



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

## “PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL A PARTIR DE CEBADA *Esperanza Hordeum vulgare*”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

**ADALID IVAN REYES MARTÍNEZ**



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ MARIANO GARCÍA GARIBAY**

**VOCAL: Profesor: AGUSTÍN REYO HERRERA**

**SECRETARIO: Profesor: ABEL BLANCAS CABRERA**

**1er. SUPLENTE: Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**

**2° SUPLENTE: Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNAM, Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas.

**ASESOR:**

**ASESOR TÉCNICO:**

\_\_\_\_\_  
Ing. Abel Blancas Cabrera

\_\_\_\_\_  
Biol. Jesús Villegas Cruz

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
Adalid Ivan Reyes Martínez



## AGRADECIMIENTOS

Primeramente a mis padres. No me alcanzaría la vida para agradecerles todo su apoyo y comprensión que han hecho de mi lo que soy, una persona feliz y afortunada, a mi Hermana por ser la mejor compañera en esta aventura llamada vida y darme mayor motivación para terminar con este proyecto. Gracias por hacer de mi vida divertida, compartir mis triunfos y fracasos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química, que me dieron la oportunidad de ser mejor ser humano y conocer a valiosos compañeros. El ser universitarios siempre será uno de mis más grandes logros y orgullos.

A mis asesores Abel Blancas y Jesús Villegas, que en todo el tiempo de conocerlos resaltaron en mi valores como el compromiso, la dedicación la responsabilidad y el amor al trabajo además de transmitirme parte de su conocimiento. Muchas gracias por la confianza que depositaron en mí y en este proyecto.

A todos mis amigos que a lo largo de mi vida y de la carrera han ocupado un lugar importante y han dejado huella, pero en especial a: Paulina, Gaby, Diana, Sandra, Tere, Claudia, Mayra, Isabel, Antonia, Enrique, Gustavo, Luis, Israel, Erick, Luis Antonio y Víctor.

A todos mis compañeros de la Unidad de Bioprocesos, muchas gracias por el tiempo compartido y sus aportaciones.



## ÍNDICE

	Paginas
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
II.1 Definición de cerveza	8
II.2 Historia de la cerveza	8
II.3 Producción cervecera en México	11
II.4 Clasificación de las Cervezas	14
II.5 Materias Primas para la Elaboración de Cerveza	15
II.5.1 Cebada	15
II.5.2 Lúpulo	20
II.5.3 Agua	21
II.5.4 Levadura	22
<b>III. PROCESO GENERAL PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA</b>	<b>25</b>
III.1 Malteo	25
III.2 Molienda de la malta	27
III.3 Maceración	27
III.4 Obtención del mosto	28
III.5 Fermentación	30
III.6 Clarificación de la cerveza	31
III.7 Envasado	31



IV HIPÓTESIS	32
V OBJETIVOS	33
V.1 <b>Objetivos Específicos</b>	33
VI METODOLOGÍA	34
VI.1 <b>Valoración Microbiológica, Remojo, Germinación y Secado</b>	35
VI.1.1 <b>Valoración Microbiológica General</b>	35
VI.1.2 <b>Pruebas de Remojo</b>	36
VI.1.3 <b>Pruebas de Germinación</b>	38
VI.1.4 <b>Monitoreo de la Germinación</b>	39
VI.1.5 <b>Secado de la Malta</b>	42
VI.1.6 <b>Elaboración de Mosto</b>	42
VI.1.7 <b>Activación y Propagación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	43
VI.1.8 <b>Fermentación</b>	43
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
VII.1 <b>Valoración Microbiológica del Grano de Cebada</b>	46
VII.2 <b>Pruebas de remojo</b>	47
VII.3 <b>Germinación de Cebada</b>	48
VII.4 <b>Pruebas de germinación</b>	49
VII.5 <b>Secado de Malta</b>	54
VII.6 <b>Procesos de Maceración</b>	55
VII.7 <b>Activación y Propagación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	56
VII.8 <b>Producción de Cerveza a un Volumen de 3 L (condición 1)</b>	60



VII.9 Producción de Cerveza a un Volumen de 8 L (condición 1)	63
VII.10 Producción de Cerveza a un Volumen de 8 L (condición 2)	66
VIII CONCLUSIONES	70
IX BIBLIOGRAFÍA	72



## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada elaborada por medio de la fermentación de una solución de cereales principalmente cebada, donde el almidón ha sido parcialmente hidrolizado (malteo) y se le ha conferido el sabor del lúpulo por infusión.

Pero normalmente se refiere al producto elaborado a partir de malta de cebada, con o sin la adición de otros cereales no malteados denominados adjuntos (García Garibay 2002).

En México la producción de cebada en 2008 fue de 796,086 toneladas, lo que representó un aumento del 22.0%, ésta producción se encuentra concentrada principalmente en cuatro estados: Guanajuato (33.9%), Hidalgo (27.3%), Estado de México (12.6%) y Tlaxcala (11.3%). De acuerdo a estadísticas de los años 2002 al 2008 se puede observar que la producción de cebada no presenta una tendencia definitiva, estando asociada directamente con el rendimiento variable y la inestabilidad que presenta el precio, lo cual ha propiciado que productores utilicen sus tierras para la siembra de productos más rentables como el trigo.

La situación que vive el campo mexicano no es competitiva ante el resto del mundo globalizado donde la competencia es libre. El gobierno en las últimas décadas no ha fortalecido al campesino y las entidades encargadas de administrar, dirigir y destinar apoyos al campo no ha hecho su tarea, esto lo menciona la Unión Nacional de Productores de Cebada, A.C. en un análisis de la situación del financiamiento del sector social en México. Mencionan que la problemática es compleja, que inciden variables y factores combinados como: la





desarticulación entre instituciones que atienden al campo y los actores de las cadenas de valor.

Precios poco atractivos al momento de cumplir los contratos y problemas de calidad fueron sólo algunos de los inconvenientes que enfrentaron los productores de cebada en el ciclo 2009/2010. A pesar de que el cultivo venía ganando superficie en los últimos años, en la presente campaña los productores tuvieron grandes problemas al momento de comercializarlo, según informaron desde Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (CREA). Si bien en su momento la estrategia de sembrar trigo en lugar de cebada fue válida, en esta campaña son muchos los productores que están vendiendo la cebada a precios muy bajos. De hecho, algunos que no tenían contratos y tenían cebada de calidad vendieron la mercadería a mejores precios que quienes estaban atados a un contrato, aseguraron los expertos (AGROMEAT, 2010).

La SAGARPA por medio del Fideicomiso de Riesgo Compartido (FIRCO) realiza lo necesario para retomar un mecanismo de fomento, apoyo y prioridad al establecimiento de agronegocios, propiedad de los productores o en sociedad y alianza con otros agentes económicos, propiciando la competitividad de las cadenas de producción-consumo y agregando valor en beneficio del productor, esto es relevante ya que el FIRCO funciona como una incubadora de agronegocios para elevar las oportunidades de empleo e ingreso al productor primario.

Por todo lo anterior este trabajo pretende generar una metodología para realizar cerveza artesanal sin la adición de adjuntos a partir de una variedad específica de cebada explorando puntos del proceso cervecero tales como la germinación,



secado, maceración, fermentación y así generar un producto característico de la región; por lo que el productor de cebada no quedaría sujeto a depender solo del ingreso económico proveniente de la industria maltera, tampoco tendría que dejar de sembrar cebada por otro tipo de grano, sino que gracias a la oportunidad de formar un agronegocio, con ésta tecnología propuesta tendría su propia micro empresa generando empleos y un ingreso superior. Este tipo de elaboración de cerveza artesanal 100% de cebada podría implementarse primeramente en micro cervecerías, las cuales serían construidas en corredores turísticos donde se encuentran estas regiones productoras.

## **CAPITULO II. ANTECEDENTES**

**II.1.** Definición de cerveza. La cerveza es una bebida alcohólica no destilada elaborada por medio de la fermentación de una solución de cereales principalmente cebada, donde el almidón ha sido parcialmente hidrolizado (malteo) y se le ha conferido el sabor del lúpulo por infusión.

**II.2.** La cerveza es uno de los productos más antiguos de la civilización. Los historiadores creen que ya existía en Mesopotamia y Sumeria en el año 10.000 a.C. Resulta difícil determinar con exactitud cuando se elaboraron las primeras cervezas aunque se cree que son originarias de Oriente próximo. Los primeros testimonios detallados sobre la fabricación de cerveza, tal como se entiende hoy, provienen de los Sumerios que habitaban los valles entre los ríos Tigris y Éufrates, ya entonces existían diferentes estilos de cervezas; los Sumerios dejaron constancia de por lo menos 20 variedades diferentes, la denominada Sikaru, por ejemplo, se utilizaba durante las ceremonias religiosas o con fines medicinales.



Esta se elaboraba a partir de pan de mezcla de trigo emmer y cebada el cual se ponía en remojo para a continuación dejar fermentar el líquido obtenido en tinajas de barro durante varios días; por último se aromatizaba con miel y dátiles.

Las propiedades nutritivas de la cerveza fueron clave para su desarrollo inicial, aunque sus efectos intoxicantes ya eran conocidos entre los bebedores de cerveza.

Tras los sumerios, antiguos egipcios desarrollaron el arte de la fabricación de cerveza a gran escala para abastecer a las tropas del faraón con una ración diaria, y además perfeccionaron el proceso de malteo. El auge del Islam en el Oriente próximo durante los siglos VII y VIII d.C. supuso el correspondiente declive de la producción de cerveza aunque para entonces ya se había establecido en Europa.

Al fin del imperio sumerio hacia el año 2000 A.C, los babilonios se convirtieron en el impero más importante de mesopotamia; de los sumerios aprendieron la elaboración de cerveza y se sabe que los babilonios elaboraban 20 tipos de esta.

En Babilonia, el rey Hammurabi (1730-1686 a.c.), en la más antigua colección de leyes (código de Hammurabi) dispuso normas para la fabricación de cerveza. Después del vino en Grecia y Roma entre los años 500 a.c y 400 d.c la cerveza era la bebida preferida.

([http://www.gmodelo.com/como\\_producimos/como\\_producimos3.html](http://www.gmodelo.com/como_producimos/como_producimos3.html))

Hacia el siglo V d.C., la cerveza pasó a ser producida en monasterios por toda Europa, se trataba de comunidades autosuficientes que cultivaban su propia cebada y vendían el excedente de cerveza con el fin de obtener respaldo económico para sus actividades religiosas. A lo largo de los siglos los monjes han



sido responsables de importantes progresos en la fabricación de cerveza; perfeccionaron el proceso hasta lograr el método básico, que es el mismo que se sigue utilizando actualmente en las cervecerías comerciales. En Bélgica los primeros monasterios tenían un edificio dedicado a la elaboración artesanal de su propia cerveza; uno de los ingredientes utilizados fue el gruit o grutum (mezcla de cinco o seis plantas silvestres).

A finales de siglo VII se inició el empleo del lúpulo en la cerveza, antes del uso del lúpulo la cerveza se procesaba con mezcla de diferentes hierbas como se menciona anteriormente, se fomentó su uso a causa del sabor amargo, de su aporte de aroma y de su mejor conservación (Arnold, 1911). Hasta finales del siglo XV la fermentación de la cerveza se realizaba de forma espontánea y a partir del siglo XVI se comenzó a utilizar la levadura garantizando la continuidad del proceso gracias a los restos de una producción anterior (Clerk, 1969).

Hasta el siglo XVI todas las cervezas eran ales: cervezas fermentadas en caliente y con levadura de fermentación alta, es decir, que durante la fermentación sube a la superficie. En la década de 1530 las comunidades monásticas de Baviera, en Alemania, empezaron a almacenar sus cervezas fermentadas en bodegas frescas subterráneas a fin de poder proseguir la fabricación durante el verano; el almacenamiento en frío tenía un efecto importante en la naturaleza de la levadura, puesto que la hacía descender hasta el fondo y fermentar más lentamente permitiendo así tener la cerveza almacenada durante periodos de tiempo considerablemente largos. Este proceso recibió el nombre de “*lagering*”, del alemán “*lagern*” (almacenar), fuera de las abadías, la mayor parte de la producción de cerveza tenía lugar en los hogares a escala muy reducida, las



cerveceras caseras atraían a visitantes que empezaron a convertirse en clientes dando lugar a las *public houses* o *pubs*. Algunas familias crearon tradición y en el siglo XIV aparecieron las primeras cerveceras comerciales, la llegada del ferrocarril en la década de 1840 hizo posible el transporte de cerveza en cantidades significativas; otros desarrollos científicos y tecnológicos durante este periodo condujeron a la creciente automatización y mecanización del proceso cervecero, permitiendo así aumentar considerablemente la producción.

Los últimos cambios de mayor relevancia en este ámbito tuvieron lugar a mediados del siglo XIX, hasta entonces todas las cervezas eran de color marrón oscuro o rojo ámbar y tendían a ser bastantes turbias; pero en 1842 en la ciudad de Pilzen, en Bohemia un fabricante llamado Joseph Groll dio con la manera de obtener lagers doradas y cristalinas. **II.3. Producción cervecera en México:** Durante el siglo XIX se dio el ascenso de la industria cervecera en México, fundándose importantes establecimientos como la Pila Seca (1825) y la Candelaria (1849), en 1890 se da la fundación de la cervecera Cuauhtémoc consolidándose la industria cervecera en México ([www.gmodelo.com](http://www.gmodelo.com)). Actualmente el Grupo Modelo y el Grupo Cuauhtémoc-Moctezuma encabezan la industria cervecera en el país:

	2007	2008
<b>Ventas de cerveza (millones de HL)</b>	51.55	52.31
<b>Mercado domestico</b>	34.93	35.44
<b>Mercado importadas</b>	0.68	0.84
<b>Nacional total</b>	35.61	36.28
<b>Mercado de exportación</b>	15.94	16.03

Tabla1.- Ventas realizadas por grupo modelo en los años 2007 y 2008  
[http://www.gmodelo.com/responsabilidad\\_social/informe\\_2008.pdf](http://www.gmodelo.com/responsabilidad_social/informe_2008.pdf)



Algunas microcervecías son encargadas de fabricar cervezas de corte artesanal, entre ellas destacan Beer Factory, Cervecería Casta, entre muchas otras. En México existen cerveceras principalmente en el norte y centro del país, que producen cervezas artesanales tipo europeo, pero desafortunadamente en muy pocos lugares de la República se conocen. Se pueden encontrar una amplia gama de cervezas artesanales producidas en México como por ejemplo:

**Casta:** Cerveza ale oscura de cuerpo medio. Su receta emplea 6 diferentes maltas tostadas y acarameladas de Cebada y el sabor de los finos lúpulos ingleses y checos.

**Chupacabras (Baja California):** Profundo color cobrizo, con aromas a caramelo oscuro y nuez tostada. Cuerpo mediano-robusto, con un toque de cítricos dulces y lúpulo en el fondo.

**CUCAPA Honey (Baja California):** Perfectamente balanceada, refrescante, con un toque de miel; color dorado; aroma a malta y cítricos. Exquisito sabor a malta, lúpulo y, en el fondo, miel.

**Horus (Guanajuato):** Cerveza ámbar mezclada con tequila blanco *Corralejo*. El efecto de esta cerveza es sentir el sabor del tequila dejando en el paladar el resabio de la cerveza 12% Alc. Vol.

**Malverde(Jalisco):** Cerveza hecha por la cervecería Minerva, tipo Pilsner, clara con cuerpo, pero ligera. Su nombre hace referencia a un personaje del folclor mexicano, Jesús Malverde, conocido como “El bandido generoso”



**Minerva Colonial (Jalisco):** Se inspira en el estilo Kölsch, originario de la ciudad alemana de Colonia. Cerveza de gran cuerpo, obtenido de la adición de malta de trigo y el reposo prolongado posterior a la fermentación.

**Minerva Viena (Jalisco):** Debe su nombre a la cerveza europea producida en marzo y almacenada 6 meses para el Oktoberfest. Con sabor a malta tostada y color ámbar rojizo

**Minerva Stout (Jalisco):** Cerveza Ale de gran cuerpo, color oscuro, debido al proceso del tostado de la malta, que denotan la gran intensidad e imponente fuerza que resaltan en este producto.

**Mexicali:** Cerveza mexicana clara con suave aroma frutal

**Tempus doble malta (D.F.):** Cerveza Extra-Premium AltBier Imperial de cuerpo robusto y color caramelo. Graduación alcohólica de 7%.

