oct. 1974, Pag. 82.
- 12.- Problems in brewing.  
We have notice a gradual change in our fermentations. If yeast deterioration is the cause, what differences would be apparent? Also, what - - would be a suitable test for determining yeast deterioration?  
The Brewers Digest.  
Vol. 49, No. 11. Nov. 1974, Pag. 55.
- 13.- A.D. Haukeli and S. Lie.  
Effect of lipids and oxygen on yeast growth and the biosynthesis of a - acetoin during fermentation.  
Journal of the Institute of Brewing.  
Vol. 82, May-June 1976, Pag. 161.

## C) METODOS (libros).

- 1.- Jean de Clerck.  
A textbook of brewing.  
Chapman and Hall LTD.  
Vol. 2.  
1958, London, England Pag. 385.

## D) METODOS (revistas)

- 1.- Harold Rothchild & Irwin M. Stone.  
Método colorimétrico para determinar el oxígeno disuelto en la cerveza.  
Cerveza de botella de calidad. 10 años de investigaciones.  
Laboratorios Wallerstein. 1938.
- 2.- Van Gheleue, J. E. A.  
The determination of the oxidation state of wort and beer.  
Technical Quarterly. MBAA.  
Vo. 4, No. 4, 1967, Pag. 233-238.
- 3.- Harry Rothchild and Irwin M. Stone.  
A colorimetric method for the determination of dissolved oxygen in beer  
Reprinted from the Journal of the Institute of Brewing. Vo. XLIV, No. 9  
(Vol. XXXV, New Series), September, 1938.
- 4.- Arnulfo M. Canales y Nylida Martínez.  
Oxígeno disuelto en mosto.  
Anuario Técnico. 1966. Distrito México. Cervecería Cuauhtémoc S.A.
- 5.- Harry M. Galloway, Edwin A. Raabe and William Bates.  
A portable analyzer for measuring dissolved oxygen in beer.  
A.S.B.C. Proceeding. Pag. 79.
- 6.- Walter Hunt, Oswaldo Espadas and Salvador Lopez Lee.  
The dissolved oxygen analyzer and its applications in improving beer quality.

Technical Quarterly Vol. 5, No. 3, Pag. 167.

7.- Walter Hunt.

Direct oxygen determination in beer processing.

The Brewers Digest.

Vol. XLIV, No. 9, Sept. 1969, Pag. 104.

8.- Klimovitz, R. J.

Practical application of the Hays dissolved oxygen meter.

Technical Quarterly. MBAA.

Vol. 9, No. 2, 1972, Pag. 63-68.

9.- Problems in brewing.

The Brewer Digest.

Vol. 49, No. 11, Nov. 1974. Pag. 55.

10.- Instruction Manual.

Model 625.02

Portable dissolved oxygen analyzer.

The Hays Corporation. Michigan City. Indiana.

A Milton Roy Company.

11.- Analysis of dissolved oxygen in water, wort and beer.

American Society of Brewing Chemists.

Vol. 33, No. 33, Summer 1975, Pag. 93.



IMPRESO en los TALLERES de EDITORIAL QUETZALCOATL, S. A.  
Medicina # 37 local 1 y 2, entrada por Paseo de las Facultades, frente  
a la Facultad de Medicina de Ciudad Universitaria, México 20, D. F.  
Tels: 546-58-56 y 546-61-80