**Tijuana Morena:** Elaborada por el Consorcio Cerveceros de Baja California. Cerveza oscura inigualable con cuerpo, suavidad, sabor ligeramente acaramelado y de buen color, 4.8% Alc. Vol.

**Weissbier (Puebla):** Cerveza de malta de trigo, de alta fermentación con un fino sabor de calidad internacional, fabricada con la receta original, bajo la ley de pureza alemana.

<http://cerveceroscaserosmx.blogspot.com/2009/03/microcervecerias-en-mexico.html>



**II.4.** Clasificación de las cervezas. Podemos hacer una clasificación de las cervezas en base a la fermentación aplicada: la de superficie o la de fondo, también llamadas fermentación alta y fermentación baja respectivamente. En ellas se utilizan diferentes cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*, la primera tiende a flotar cuando termina la fermentación y la segunda precipita. Las cervezas elaboradas con levaduras de fermentación alta son llamadas “ale” y las elaboradas con levaduras de fermentación baja “lager” (Hough, 1994).

Existen diferentes tipos de cerveza, los principales son:

#### **Cerveza Lager:**

Son de fermentación baja lo que significa que la levadura flocula hacia el fondo del tanque cuando termina la fermentación, representa más de 90% de la producción mundial, se produce utilizando levadura *Sacharomyces Uvarum* a temperaturas entre 6 y 10°C para la inoculación y entre 12 y 16°C para la fermentación.

*Pilsner*: es una cerveza con un extracto entre 11° a 13° plato.

*Münich*: cerveza oscura con un extracto de 12° plato.

*Dortmund*: cerveza clara como Pilsner con menos amargor y más suave 12-14° plato.

*Viena*: cerveza semi-oscuro, 12° plato.

#### **Cerveza Ale**

Son de fermentación alta, la levadura al final de la fermentación asciende a la superficie del tanque, hasta 1840 era el proceso normal, se produce con *Sacharomyces cerevisiae* a temperaturas de 15°C para inocular y hasta 25°C en la fermentación como máximo.





*Stout*: cerveza muy oscura, presenta una espuma muy cremosa.

*Porter*: es una cerveza stout más ligera. Es de color claro.

Existen otros tipos de Ale: *Pale Ale*, *Mild Ale*, *Bitter Ale*, *Brown Ale*, *Barley Wine*.

*Lambic*: es original de Bélgica, tiene un sabor ácido y se obtiene por fermentación espontánea.

*Trappist*: se produce en monasterios de Bélgica con un sabor específico.

**Cerveza Light**: aquellas cervezas producidas bajo condiciones especiales que dan una reducción en la cantidad de carbohidratos y por consecuencia en el número de calorías, esta reducción representa aproximadamente un tercio del valor de las cervezas normales.

**Cerveza Dry**: se produce congelando la cerveza en su etapa de reposo para obtener una mayor separación de proteínas, son de más alto contenido de alcohol que las cervezas regulares.

**Cerveza Sin Alcohol**: son cervezas que tienen diferente contenido de alcohol según la norma vigente de cada país, varía de 0.1 a 1.0%vol. de alcohol. Se obtiene por medio de un proceso de eliminación del alcohol de una cerveza normal o bien mediante una fermentación controlada.

**Cerveza Shandy**: es una mezcla de cerveza regularmente tipo Light con un concentrado cítrico o de fruta y agua carbonatada (<http://www.cervezacasera.com.mx>, 2009).

## II.5. Materias Primas Necesarias Para la Elaboración de Cerveza.

### II.5.1 CEBADA

Después del maíz, el trigo y el arroz, la cebada es el cultivo más importante a nivel mundial, representa el 7% del total de la producción de granos. Su principal



destino es la fabricación de cerveza, la alimentación del ganado, la industria panificadora, la producción de alcohol, como sustituto de café y la fabricación de azúcares; actualmente la comunidad Europea es el principal productor del mundo, seguido de Rusia, Canadá y Ucrania. México se ubica en el lugar 13 como productor y 11 como consumidor.

Las principales zonas en México que abastecen de cebada son Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Durango, San Luís Potosí y Querétaro (Bancomext 2007).

Región	Estados	No de productores	% de la producción
Altiplano Central	Hidalgo, Estado de México, Puebla, Tlaxcala	41,134	45.8
Bajío	Guanajuato, Michoacán, Querétaro	6,442	49.4
Centro norte	Durango, San Luís Potosí, Zacatecas	2,737	1.5

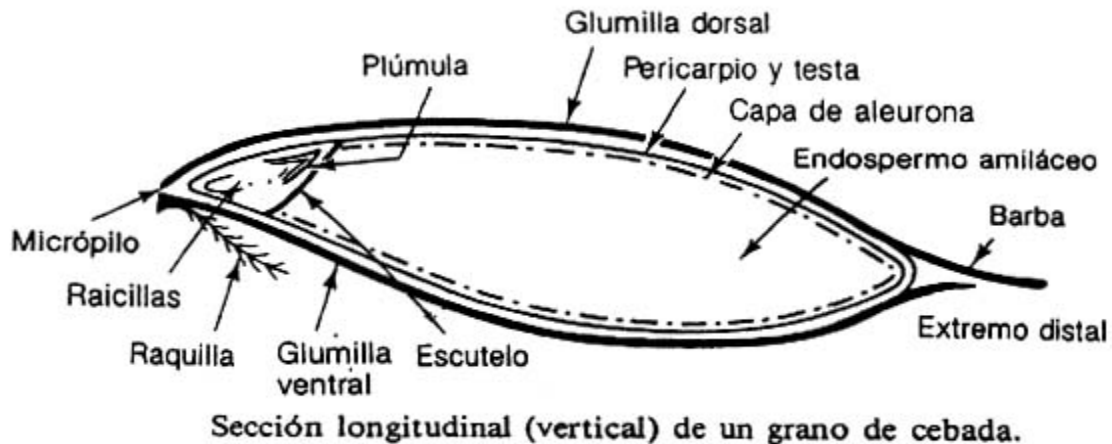
**Tabla 2.- Producción anual de cebada en México; Consejo nacional de productores de cebada maltera, agrupan a 50,300 productores, que representan el 89% del total nacional, los cuales aportan el 97% del total de la producción anual; SAGARPA 2008.**

Los tipos de cebada que se cultivan en los estados de Hidalgo y Tlaxcala pertenecen a la especie *Hordeum vulgare*; existe una amplia diversidad de variedades de cebada, entre las cuales se pueden destacar Esmeralda, Pastor Ortiz, M16, Esperanza, Gaviota, Forrajera, etc.; actualmente la industria maltera utiliza la variedad Esmeralda de temporal y la Esperanza de riego.

Botánicamente la cebada se encuentra dentro de las gramíneas; existiendo dos grandes especies: La cebada de dos hileras u *Hordeum distichum* y la cebada de

seis hileras o *Hordeum vulgare*, el tamaño del grano depende de la influencia del medio ambiente y sus características anatómicas se muestran en la figura 1.

**Figura1.- Descripción anatómica del cariósido de cebada, tomada del Hough 1994**



Conocer la estructura y la composición del grano de cebada es importante para entender los cambios que se llevan a cabo en el proceso cervecero.

**Cáscara:** Es la capa protectora del grano, gruesa en la parte que cubre el germen y delgada en el extremo opuesto; la cebada de dos hileras generalmente tiene cáscaras más delgadas.

**Pericarpio y Epicarpio:** Capas semipermeables que se encuentran de bajo de la cascarilla evitando así el paso de agua, ácidos y bases entre otros.

**Aleurona:** Formada por tres capas de células vivas donde se inicia la síntesis de la mayor parte de las enzimas del grano.

**Endospermo:** Se encuentra debajo de la capa de aleurona, se compone de almidón principalmente. Se encuentra en el endospermo de la cebada en forma de gránulos específicos que miden entre 20-25  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1-5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

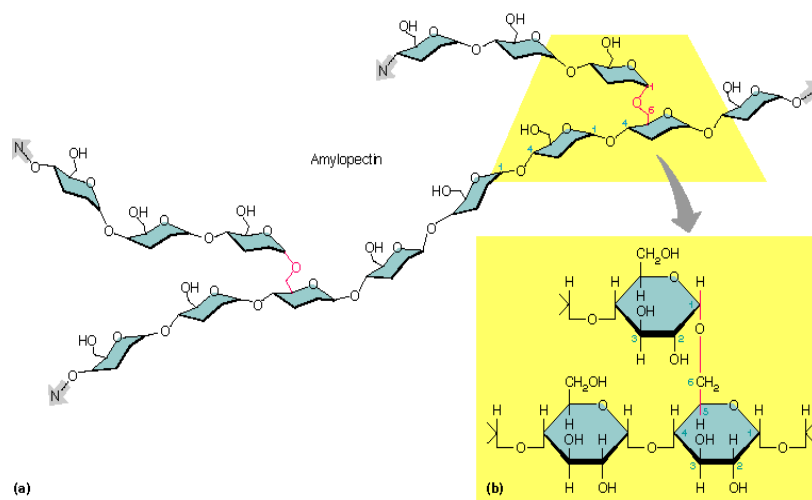
Todos los gránulos de almidón se encuentran envueltos dentro de una matriz

proteica. Durante la germinación, solamente un 15% del total de almidón es hidrolizado para ser consumido por el embrión en su respiración, por lo que la ruptura total del almidón se completa en la maceración del mosto cervecero gracias a la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa; enzimas inducidas durante la germinación. El almidón está compuesto por unidades de amilosa y amilopectina.

**Amilopectina:**

Se trata de un polímero ramificado compuesto por unidades de D-glucosa, unidas por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) en la cadena lineal y con ramificaciones unidas por enlaces  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6).

La amilopectina supone el 75-80% del almidón de cebada (Callejo, 2002).



**Figura 2.- Estructura química de la molécula de amilopectina,**  
([www.bifi.unizar.es/.../almidon/amilopectina2](http://www.bifi.unizar.es/.../almidon/amilopectina2))

**Amilosa:**

Es un polímero de cadena recta formado por unidades de D-glucosa que se unen mediante enlaces  $\alpha$  (1-4). La amilosa ocupa de 20-25% del almidón total. La amilosa puede ser hidrolizada completamente a maltosa por la acción combinada

de  $\beta$ -amilasa y otras enzimas denominadas isoamilasas (Banks *et Greenwood*, 1973).

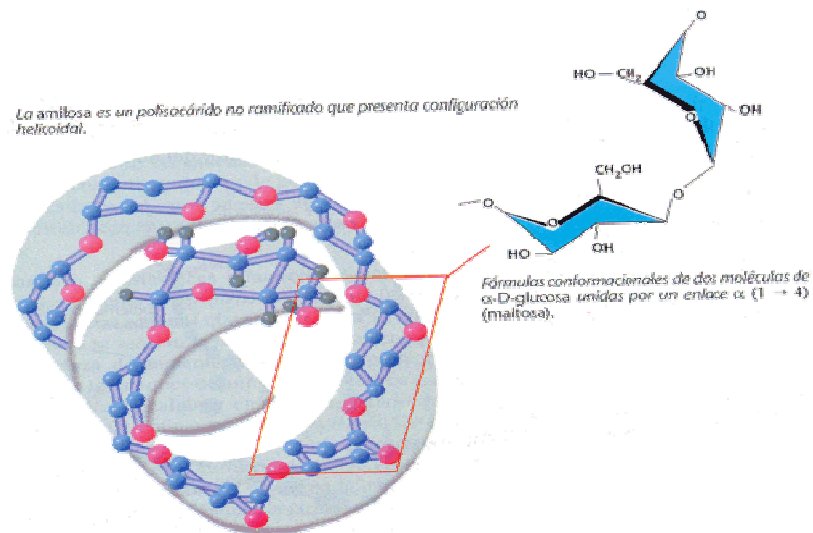


Figura 3.- Estructura química de la amilosa ([www.javeriana.edu.co/.../celular/amilosa](http://www.javeriana.edu.co/.../celular/amilosa))

Embrión: Contiene proteína, grasa y ácidos nucleicos. Estimula la síntesis de enzimas para que dé principio a la germinación desarrollándose así las raicillas y la plúmula (Callejo, 2002).

Tabla 3.- Análisis proximal del grano de cebada (Canadian Grain Comision 2001).

COMPONENTE	PORCENTAJE (%)
Proteína	10 – 12
Grasa	1.8 – 3.0
Carbohidratos	54 – 65
Celulosa	8 – 10
Minerales	2 – 3
Agua	10 - 14

En el grano un porcentaje de humedad elevado favorece a su contaminación y perjudica la germinación, la proteína es un parámetro también importante porque



nos indica la calidad de la malta, en la Norma Mexicana se especifican valores inferiores al 12% en el grano (NMX-FF-043\_1982).

## II.5.2 LÚPULO

*Humulus lupulus*, es una planta que pertenece a la familia de las *Urticaceae*. Las flores femeninas aportan la sustancia lupulina, que contiene resinas amargas y aceites esenciales que son útiles para imprimir aroma y amargor característico a la cerveza, los principales productores de lúpulo son Estados Unidos, Canadá, Alemania e Inglaterra.

Las resinas están constituidas por  $\alpha$  y  $\beta$  ácidos; los  $\alpha$  ácidos o humulonas constituyen el primer componente amargo de la cerveza, son cinco compuestos: Humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona y posthumulona; estos ácidos sufren un cambio estructural durante la ebullición del mosto originando compuestos iso-alfa-ácidos que son compuestos amargos característicos de la cerveza (Hopunion, 1999). Existen diferentes presentaciones: en flor seca, polvo, extractos y jarabes (Pollock, 1979).

El lúpulo otorga beneficios en la formulación de la cerveza:

- Proporciona la nota amarga a la cerveza
- Alarga la vida de anaquel por su actividad bacteriostática
- Contribuye al perfil de sabor y aroma de la cerveza
- Proporciona antioxidantes



### II.5.3 AGUA

Las características de agua en el proceso de elaboración de cerveza influyen de sobremanera en la calidad de la misma, hasta el punto en que los tipos más conocidos de cervezas, Pilsen, Munich, Pale ale, Viena, Dortmund entre otras han estado desde siempre ligados a la naturaleza especial del agua de las localidades en que tuvieron su origen. Esta materia prima representa un 92% del producto terminado, existen parámetros microbiológicos que aseguran la calidad del agua además de parámetros fisicoquímicos que comprenden a lo relativo a los compuestos químicos y su pH.

El agua debe cumplir con las normas de calidad establecidas para obtener un buen producto, en este caso es necesario cubrir con los siguientes parámetros en cuanto al aspecto microbiológico (NOM-201-SSA1-2002):

**Tabla 4.- Límite máximo de microorganismos presentes en el agua de acuerdo a la norma NOM-201-SSA1-2002**

MICROORGANISMOS	LÍMITE MÁXIMO
Coniformes totales	2 NMP/100ml
Coniformes totales	0 UFC/100ml
<i>Vibrio cholerae</i>	Negativo

**Tabla 5.- Compuestos presentes en el agua para llevar a cabo un buen desarrollo del proceso ( Houg 1994).**

COMPUESTO	LÍMITE (mg/L)
Nitrato	<20
Cloro	<250
Sulfato	<100



Calcio	40 – 100
Magnesio	10 – 50
Fierro	<0.1
Silicato	<50

El nitrato, silicatos, fierro y sulfatos afectan el proceso cervecero cuando se presentan en valores superiores a los indicados, formando posible anhídrido sulfuroso, en contraste las concentraciones adecuadas de cloruro, calcio y magnesio proporcionan ventajas, el cloruro es un ión compartidor de sabor, el calcio regula el pH del proceso y el magnesio participa como coenzima (Padilla 2000).

Se puede decir que cuando una cerveza tiene sabores suaves requiere de agua suave y baja en sales, mientras que una cerveza oscura requiere agua dura y alta en sales.

#### II.5.4 LEVADURA

Son hongos unicelulares que se producen por gemación en condiciones estériles, estos microorganismos son responsables de la fermentación de los azúcares presentes en el mosto produciendo etanol y CO<sub>2</sub>, son capaces también de metabolizar elementos como el fósforo y los compuestos nitrogenados.

Una célula de levadura de cerveza cuando se desarrolla plenamente tiene entre 8 y 14 micrómetros de diámetro, un examen microscópico ordinario muestra que cada célula está rodeada de una pared y en el interior se pueden distinguir pocas estructuras, para poder observar otros organelos se necesita recurrir a preparaciones teñidas (ver fig. 4).



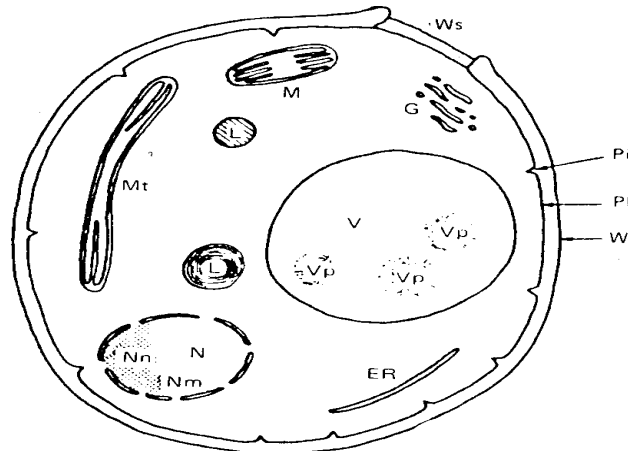


Figura 4.- Diagrama de una electronografía de la sección transversal de una célula en reposo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). ER, retículo endoplásmico; M, mitocondrias; N, núcleo; Nm, membrana nuclear; Nn, nucléolo; Pi, invaginación; PI, plasmalerna; V, vacuola; Vp, granulo de polimetafosfato; W, pared celular; Ws, cicatriz de gemación; L granulo lipídico. (Hough, 1994)

La levadura comienza a metabolizar los azúcares fermentables que se encuentran en el mosto, cuando el oxígeno se termina, la etapa de multiplicación celular habrá concluido pero la fermentación seguirá en curso. Según la cepa de levadura la fermentación durará cierto periodo de tiempo.

Se utilizan dos subespecies de levadura, la primera *Saccharomyces cerevisiae*, que produce cerveza tipo *Alc* que es de fermentación alta; la segunda llamada de fermentación baja se incluye en el género *Saccharomyces uvarum*, que sedimenta en el fondo y produce cerveza *lager*. Cabe destacar que la mayoría de las cervecerías en México consumen este tipo de levadura. Algunas características generales en la cepas de levadura son: capacidad de flocular, capacidad de producir etanol, tolerancia al alcohol, tolerancia a la osmolaridad del medio, tolerancia a altas temperaturas, capacidad y vigor en la fermentación de azúcares y capacidad para producir congenéricos por ejemplo los alcoholes superiores (n-



propanol, isobutanol, alcohol amílico, isoamílico, etc.), ésteres (acetato de etilo y acetato de isoamilo), carbonilos (acetaldehídos, dicetonas vecinales).

El fenómeno de floculación se debe a un cambio en la composición de la pared celular de la levadura, provocando la agregación de células mediante puentes de calcio o de magnesio.

## CAPITULO III. PROCESO GENERAL PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA

### III.1 MALTEO

Para la obtención de malta, el grano de cebada debe de pasar por tres operaciones básicas: remojo, germinación y secado, primeramente la cebada se somete a un lavado para eliminar de la superficie cualquier contaminante y disminuir la carga bacteriana si es posible (ver fig. 5).



Figura 5.- Procesos de malteado de cebada ([www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/7522/maltade.htm](http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/7522/maltade.htm))

La primera fase del malteado consiste en un remojo del grano hasta que este alcance, 42-45 % de humedad para que se pueda llevar a cabo la germinación, conforme aumenta la humedad del grano, éste comienza a respirar y a consumir oxígeno siendo necesario airear los granos, pues caso contrario el grano se asfixiará por la producción de  $\text{CO}_2$ , se logra la aireación mediante el cambio del agua de remojo y/o inyección de aire (Hoseney 1994). Después del remojo viene la germinación la cual está marcada por cuatro fases

1. Absorción del agua por el embrión.
2. Activación de enzimas.



3. Desarrollo de tejidos embrionarios.
4. Ruptura de la pared del embrión por el germen.

La etapa de germinación del grano de cebada se realiza bajo condiciones de temperatura, humedad y oxigenación adecuadas para así tener una mayor actividad enzimática que se pueda mantener aún después de secado el grano. Cuando la plúmula crece a unas tres cuartas partes del tamaño del grano se dice que se ha obtenido una buena concentración de enzimas (Serna 2001); para el proceso de germinación se recomienda temperaturas alrededor de los 15 °C y se utilizan menores temperaturas también para evitar el desarrollo de hongos y una mejor formación de enzimas principalmente.

Los objetivos del secado en la malta son varios, el principal es parar la germinación y el desarrollo de la cariósida para obtener un producto estable con actividad enzimática una vez que se ponga de nuevo en contacto con agua. El secado además baja la humedad de la malta para que pueda ser almacenada por periodos prolongados.

La cebada germinada comienza a secarse a temperaturas bajas (35 – 45°C), a medida que disminuye la humedad del grano se aumenta la temperatura de secado hasta 65-70° C o a temperaturas mayores dependiendo del tipo de malta que se requiera obtener, cuidando que no haya un sobrecalentamiento ya que provocaría rompimiento del grano y la destrucción de enzimas.



Se pueden obtener diferentes tipos de maltas, esto se realiza siguiendo un programa de secado para cada variedad tales como: maltas cerveceras claras, maltas cerveceras claras especiales, maltas oscuras (*Secadas parcialmente*), maltas tostadas, maltas destiladas, entre muchas otras variedades.

### III.2 MOLIENDA DE LA MALTA

La malta producida es molturada en rodillos para tener la cáscara casi completa para que ayuden más adelante al paso de filtración del mosto, es importante que la cascarilla no se encuentre de tamaño muy reducido ya que libera más compuestos fenólicos de los deseados. Uno de los objetivos importantes de obtener tamaño de partícula adecuado es favorecer la actividad enzimática, ya que se tiene mayor superficie de contacto y un mosto rico en azúcares fermentables por la efectiva hidrólisis (Serna 2001).

Este paso se realiza en molinos de rodillos que se encuentran acomodados en pares, dependiendo de número de rodillos se clasifican en molinos de 2,4,5 y 6 de estos, giran a diferentes velocidades y en sentido opuesto favoreciendo así la obtención de partículas homogéneas y la cascarilla entera.

### III.3 MACERACIÓN

La maceración tiene como objetivo hidrolizar el almidón proveniente de la malta por medio de la acción enzimática, la malta produce azúcares fermentables y dextrinas las cuales son las que le proporcionan el cuerpo de la cerveza. De acuerdo a la temperatura utilizada actúan diferentes enzimas sobre el almidón, las proteínas se degradan en péptidos y aminoácidos libres que serán asimilados por la levadura, las  $\beta$ -glucanasas y pentosanas degradan polímeros correspondientes reduciendo la viscosidad de mosto. En las etapas principales de la maceración de



la malta (45 – 60°C) actúan las proteasas y  $\beta$  –glucanasas; a temperaturas más altas (60 – 65° C) se favorece la acción de amilasas. La  $\alpha$  –amilasa es una endoenzima que hidroliza los enlaces  $\alpha$  1-4 de la amilasa y de la amilopectina, el producto de esta enzima son las dextrinas y oligosacáridos en menor proporción; su temperatura óptima es alrededor de los 70° C.

La  $\beta$ - amilasa también hidroliza los enlaces  $\alpha$  1-4, pero en este caso es una exoenzima que actúa a partir de los extremos no reductores liberando una molécula de maltosa y dextrinas, su temperatura óptima se encuentra alrededor de los 60°C (García Garibay 2002).

Al degradar el almidón hasta maltosa, glucosa, maltotriosa y dextrinas se termina la maceración y el mosto producido está constituido por estos azúcares que serán más fáciles de fermentar.

#### III.4 OBTENCIÓN DEL MOSTO

Una vez terminada la maceración el mosto debe separarse de los restos de la malta, el objetivo es obtener la mayor cantidad de mosto posible, se puede verter el contenido del macerador en otro recipiente con perforaciones en el fondo funcionando como suelo falso y a su vez servirá como soporte de las cascarillas. Las cascarillas se depositan en el fondo del recipiente formando un lecho filtrante y encima de las cascarillas se depositarán los demás componentes.

El mosto dulce se pasa a un recipiente donde se le adicionará el lúpulo y se someterá a ebullición durante 30-90 minutos, la cantidad de lúpulo adicionada varía dependiendo del tipo de cerveza. Los objetivos de esta operación son (García Garibay, 2002).



- Extraer las resinas y aceites esenciales del lúpulo.
- Inactivar las enzimas para detener la conversión excesiva del mosto.
- Coagular proteínas y favorecer las reacciones entre taninos y proteínas.
- Esterilizar el mosto para evitar la presencia de microorganismos que compitan con la levadura durante la fermentación.
- Promover las reacciones de Maillard y de oxidación de compuestos fenólicos para la formación de melanoidinas que contribuyen al color y sabor de la cerveza.
- Volatilizar compuestos que dan aromas indeseables.
- Eliminar aproximadamente 10% del volumen de agua para concentrar el mosto.
- Disminuir el pH por la precipitación de fosfatos de calcio y otros iones.

Al añadir el lúpulo se puede hacer al principio o dividirlo en porciones, por ejemplo; si se hace en dos porciones la primera carga tiene por objetivo impartir amargor, esta se agregaría a los 15 minutos de comenzado el hervor, la segunda carga imparte el aroma por eso se realiza al final (10 minutos antes del término de la ebullición).

El mosto todavía caliente debe enfriarse lo antes posible con la finalidad de llegar a una temperatura adecuada en la cual se pueda añadir la levadura además para evitar contaminación por el tiempo que tardaría en bajar la temperatura hasta 20° C, dando así un choque térmico a los microorganismos.



### III.5 FERMENTACIÓN

Los términos fermentación alta y fermentación baja se refieren a la propiedad de las cepas de levadura a flocular o flotar, en el primer caso a flotar y hundirse en el fermentador en el segundo. Las cervezas tipo ale se realizan con levaduras altas, cepas que se consideran de la especie *S. cerevisiae*, por otro lado las del tipo lager se elaboran con levaduras bajas de la especie *S. uvarum*; las cepas de cervecerías pueden presentar distintos comportamientos de floculación y se han clasificado en cuatro categorías:

- Clase I: levaduras que no floculan.
- Clase II: levaduras que floculan en aglomerados flojos asociados al CO<sub>2</sub> y flota en el líquido formando una nata (levaduras altas).
- Clase III: floculan formando aglomerados compactos, no se asocian a las burbujas del gas y se hunden en el líquido (levaduras bajas).
- Clase IV: levaduras que floculan desde etapas tempranas debido a la capacidad de formar pseudomicelio (son también levaduras altas).

Las cepas de *S. cerevisiae* tienen temperaturas óptimas de crecimiento de entre 37 y 40° C , mientras que las *S. uvarum* entre 31 y 34 ° C, por lo que las primeras son más rápidas en fermentaciones a altas temperaturas y las segundas son más rápidas a temperaturas bajas (García Garibay, 2002, Bamforth 1998).

El objetivo de la fermentación es transformar los azúcares fermentables en alcohol y CO<sub>2</sub>, esta transformación puede durar de 7 a 10 días y depende de la composición del mosto, la cepa de levadura que se va a emplear y las condiciones del proceso.





El mosto adicionado con lúpulo es un medio rico que contiene carbohidratos asimilables, aminoácidos, sustancias nitrogenadas, sales minerales y vitaminas; en la fermentación la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto determinará la velocidad de multiplicación de las levaduras y a partir de los compuestos que se encuentran en el mosto se formarán etanol, CO<sub>2</sub>, alcohol metílico, ésteres, diacetilo y acetaldehídos. El control de estos compuestos durante este proceso es importante para conseguir una calidad buena en el producto ya que influyen directamente en el sabor, aroma y espuma de la cerveza.

En un segundo paso de la fermentación es la maduración que tiene una duración de entre 15 y 25 días a temperaturas bajas (0 a 4° C), el producto se mantiene en reposo y la fermentación seguirá realizándose de forma mucho más lenta por las levaduras que quedaron en suspensión. Si la cantidad de levadura y proteínas depositadas es mayor, menor será la cantidad a filtrar (Hough, 1994).

### III.6 CLARIFICACIÓN DE LA CERVEZA

Uno de los objetivos principales por el cual se lleva a cabo esta etapa es; eliminar por completo las levaduras y posibles restos orgánicos contenidos, el segundo objetivo es la propia clarificación de la cerveza generándose una vez terminado el periodo de maduración y ya que el perfil de sabor y aroma estén definidos (Pollock, 1987).

### III.7 ENVASADO

Al llevarse a cabo la clarificación de la cerveza se transfiere a botellas o a un barril de presión, se debe evitar que quede una gran cantidad de aire en la parte superior de la botella que pueda oxidar a la cerveza. Se recomienda llenar hasta 3 centímetros debajo del borde; en algunas ocasiones cuando queda alguna porción



de levadura se le agrega extracto de malta o azúcar para que siga produciendo  $\text{CO}_2$  durante su almacenamiento.

#### **CAPITULO IV. HIPÓTESIS**

El endospermo del grano de cebada contiene una gran cantidad de carbohidratos que se encuentran en forma de almidón y por la acción de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas podría ser solubilizado e hidrolizado hasta azúcares reductores. Por lo tanto si se realiza una cinética de germinación de la cebada y se encuentran las condiciones ideales en donde las enzimas (principalmente amilasas) muestran una actividad elevada, la cantidad de azúcares reductores por consecuencia también se incrementará, por lo tanto no será necesario adicionar adjuntos en el proceso de elaboración de cerveza, aprovechando así el material de reserva que contiene el grano de cebada y obteniéndose al final un producto de tipo artesanal.



## CAPITULO V. OBJETIVOS

### V.1 OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar una metodología para elaborar cerveza de manera artesanal, caracterizando puntos del proceso cervecero tales como la germinación, secado, maceración y fermentación.

### V.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

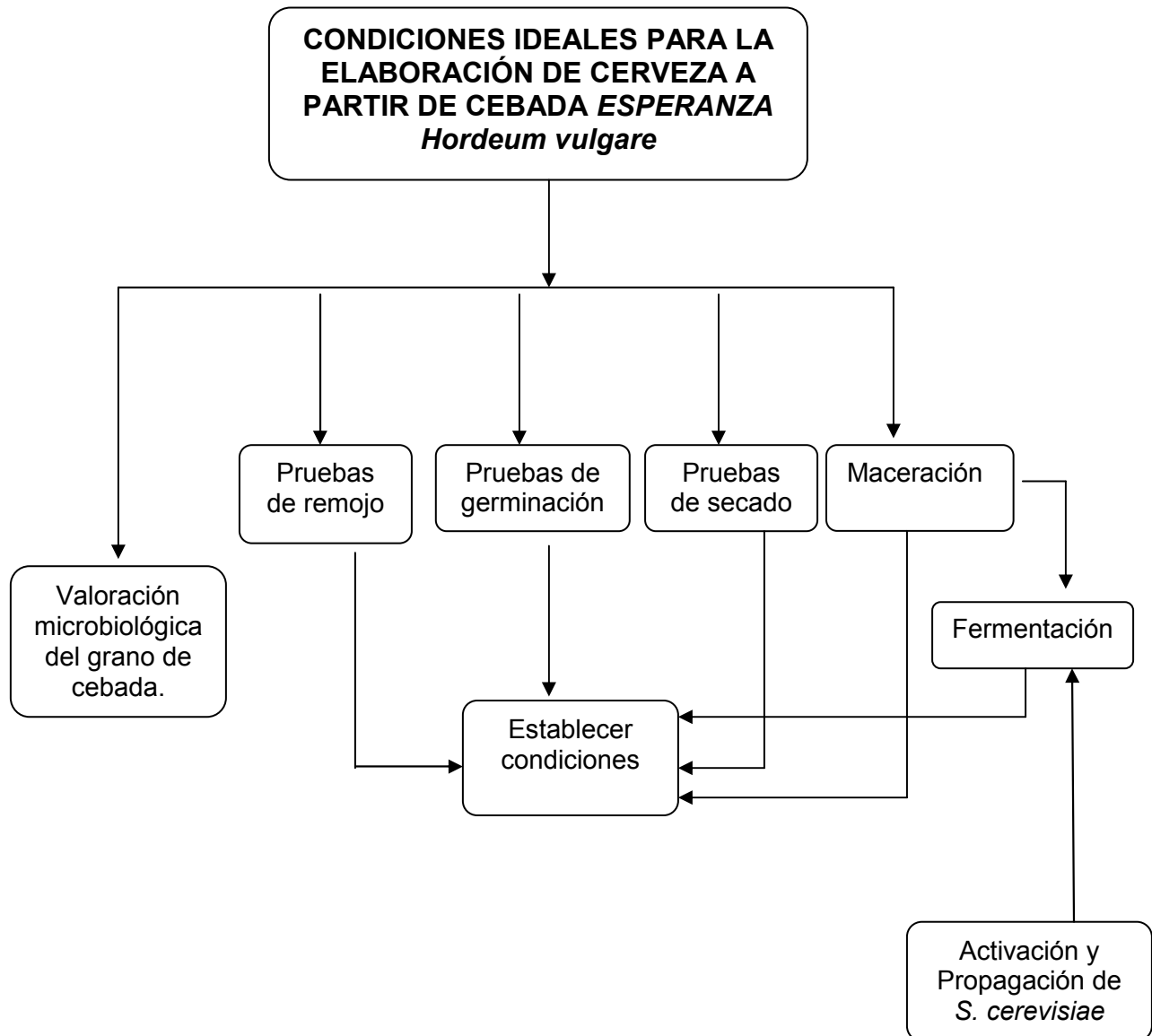
- Realizar una valoración microbiológica del grano de cebada para observar si disminuye la carga microbiana presente.
- Determinar las condiciones óptimas de remojo de cebada Esperanza para la elaboración de malta.
- Determinar las temperaturas y tiempos ideales de germinación de cebada Esperanza.
- Evaluar el proceso de germinación con pruebas analíticas tales como determinación de azúcares reductores, poder diastásico y proteínas.
- Elaborar malta cervecera en las condiciones de tiempo y temperatura antes establecidos.
- Evaluar el tiempo y temperatura de secado de la malta.
- Realizar pruebas de maceración a distintas temperaturas
- Determinar la concentración de azúcares reductores y totales del mosto obtenido bajo las condiciones establecidas.
- Obtener las cinéticas de crecimiento de la levadura a emplear (*Saccharomyces cerevisiae*) durante la propagación y la fermentación.



- Llevar a cabo el escalamiento de la fermentación del mosto a 8 L y realizar pruebas al producto (azúcares reductores, azúcares totales, densidad óptica y la determinación de la concentración de etanol).

## CAPITULO VI. METODOLOGÍA

### DIAGRAMA DE TRABAJO GENERAL

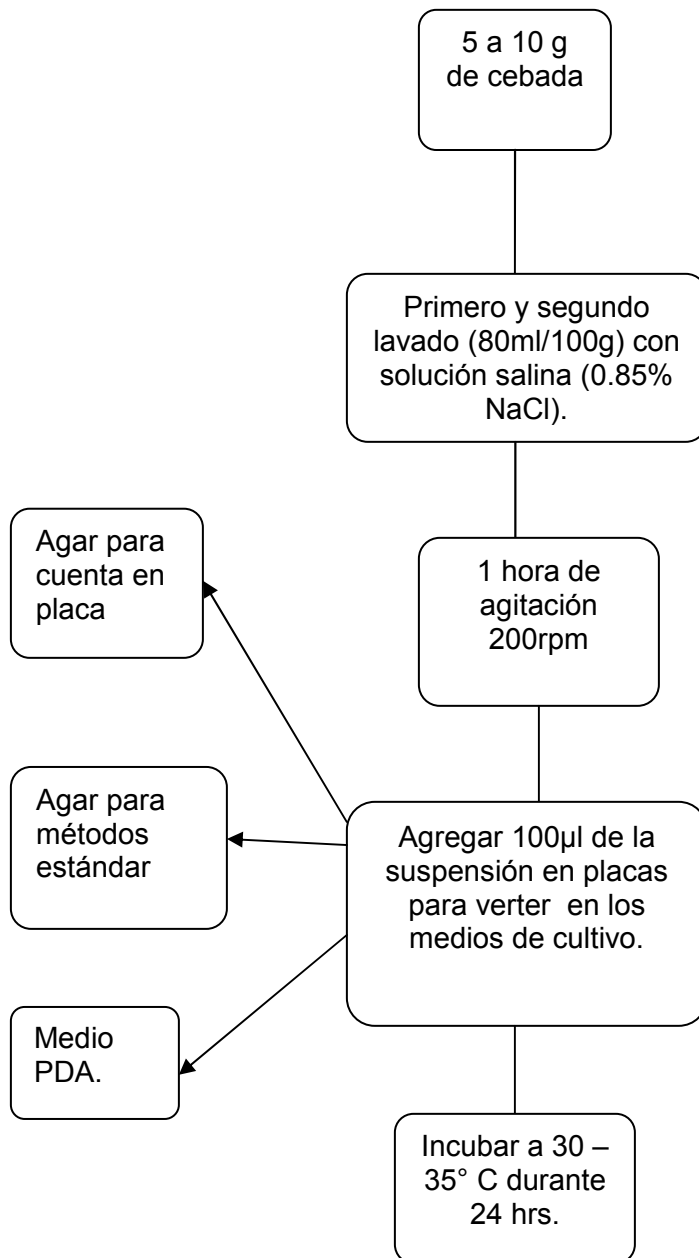




## VI.1. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA, PRUEBAS DE REMOJO, GERMINACIÓN Y SECADO.

### VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA GENERAL

La prueba microbiológica utilizada para valorar el grano de cebada es rápida y nos indica el crecimiento microbiano, para tomar posteriormente otras medidas en el caso que fueran necesarias, tales como un lavado con un agente, antiséptico etc.





### VI.1.2 PRUEBAS DE REMOJO

Las pruebas se realizaron en condiciones de temperatura ambiente (20°C), para este ensayo se tomaron 40 gramos de cebada variedad Esperanza, realizando dos lavados con 80 ml de solución salina isotónica. Posteriormente los lotes de grano se colocaron en probetas adicionándoles 100 ml de agua corriente para que el remojo se llevara a cabo en un tiempo de tres días; durante cada día se hicieron determinaciones de humedad hasta obtener un valor entre 42-46% Humedad indicado, para pasar a la siguiente etapa de germinación (Velázquez Madrazo, *et al*, UNAM 2004).

Otro ensayo de remojo se realizó bajo las mismas condiciones de temperatura, cantidad de cebada, los dos lavados con solución isotónica y la cantidad de agua, pero la diferencia en este caso fue el recipiente en donde se llevó a cabo, que fue en vasos de precipitados. Esto para conocer si la superficie de contacto influye en una mejor absorción de agua por parte del grano; además estas pruebas de remojo se hicieron con recambio y sin recambio del mismo volumen de agua, tratando de saber si esta maniobra aporta un beneficio durante el proceso de absorción de agua.

A las aguas de lavado que se recolectaron, se les realizaron pruebas microbiológicas para conocer cuanto bajó la carga microbiana y si era necesario realizar otro tratamiento. Para estas valoraciones se utilizaron los mismos medios de cultivo que en la valoración general con la misma técnica de vertido en placa, haciendo las diluciones correspondientes en las aguas de lavado.



Para determinar la humedad en la cebada durante los días de remojo se utilizó el método por secado en estufa, esta determinación se basa en la pérdida de agua por la aplicación de energía a la muestra en forma de calor (Kirk *et al*, 1996)

#### MÉTODO POR SECADO EN ESTUFA:

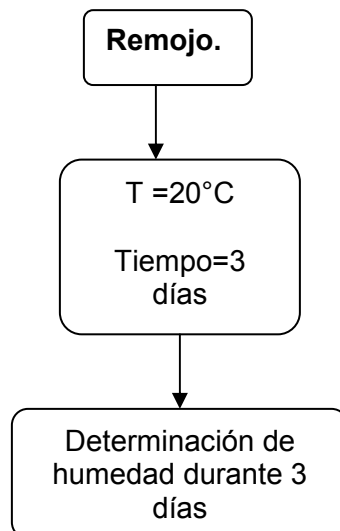
Se pesaron lotes de 40 gramos de muestra húmeda en pesafiltros (previamente valorados en peso después de tenerlos 2 horas a 130° C aproximadamente). Se secaron las muestras por 24 horas en la estufa a 100-110 °C.

Se retiraron las muestras de la estufa, se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron tan pronto como se equilibraron con la temperatura ambiente.

Se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de peso.

Material y aparatos empleados:

- Balanza
- Pesafiltro metálico
- Estufa eléctrica con regulación de temperatura
- Desecador.



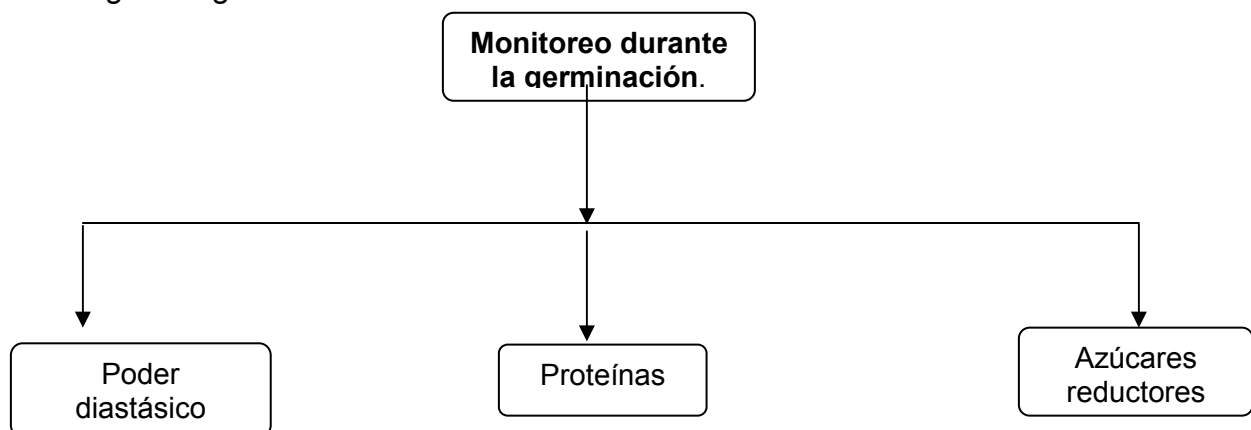


### VI.1.3 PRUEBAS DE GERMINACIÓN

La etapa de germinación se realizó en un periodo de 5 días valorando dos temperaturas 20 y 25°C. En este caso se hicieron determinaciones de azúcares reductores, poder diastásico y proteínas, antes de la germinación y durante el monitoreo. Previamente se determinó la viabilidad germinativa que posee esta variedad de grano.

**Viabilidad germinativa.** Para obtener el porcentaje de viabilidad germinativa se aplicó una prueba rápida recomendada por la Norma Mexicana (MX-FF-043-SCFI-2003); esta prueba se basa en germinar el grano de cebada con la adición de peróxido de hidrógeno al 30%, dado que éste ayuda a desencadenar la actividad hormonal del grano y por consecuencia de las enzimas amilasas principalmente. La prueba se realiza de la manera siguiente:

Contar 100 granos de la muestra, pasarlos a un matraz de 125 ml, adicionar 100 ml de agua destilada, 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y tapar durante 2 días, después de este tiempo cuantificar los granos germinados. El número de granos germinados es directamente proporcional al porcentaje de germinación, se considera que una buena actividad germinativa es cuando se obtiene más del 85% de los granos germinados.







#### VI.1.4 MONITOREO DE LA GERMINACIÓN

Durante el monitoreo de la germinación, se determinaron tres parámetros importantes como son: el poder diastásico, las proteínas y los azúcares reductores. Primeramente se obtienen los extractos correspondientes a cada día de germinación, la extracción se realizó pesando 2 gramos de grano germinado, macerándolo de manera tal que al ponerse en contacto con 48 ml de agua se disuelva y se realice una extracción con la mayor cantidad de enzimas y de azúcares reductores. La muestra con agua se agita durante 1 hora a 100 rpm con una temperatura de 40° C finalmente se filtra con papel whatman #40 (Ruíz, S. Y., 2006).

Obtenido el extracto de cebada, se realizó una hidrólisis enzimática adicionando 0.5 ml del extracto a 10 ml de una solución de almidón (20g/L) a pH 4.3 (ajustado con buffer de acetato de sodio), la hidrólisis se llevó a cabo a 20° C durante 30 minutos.

#### **Determinación del poder diastásico por el método de extinción del complejo almidón-yodo.**

El poder diastásico se determinó por el método de extinción del complejo almidón-yodo que se basa en la propiedad del almidón soluble de formar un complejo café en presencia del reactivo yodo-yoduro que absorbe a 600nm. Por la acción de la amilasa disminuye el color producido por el complejo. Para esta cuantificación se realizó una curva patrón de almidón (en todos los casos se utilizó almidón soluble de papa Prolabo-Merk Eurolab)



Este procedimiento únicamente puede ser utilizado cuando el almidón se encuentra completamente disuelto (gelatinizado). En un tubo de ensayo coloque 2 ml de la mezcla de extracto enzimático con almidón residual y se adicionaron 3 ml de una solución de I/KI (yodo/yoduro de potasio) preparada diluyendo 2 ml de solución de yodo en 100 ml de agua (1.269g I<sub>2</sub> con 1.8g KI en 100ml agua).

Se mide la intensidad del color producido en un espectrofotómetro a 600 nm, frente a un blanco de reactivos con agua.

### **Determinación de proteínas mediante el método de Lowry.**

El método de Lowry (1951) es un método calorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas por la presencia de aminoácidos aromáticos. A la muestra se añade una mezcla de reactivos que forma un complejo colorido con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert – Beer.

Reactivos:

- Solución A: Sulfato de cobre 1%
- Solución B: Tartrato doble de sodio y potasio al 2%
- Solución C: NaOH 0.1M + Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> al 2%
- Solución D: 1A + 1B
- Solución E: 1D + 50C
- Reactivo de Foli: 1:3 (con agua destilada)

Procedimiento:

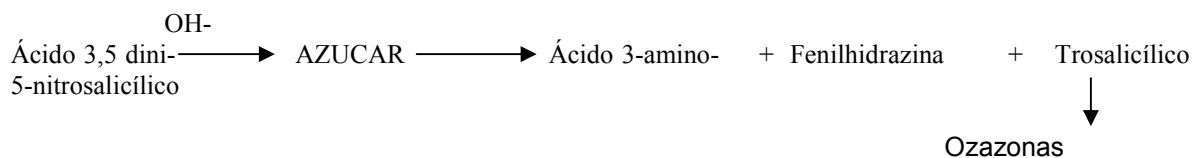
Se coloca en un tubo de ensayo 1 ml del extracto, se adiciona 5 ml de solución E se agita y se deja reposar 10 minutos acto seguido, se agrega 0.5 ml del reactivo de Foli, se agita y se coloca en oscuridad durante 30 minutos, por último se lee a



590 nm con un blanco de agua elaborado bajo las mismas condiciones. Se interpolan los valores de absorbancia obtenidos en una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina [0 a 500µg /ml].

### Determinación de azúcares reductores por el método de DNS

Este método se basa en la reducción de un grupo nitro para la posterior formación de aminas, el aldehído de los azúcares es oxidado.



Procedimiento: Tomar 0.5 ml de la solución acuosa de la muestra, adicionando 1.5 ml del reactivo de DNS agitar y calentar por 5 minutos en un baño de agua hirviendo, posteriormente se enfría y diluye con 5 ml de agua destilada. Por último, leer la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de agua y reactivos tratado igual que la muestra.

Cuantificar azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada en este caso con dextrosa en concentraciones de 0.2 a 1 mg/ml.

### Determinación de azúcares totales.

Tomar 0.5 ml de muestra, adicionar 0.5 ml de Fenol al 5%; agitar y posteriormente agregar 2.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubar la reacción durante 10 minutos.



Leer a 490 nm frente a un blanco con agua. Posteriormente cuantificar los azúcares totales interpolando los valores de absorbancia en una curva patrón de dextrosa (0 – 0.1 mg/ml).

#### **VI.1.5 SECADO DE LA MALTA.**

Se llevó a cabo el secado de la malta, iniciando con una temperatura de 50° C durante 24 horas; evaluando el contenido de humedad durante diferentes intervalos de tiempo.

El contenido de humedad se determino por el método de secado en estufa descrito anteriormente.

#### **VI.1.6 ELABORACIÓN DE MOSTO.**

Se elaborará mosto partiendo de lo estipulado en la literatura (1.5 kg de malta seca para 10 L de mosto), haciendo los ajustes correspondientes para obtener la proporción recomendada. La malta seca se hizo pasar por un molino rompiendo el grano sin llegar a tener como producto una harina, después de este tratamiento al grano se realizaron las cinéticas de azúcares reductores contra el tiempo, sometiendo al mosto a diferentes temperaturas 55, 60, 65 y 70°C durante 9 horas, obteniendo así un perfil de la eficiencia de las amilasas durante la maceración. Después de efectuar la maceración se realizó la ebullición del mosto por 30 minutos, se agregó la mitad del lúpulo al inicio de la ebullición y la otra mitad 5 minutos antes de terminar el tiempo establecido, (se agregan 25 gramos de lúpulo para 19 litros, se tiene que hacer el ajuste dependiendo del volumen de mosto que se empleará para la fermentación)



### VI.1.7 ACTIVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*

Para activar la cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se utilizó mosto preparado en el laboratorio, ajustado primeramente a 4°Brix, y posteriormente otro ajustado a 6 °Brix. Se realizaron cinéticas de crecimiento en ambos casos, las condiciones de temperatura y agitación fueron de 37 °C y 200rpm; los parámetros a determinar fueron azúcares reductores, azúcares totales y densidad óptica a 600nm, esto para obtener los tiempos adecuados en donde las células de levadura se encontrarán en fase exponencial y así asegurar su buen crecimiento durante la fermentación. En el primer paso se hizo crecer la levadura en el mosto de 4 °Brix para luego inocularla (inóculo de 5%) en el mosto de 6 °Brix en el tiempo adecuado y así tener listo el inóculo de 6 °Brix que serviría para la fase de fermentación en 3 litros o en un volumen de 8 litros. Una segunda propuesta para la activación de *S. cerevisiae* es realizar este primer paso en el medio sintético YM.

### VI.1.8 FERMENTACIÓN

El volumen de mosto empleado para las pruebas de fermentación fue de 3 y 8 litros, ya que está lista la levadura, después de haber pasado por la activación a 4 y la propagación a 6 °Brix se realizó una fermentación con el mosto sin ajustar el contenido de sólidos y a temperatura ambiente para obtener parámetros como densidad óptica, azúcares reductores, azúcares totales y concentración de alcohol producido. El tiempo propuesto para el monitoreo de la fermentación fue de 70 horas tomando muestras cada 6 horas. Otra propuesta para la producción de 8L fue proporcionarle al sistema de fermentación, agitación y aireación durante un tiempo corto; 0.5vvm/100rpm/2horas.



### Determinación de la producción de etanol.

Para la determinación de etanol se empleó el kit de diagnóstico "Enzimatic BioAnalysis for Etanol/ Food Analysis, BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM.

El etanol es oxidado a acetaldehído por  $\text{NAD}^+$  en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). El equilibrio de la reacción está desplazado hacia los reactivos, por lo cual se requiere de una segunda reacción en donde el acetaldehído formado es oxidado a ácido acético en presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa (Al-DH) con la consecuente formación de NADH.

El NADH es determinado espectrofotométricamente a 340nm.

#### CONTENIDO DEL KIT.

- Botella **1** con aprox. 100 ml de solución buffer de difosfato de potasio, pH aproximado de 9.
- Botella **2** con 30 tabletas, cada una contiene:  $\text{NAD}^+$  = 4 mg; aldehído deshidrogenasa (Al-DH) = 0.8 U.
- Botella **3** con aprox. 1.6 ml de una suspensión de ADH = 7000 U.
- Solución control o estándar de etanol = 0.061 mg/ml que se usa sin diluir.

#### TRATAMIENTO DE MUESTRAS

- Centrifugar las muestras y separar el sobrenadante 12 000 rpm/ 15 min a 4 °C.
- Calentar el sobrenadante a 80 °C / 15 min para la inactivación de enzimas proteolíticas.
- La concentración de etanol de las muestras debe fluctuar entre 0.01 y 0.06 g/l; realizar diluciones si es necesario.

#### Preparación:

- Disolver una tableta **2** con 3 ml de la solución **1**; ésta es la mezcla de reacción II.



## PROCEDIMIENTO:

Reactivo	Blanco	Estándar	Muestra
Mezcla de reacción II	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Agua	50 $\mu$ l	-	-
Estándar de etanol	-	50 $\mu$ l	-
Muestra (0.01-0.06 g/l de etanol)	-	-	50 $\mu$ l
Mezclar y después de 3 min a temperatura ambiente, leer absorbancia A 1			
Adicionar suspensión 3	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
Mezclar y esperar 5-10 min a temperatura ambiente para que se complete la reacción y obtener A2.			

- Para determinar la absorbancia de las muestras y el estándar:  $\Delta A = A_2 - A_1$ .

Cálculos.

$$C = \frac{V \times MW}{\Delta \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \times F.D.$$

V = volumen final (ml)

v = volumen de muestra o estándar

MW = peso molecular NADH (g/ml)

d = paso de luz (cm)

$\Delta$  = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm = 6.3 (l mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

$$C (\text{g}_{\text{etanol}}/\text{l}_{\text{solución}}) = \frac{1.575 \times 46.07}{6.3 \times 1 \times 0.050 \times 2 \times 1000} \times \Delta A \times F.D.$$



## CAPITULO VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL GRANO DE CEBADA

Los resultados nos indican que la microbiota presente en el grano de cebada se ve disminuida de un 40-60%, al cabo de dos lavados consecutivos con solución salina isotónica (tabla 6). Dentro de los productos agrícolas, los más susceptibles a la contaminación por hongos productores de micotoxinas son los cereales (arroz, trigo, cebada y maíz). Durante su formación en la planta hasta su conversión en malta o bien hasta su consumo por animales, los granos de cebada se encuentran expuestos a la contaminación con una gran variedad de microorganismos, entre ellos, los hongos filamentosos. El grado de contaminación depende de las condiciones climáticas a nivel de campo y de las condiciones de almacenamiento y procesamiento post-cosecha; un estudio realizado en la Universidad Nacional Autónoma de Hidalgo sobre la microflora y el contenido de aflatoxinas presentes en el grano de cebada documenta que lograron aislar doce géneros de mohos presentes de las cuales cuatro especies son potenciales micotoxigénicas: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. (Israel O. Ocampo S.1, Judith Jaimez O. et. al, 2006)

Debido a lo anterior se realizó la valoración microbiológica del grano de cebada dándose una disminución considerable de la microbiota presente.





**Tabla 6.- Porcentaje de disminución de los microorganismos presentes en cebada Esperanza al cabo de dos lavados consecutivos con solución salina isotónica (proporción 40g/80ml), evaluados con diferentes medios de cultivo.**

MEDIOS DE CULTIVO	1er LAVADO UFC/ml	2do LAVADO UFC/ml	% DISMINUCIÓN
M. Estándar	590	230	61
Cta. en Placa	430	220	48.8
PDA	356	220	43.6

## VII.2 PRUEBAS DE REMOJO

VII.2. Se puede observar que en el segundo día de remojo el grano absorbe alrededor de 44% de agua (figura 5), esto en recipientes donde el área de contacto entre el grano de cebada y el agua es grande, resaltando también que el recambio de agua durante los días de remojo no implica una diferencia notable.

Por otro lado en las pruebas realizadas con vasos de precipitados a los tres días el grano de cebada logró absorber 48 % sin recambio de agua y 47% con recambio de agua, es importante mencionar que si existe una diferencia en cuanto a una mejor absorción de agua por parte del grano cuando se realizan las pruebas en contenedores donde la superficie de contacto es mayor. El porcentaje de humedad alcanzado corresponde con lo que describen diversos autores, cumpliendo el objetivo primordial de hidratar al grano en condiciones aerobias, de tal manera que se propicie la generación de giberelinas que desencadenen la posterior germinación del grano (Serna 2001).

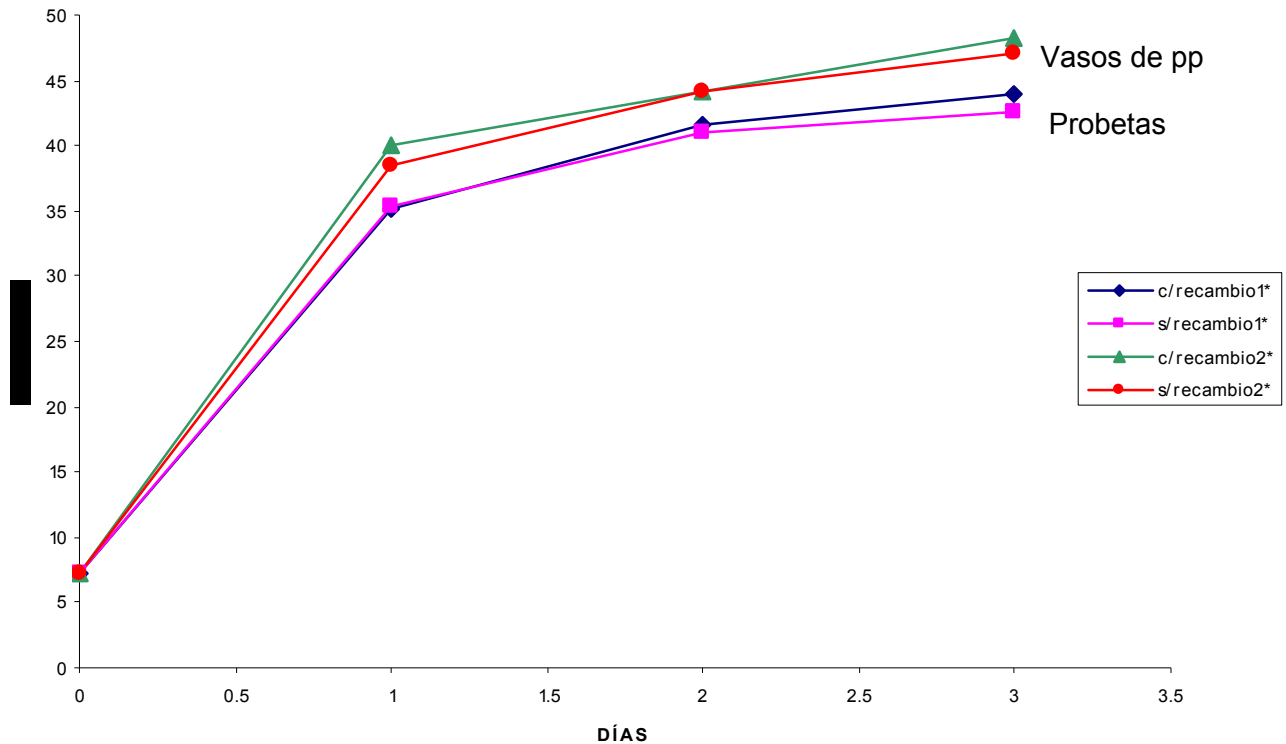


Figura 5.- Porcentaje de humedad absorbida por el grano de cebada al cabo de tres días de remojo, empleando probetas y vasos de precipitados como contenedores.

### VII.3 GERMINACIÓN DE CEBADA *ESPERANZA*

El potencial germinativo en la cebada *Esperanza* es alto, de acuerdo a la prueba realizada, esta variedad de cebada tiene un 93 % de viabilidad; esto cumple con lo estipulado en la norma mexicana para la cebada NMX-FF-043\_1982, (Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – cereal- cebada maltera- *Hordeum vulgare L.* y *Hordeum distichum L.*) que como mínimo aceptado es de 85% utilizando el método por peróxido de hidrógeno.



Esta norma mexicana establece las condiciones y características del grano de cebada maltera género *hordeum* especies *vulgare* L. y *distichum* L. para poder ser objeto de comercialización en el territorio nacional.

#### VII.4 PRUEBAS DE GERMINACIÓN

En la Figura 6 se puede observar la degradación de almidón en los cinco días destinados a la germinación cuya condición de temperatura fue de 20° y 25° C, cabe resaltar que entre el primero y el tercer día se da una actividad enzimática importante, es decir, el grano tiene en esos días un poder diastásico alto y la cantidad de almidón consumido es elevado en comparación con los siguientes días donde se nota un consumo casi constante.

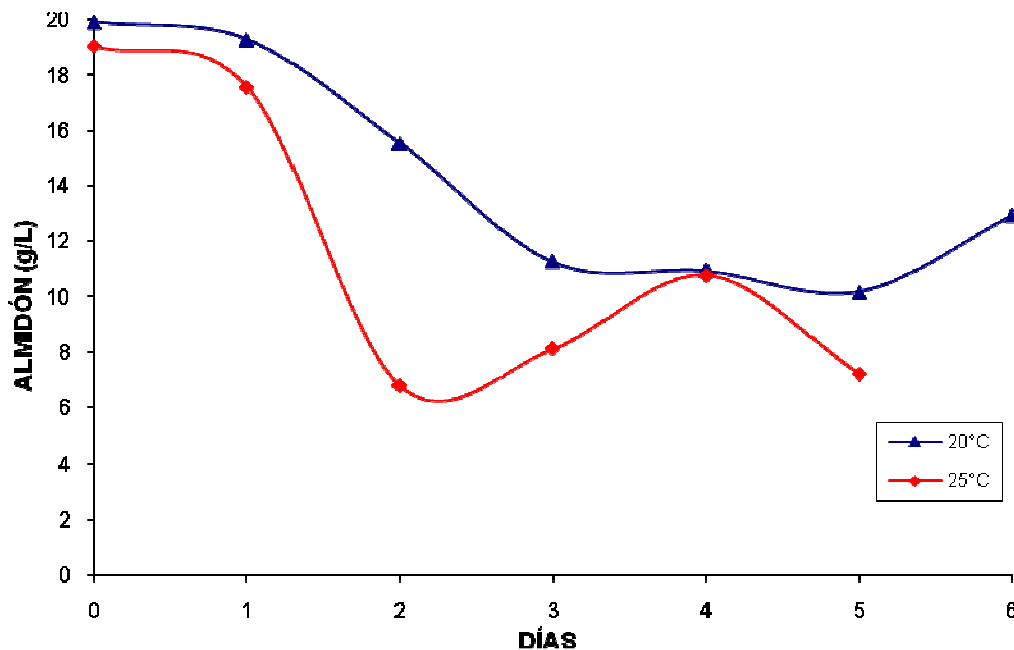


Figura 6.- Poder diastásico obtenido de malta a diferentes tiempos de germinación y temperaturas



Posteriormente se muestran en la figura 7 los resultados correspondientes a la determinación de proteínas, donde se puede señalar que a partir del primer día y hasta cinco días de germinación la cantidad de proteína se incrementa. Los resultados en ambas condiciones de temperatura coinciden con los del poder diastásico total (gráfica 6) donde también se observa que entre el primero y el tercer día se da un incremento importante en actividad enzimática. Ahora bien cuando se correlaciona el poder diastásico con la proteína determinada y el tiempo de reacción, se obtiene una relación específica como se muestra en la grafica siguiente.

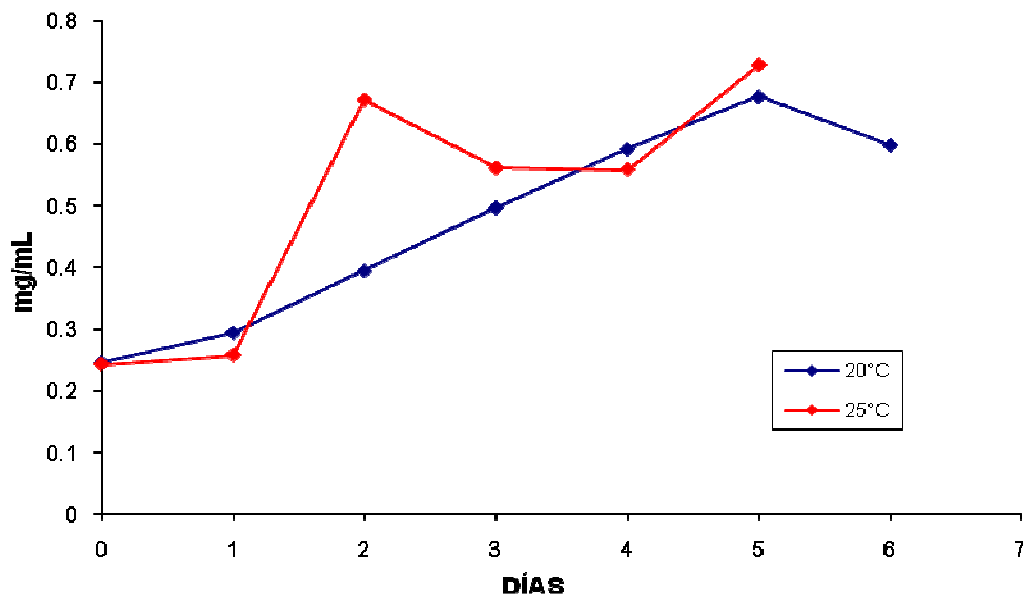


Figura 7.- Comportamiento de la proteína extracelular obtenida de malta a diferentes tiempos de germinación y temperatura.

Lo que se puede observar en la figura 8 es una tendencia descendente donde a partir del primer día de germinación empieza a manifestarse un poder diastásico considerable que, al cabo del segundo día es notablemente mayor. Se observa a



25 °C un máximo de actividad enzimática entre el día tres y cuatro de germinación, lo que concuerda con la concentración alta de azúcares reductores teniendo un máximo en el día tres (gráfica 9) a esa misma temperatura. A 20°C la máxima actividad enzimática se observa hacia el quinto día. Algunos autores manejan que la germinación se lleva a cabo de cuatro a seis días, dependiendo principalmente de la temperatura del medio y del equipo utilizado (Serna 2001). En este ensayo en comparación con la literatura se muestra que al tercer día podemos parar la germinación y proseguir con el siguiente paso del proceso, que es el secado de la malta.

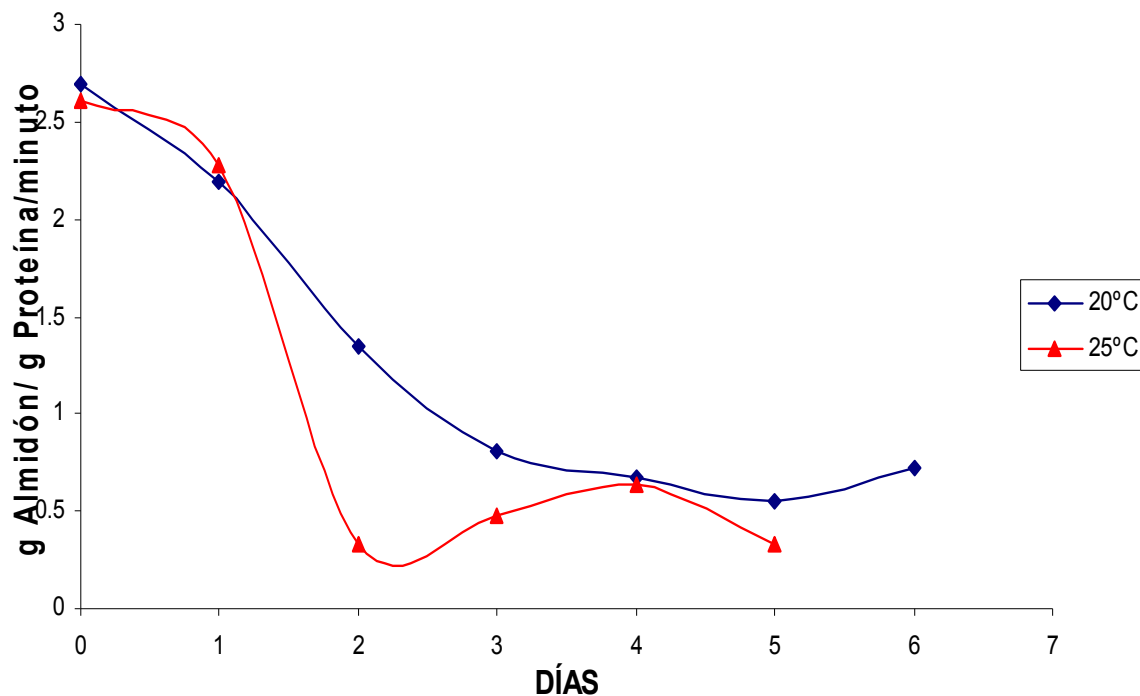


Figura 8.- Poder diastásico específico obtenido del grano de cebada al cabo de cinco días de germinación, empleando diferentes condiciones de temperatura.

En la figura 9 se confirma lo descrito anteriormente, ya que al tercer día se podría detener el proceso germinación debido a la actividad enzimática que presenta el



grano en ese tiempo, no permitiendo que el embrión consuma todos los azúcares reductores generados. La concentración de azúcares reductores producidos por la hidrólisis del almidón, indirectamente muestra la acción de las enzimas sobre el almidón y concuerda con la temperatura propuesta (20°C) y el tiempo (3 días). Se propone la temperatura de 20° C porque el gasto energético es menor y se pudo controlar mejor el sistema a esa temperatura y porque algunos autores recomiendan temperaturas de germinación en un rango de 16 a 20°C (Bamforth 1998).

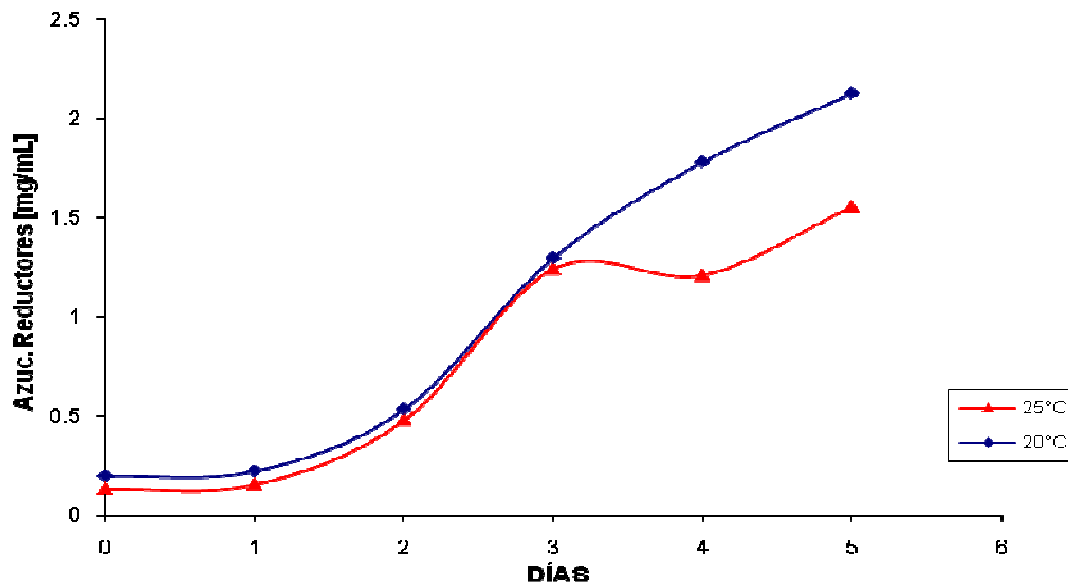


Figura 9.- Concentración de azúcares reductores obtenidos del grano de cebada al cabo de cinco días de germinación, con diferentes condiciones de temperatura.

En la fotografía siguiente(figura 10) se observa la acción de las enzimas durante la germinación a 20°C, los análisis anteriores nos dan parámetros para designar al tercer día de germinación como ideal en cuestión de actividad enzimática, para poder seguir con el proceso siguiente. Los resultados muestran que los análisis

tales como actividad enzimática específica, actividad enzimática total, proteína y azúcares reductores; nos llevan a desechar en este caso la forma empírica que utilizan los productores de malta para designar en que tiempo se debe terminar la germinación, esa forma empírica se trata de oprimir al grano de cebada con los dedos y que este se quiebre con facilidad exponiendo el endospermo y el embrión, otra forma es cuando la plúmula alcanza un tamaño equivalente a los tres cuartos del tamaño del grano de cebada.

### GERMINACIÓN DE CEBADA *Esperanza* A 20°C.



Figura 10.- Imágenes que muestran los brotes de la radícula y la plúmula, obtenidos que reflejan el poder diastásico en cebada al cabo de cinco días de germinación a 20 °C temperaturas.

En la figura 11 se muestra que en el cuarto y quinto día, la plúmula y la radícula tienen un tamaño mayor al grano de cebada confirmando así los resultados anteriores, a causa de la actividad enzimática se llegó a hidrolizar la mayor parte



del almidón, en el quinto día se comienza a ver un descenso en la concentración de los azúcares reductores (figura 9) lo que indica que el embrión consumió una mayor cantidad de los azúcares reductores generados, siendo la malta no útil para la posterior producción de cerveza.

#### GERMINACIÓN DE CEBADA *Esperanza* A 25°C.



Figura 11.- Imágenes que muestran los brotes de la radícula y la plúmula obtenidos, que reflejan el poder diastásico en cebada al cabo de cinco días de germinación a 25 °C temperaturas.

#### VII.5 SECADO DE MALTA

La cinética de secado muestra (figura 12) que se alcanzó un porcentaje de humedad de 1.5% durante 24 horas a 50° C; lo que concuerda con lo descrito por algunos autores, esto es útil ya que muchas veces la cebada no se utiliza en el momento y se puede almacenar bajo ciertas condiciones sin correr riesgo de contaminación. El principal objetivo es detener la germinación para asegurar un grano estable con actividad enzimática potencial una vez que se rehidrate (Serna 2001).



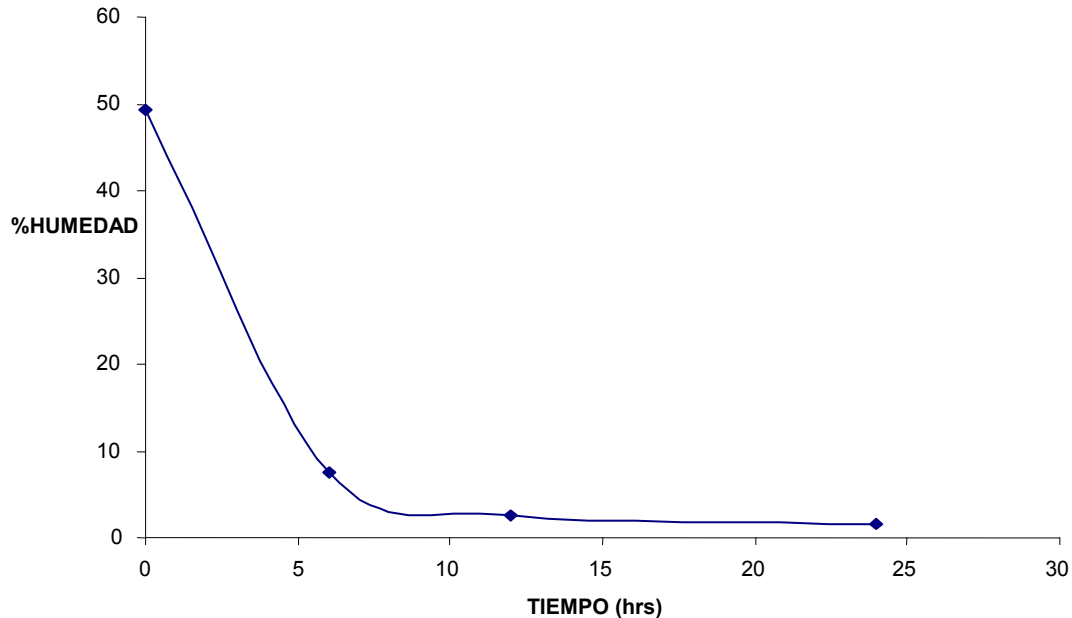


Figura 12.- Cinética de secado, se determinó el porcentaje de humedad en diversos intervalos de tiempo durante 25 horas.

## VII.6 PROCESO DE MACERACIÓN

Los resultados obtenidos en las prueba de maceración (figura 13) a diferentes tiempos y temperaturas (55, 60, 65,70 °C), muestran un aumento en la concentración de azúcares reductores, dando un máximo de concentración entre 60°C y 65°C al llegar a las 5 horas; por lo cual se puede decir que la actividad enzimática de las amilasas tienen un desempeño ideal en ese intervalo de temperaturas y tiempo.

La  $\beta$  amilasa genera una mayor cantidad de dextrinas mientras la  $\alpha$  amilasa se encarga de completar la degradación del almidón hasta azúcares reductores, las temperaturas bajo las cuales estas enzimas se desempeñan eficazmente son entre 62 y 75°C, (Bamforth, 1998).

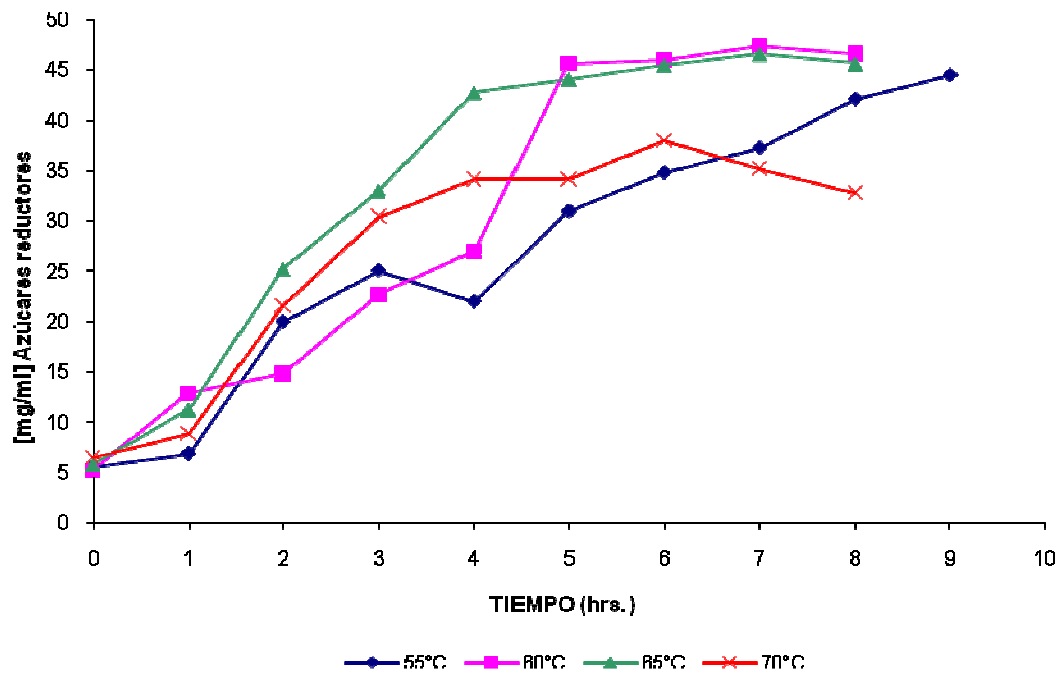


Figura 13.- Perfil de la maceración del mosto a diferentes temperaturas.

## VII.7 ACTIVACIÓN Y PROPAGACIÓN DE *Saccharomyces Cerevisiae*

En las figura 14 y 15 se muestra el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en dos mostos con diferente concentración en grados Brix. Se inició la activación de la cepa registrando su cinética de crecimiento en el mosto de 4°Brix en donde se observa una fase lag de doce horas, al llegar a las 24 horas la levadura se encuentra en la fase logarítmica y este preinoculo se trasladó al siguiente mosto de 6 °Bx, quedando listo a las 20 horas para comenzar la posterior fermentación. Las condiciones que se utilizaron para la activación y propagación de *S. cerevisiae* fueron: temperatura de 30°C, 200 rpm y un inóculo de 5%.

Es recomendable realizar los dos pasos anteriores de propagación para asegurar una alta concentración de células de *S. cerevisiae*, y así lograr una buena



fermentación, donde la levadura pueda asimilar todos los nutrientes presentes en el mosto y producir los atributos sensoriales característicos de la cerveza (aromas, sabores, CO<sub>2</sub>, alcohol entre otros).

*S. cerevisiae* asimila la glucosa y normalmente también la sacarosa, maltosa y galactosa, no así la lactosa y no pueden utilizar como fuente de nitrógeno el nitrato (García Garibay, 2002).

Una segunda propuesta para realizar la activación de *S. cerevisiae* y la producción en mosto es la siguiente: activar la levadura en un medio sintético como el YM, ya que la composición de este medio es principalmente extracto de malta y extracto de levadura teniendo azúcares libres que facilitan el consumo de estos por la levadura y por lo tanto garantizar una alta concentración de células viables.

Con lo que respecta a la producción en 8L, las condiciones de agitación y aireación fueron las siguientes: 0.5vvm/100rpm/2horas, ayudando así a la multiplicación celular y a la rápida adaptación en el mosto.

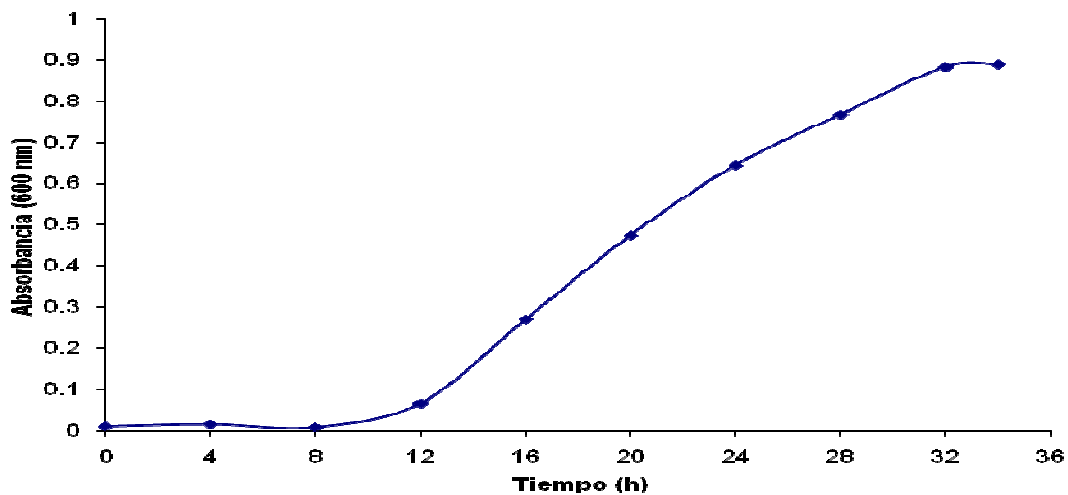


Figura 14.- Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en mostos ajustados a 4°Bx.

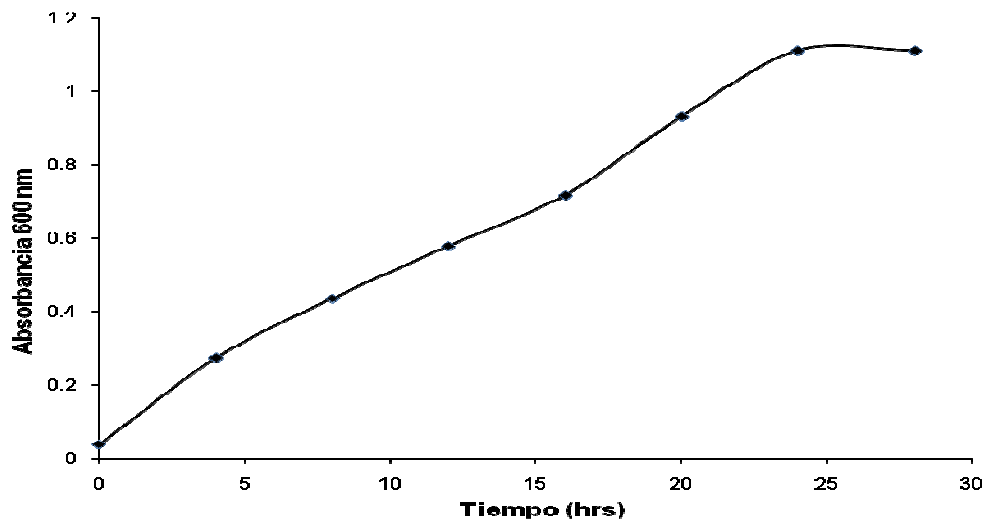


Figura 15.- Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en mostos ajustados a 6°Bx.

La figura 16 muestra el consumo de azúcares reductores en los dos casos (mosto a 4 y 6 °Brix) y se observa que al inocular (5% de inóculo) con mosto de 4 °Brix (sabiendo que tiene una concentración alta de *S. cerevisiae*), al siguiente lote que está ajustado a 6 °Brix, la levadura logró un consumo de azúcares en menor tiempo. Por lo cual podemos decir que a las 28 horas prácticamente los azúcares reductores generados durante la maceración han sido consumidos hasta un mínimo de concentración (0.9402 mg/ml). Comparado con el mosto ajustado a 4 °Brix en mayor tiempo (34 horas) apenas presenta un mínimo de concentración (5.3444 mg/ml).

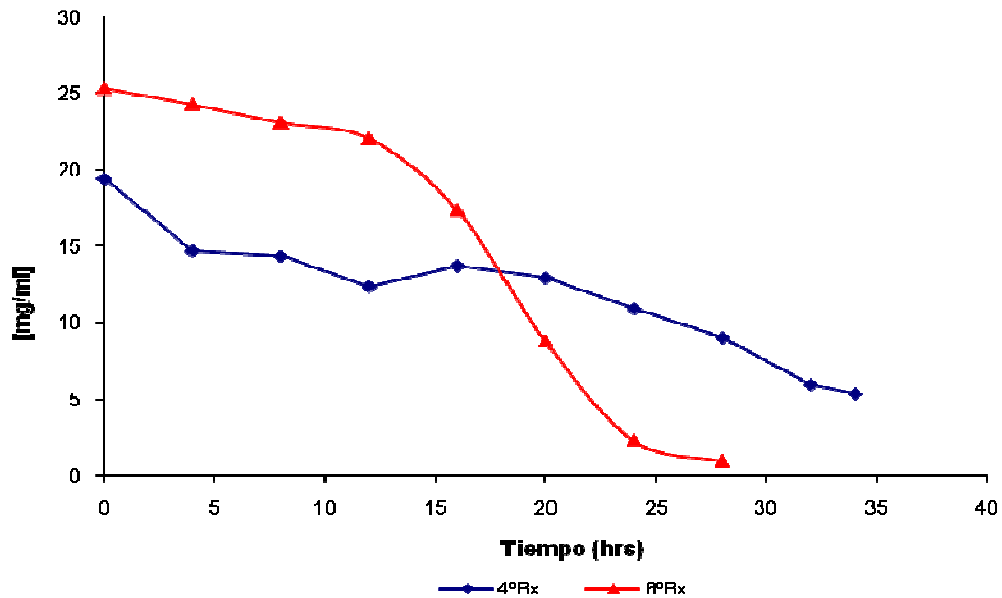


Figura 16.- Cinética de azúcares reductores en mostos cerveceros ajustados a 4 y 6° Bx

Por otro lado el perfil de los azúcares totales (figura 17) fue similar al de los azúcares reductores, mostrando que en el mosto de 6 °Brix al cabo de 28 horas se tiene un mínimo de concentración (10.97 mg/ml), comparado con el de 4 °Brix teniendo en 34 horas 19.11 mg/ml. Confirmando así el crecimiento óptimo de la levadura al consumir los nutrientes presentes en el mosto principalmente azúcares reductores tales como glucosa y maltosa entre otros, ya que estos azúcares están más disponibles para el microorganismo y por lo tanto es uno de los factores que favorece la multiplicación celular.

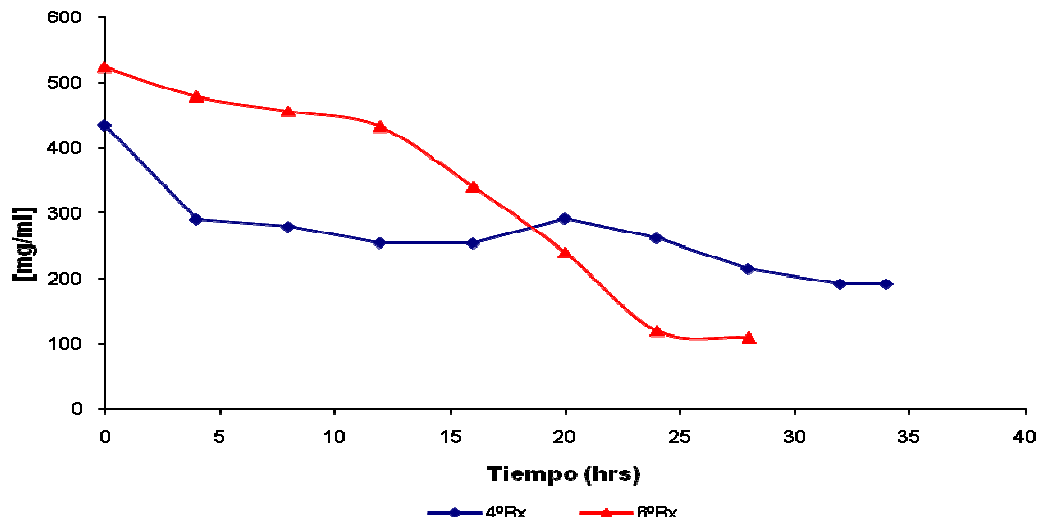


Figura 17.- Cinética de azúcares totales en mostos cerveceros ajustados a 4 y 6° Bx

## VII.8 PRODUCCIÓN DE CERVEZA A UN VOLUMEN DE 3 LITROS (condición 1)

Después de la activación y propagación de *S. cerevisiae* y tener el mosto hervido ya con la adición del lúpulo, se prosiguió con la fermentación a temperatura ambiente (laboratorio aprox. 20 °C) en un volumen de 3 litros monitoreando varios parámetros tales como el crecimiento microbiano, azúcares reductores, totales y la concentración de etanol generado durante el tiempo de que duró la fermentación. Se observa en la figura 18 que el crecimiento de *S. cerevisiae* es largo en su inicio teniendo una fase de adaptación de aproximadamente 50 horas, con una fase logarítmica que llega hasta 72 horas después de la cual se da una disminución en la densidad óptica, muy probablemente debido a la muerte celular propiciada principalmente por la falta de nutrientes al final de la fermentación, o muy probablemente por una pronta floculación de las levaduras. En esta etapa las levaduras floculan debido a un cambio en la pared celular provocando la aglomeración compacta de las células mediante la formación de puentes de calcio



o de magnesio, las cuales no se asocian a las burbujas del  $\text{CO}_2$  y se hunden (García Garibay, 2002).

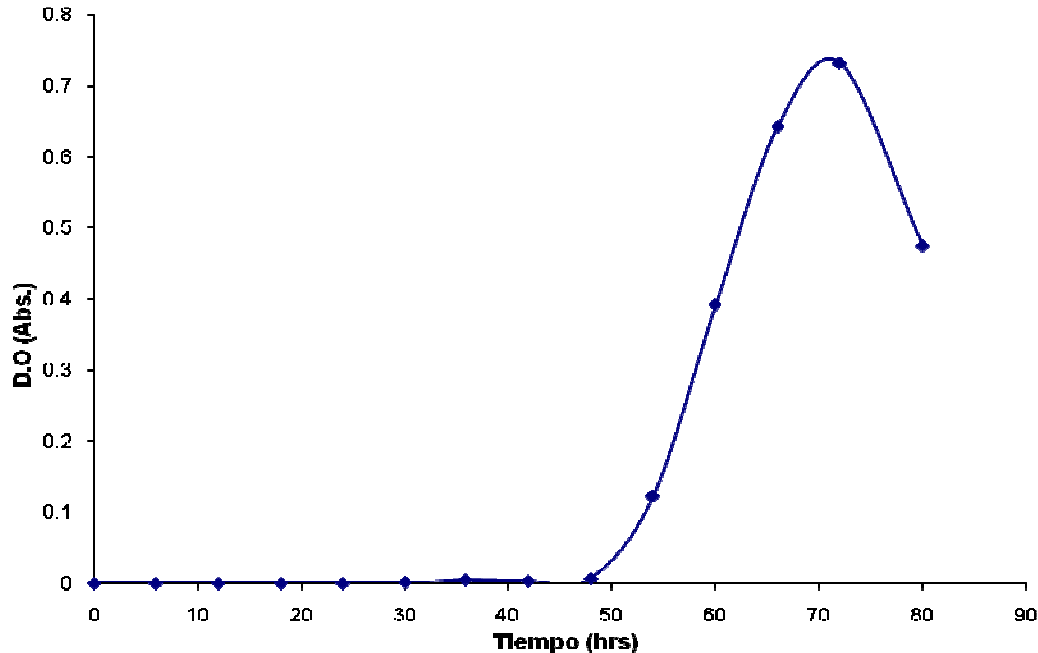


Figura 18.- Fermentación del mosto, cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

En la figura 19 se puede observar el consumo de azúcares reductores y totales por la levadura durante la fermentación, los perfiles muestran una disminución del sustrato conforme va transcurriendo el tiempo. Se registra al inicio una menor concentración de azúcares reductores comparada con los azúcares totales, teniendo hasta las 54 horas aproximadamente un comportamiento de consumo constante para después tener una asimilación de los azúcares en concentración, generando  $\text{CO}_2$ , alcoholes, aromas, sabores y el llamado cuerpo de la cerveza debido a la generación de dextrinas entre otros atributos (Santillán Valverde, García Garibay, junio 2000).

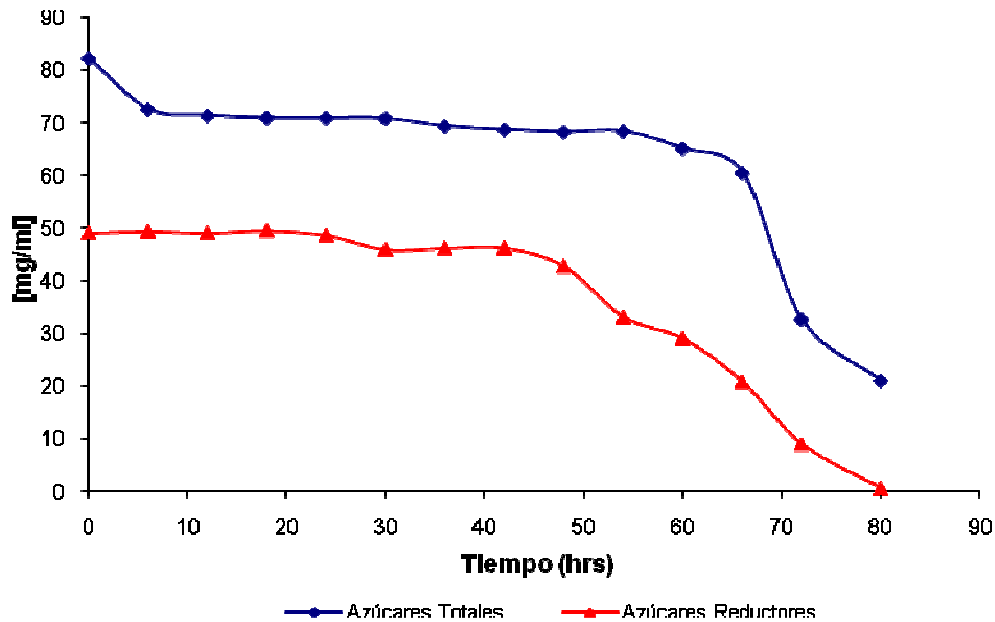


Figura 19.- Cinética de azúcares reductores y totales durante la fermentación, 3L

Algunas características importantes en las cepas de levaduras son: capacidad de flocular, capacidad de producir etanol, tolerancia al alcohol, tolerancia a la osmolaridad del medio, tolerancia a altas temperaturas, capacidad y vigor en la fermentación de azúcares y capacidad para producir congenéricos.

La producción de alcohol es un fenómeno complejo cuyo rendimiento depende de diversos factores tales como: características intrínsecas de la cepa, la concentración del inóculo, la composición del medio, las condiciones de la fermentación, etc. (García Garibay, 2002). Durante la fermentación realizada se pudo obtener un porcentaje de etanol correspondiente al 2.71 %v/v (ver figura 20), esto al cabo de 80 horas que duró la fermentación. Comparado con algunas cervezas comerciales que generalmente contienen un 4.5 % v/v de etanol, el producto obtenido contiene un porcentaje menor, pero a diferencia de las cervezas





comerciales a ésta no se le agregaron adjuntos por lo que solo se utilizaron los azúcares presentes en el grano de cebada.

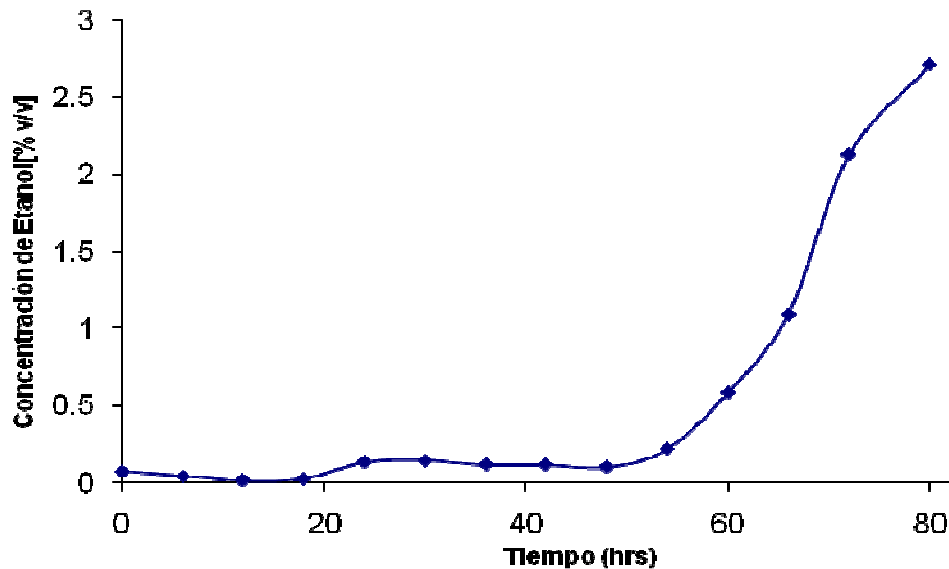


Figura 20.- Concentración de etanol generado durante la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*

### VII.9 PRODUCCIÓN DE CERVEZA A UN VOLUMEN DE 8 LITROS (condición 1)

Después de realizar una fermentación a un volumen de 3 litros, se prosiguió con un escalamiento de producción a un volumen mayor (8 L), realizando una activación y propagación de la levadura como ya se había propuesto (activación 4 °Bx y propagación 6 °Bx). Como se puede observar en la figura 21 el crecimiento de *S. cerevisiae* se da en un tiempo más corto comparado con la primera producción, teniendo una fase lag más corta al igual que la fase exponencial llegando a un máximo de crecimiento en la fermentación alrededor de las 42 horas. Los tiempos se acortaron considerablemente comparados con los



observados en la producción de 3L en donde la fermentación alcanzó un tiempo máximo de 72 horas y una fase de adaptación aproximadamente de 48 horas.

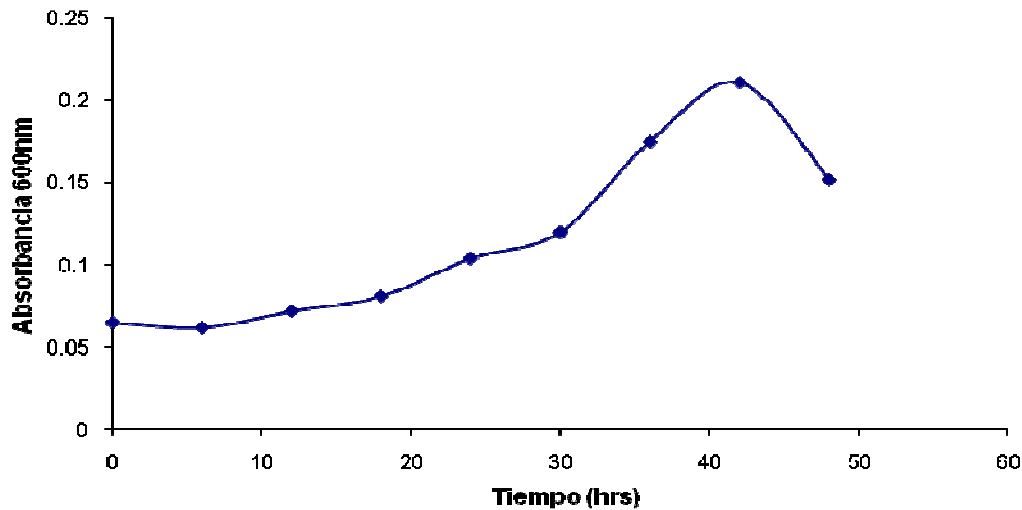


Figura 21.- Fermentación del mosto, cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se puede observar en el perfil de azúcares reductores y totales mostrado en la figura 22 que el consumo de nutrientes que va asimilando la levadura es constante durante el tiempo en que transcurre la fermentación (aunque se observa una mayor cantidad de azúcares reductores y totales en la producción de 3L). En la figura 21 se muestra que la fermentación tiene un máximo en densidad óptica a las 42 horas aproximadamente pero ésta disminuye a causa de la floculación y a la disminución de nutrientes en el medio. Pero siguiendo el análisis de azúcares hasta las 68 horas se puede observar que *S. cerevisiae* sigue desdoblado los azúcares complejos que tiene el mosto y los asimila, no para su multiplicación



pero si muy posiblemente para obtener dextrinas, aromas,  $\text{CO}_2$ , alcohol u otros compuestos como aldehídos.

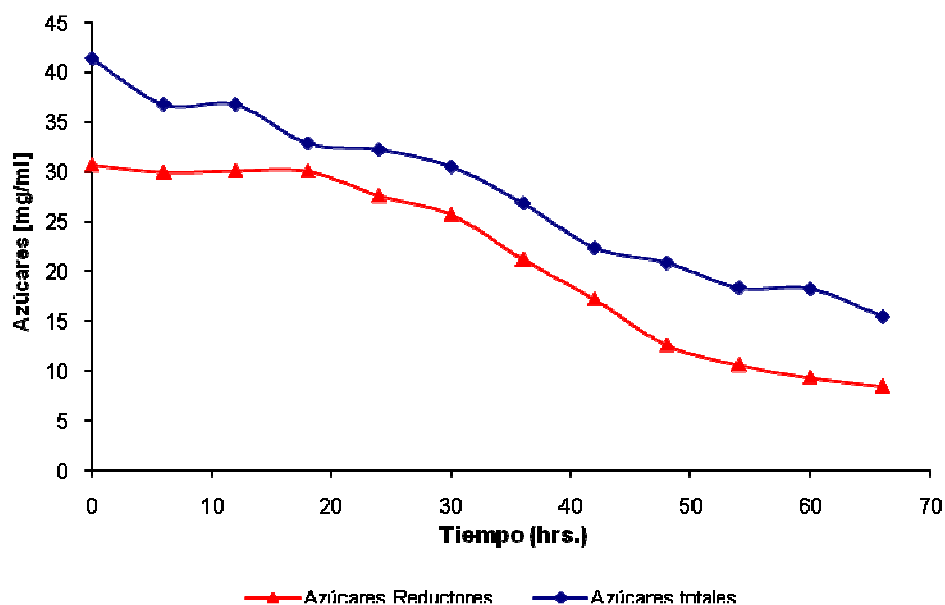


Figura 22.- Cinética de azúcares reductores y totales durante la fermentación 8L (condición 1)

La figura 23 muestra que al cabo de 50 horas de la fermentación aproximadamente se alcanza una concentración de etanol máxima de 1.12 % v/v, se puede notar que el nivel de producción fue menor al obtenido en 3L, muy probablemente debido a que la concentración de azúcares y la densidad óptica fueron mayores en 3L, posteriormente la concentración de alcohol empieza a disminuir, esto permite suponer que la levadura utiliza el etanol y lo transforma posiblemente mediante una ruta metabólica distinta en acetaldehído y ácido acético principalmente siempre y cuando estén presentes las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa.



La concentración de etanol en la producción de 8L es menor comparada con la de 3L, esto debido a una menor concentración de azúcares disponibles en el mosto, partiendo de aproximadamente 80 mg/ml de azúcares totales en la primera (3L) y de aproximadamente 40 mg/ml de azúcares totales en la segunda (8L).

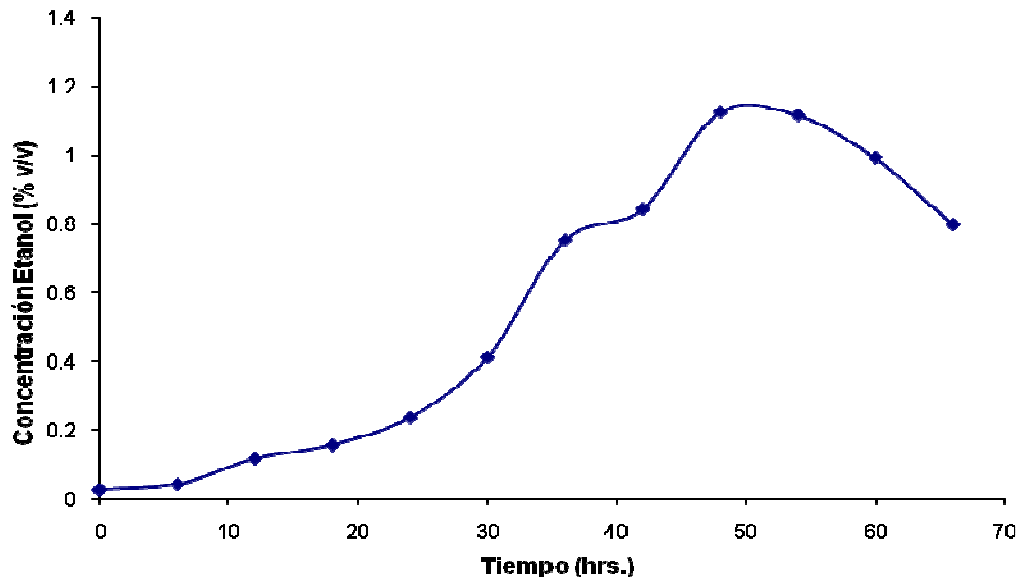


Figura 23.- Concentración de etanol generado durante la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*

## VII. 10 PRODUCCIÓN DE CERVEZA A UN VOLUMEN DE 8 LITROS (condición 2)

En una siguiente fermentación cuyo volumen también fue de 8 L, se modificaron algunos parámetros tales como la activación de la levadura en un medio sintético (YM) y la producción se realizó con 0.5 vvm de aireación y 100 rpm de agitación durante 2 horas. El implemento de estos cambios provocó que el tiempo de la fermentación fuera mucho menor comparada con las dos fermentaciones anteriores. En la figura 24 se observa que existe una fase lag de alrededor de 15 horas y una fase logarítmica rápida con un máximo en densidad óptica de 0.355 nm al cabo de 30 horas, comparado con la primera fermentación de 8L teniendo



un máximo de densidad óptica de 0.211 nm en 42 horas. Al utilizar un medio sintético se pudo mejorar el tiempo para la activación con buena proporción de células viables, antes de inocular al mosto de 6 °Bx. Las condiciones de aireación y agitación propuestas favorecieron una fase lag de poco tiempo adaptándose rápidamente la levadura al mosto y además permitiendo la multiplicación celular para una buena fermentación.

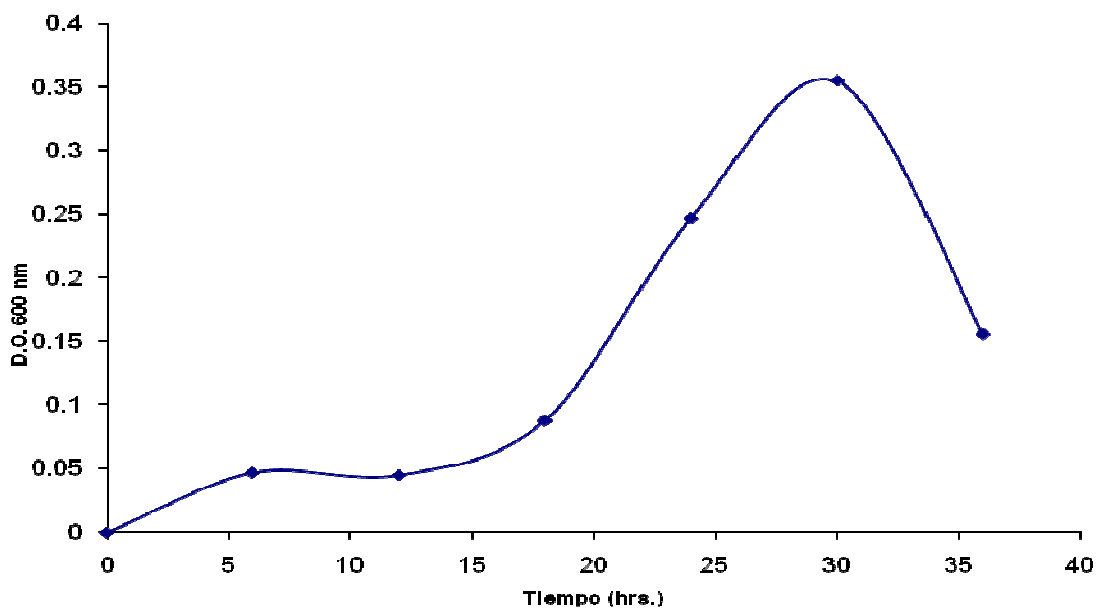


Figura 24.- Fermentación del mosto, cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, (condición 2)

El perfil de los azúcares reductores y totales en la figura 25 es similar a la fermentación anterior de 8L, en este caso alrededor de las 30 horas los azúcares totales como los reductores llegan a un mínimo en concentración (17.81mg/ml y 6.18mg/ml respectivamente) y a partir de ese tiempo y siguiendo el análisis durante más horas se puede observar que se mantienen prácticamente constantes hasta las 48 horas que fue el tiempo en que se monitoreó la producción.

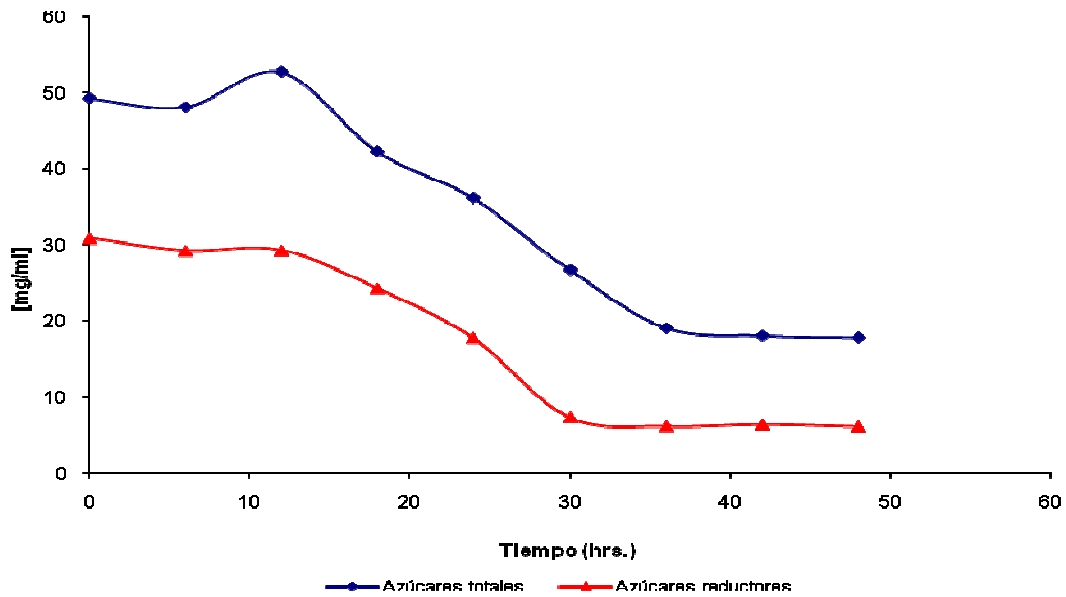


Figura 25.- Azúcares reductores y totales durante la fermentación 8L (condición 2)

Con lo que respecta a la concentración de etanol en este caso (ver figura 26) se alcanzó una concentración máxima de 1.98 % v/v hasta las 48 horas, pero al igual que en las anteriores fermentaciones esta concentración de alcohol depende principalmente de la cantidad de azúcares disponibles en el mosto y de que tan eficiente sea la levadura para asimilar los nutrientes y así producir alcohol, CO<sub>2</sub>, y muchos otros compuestos.

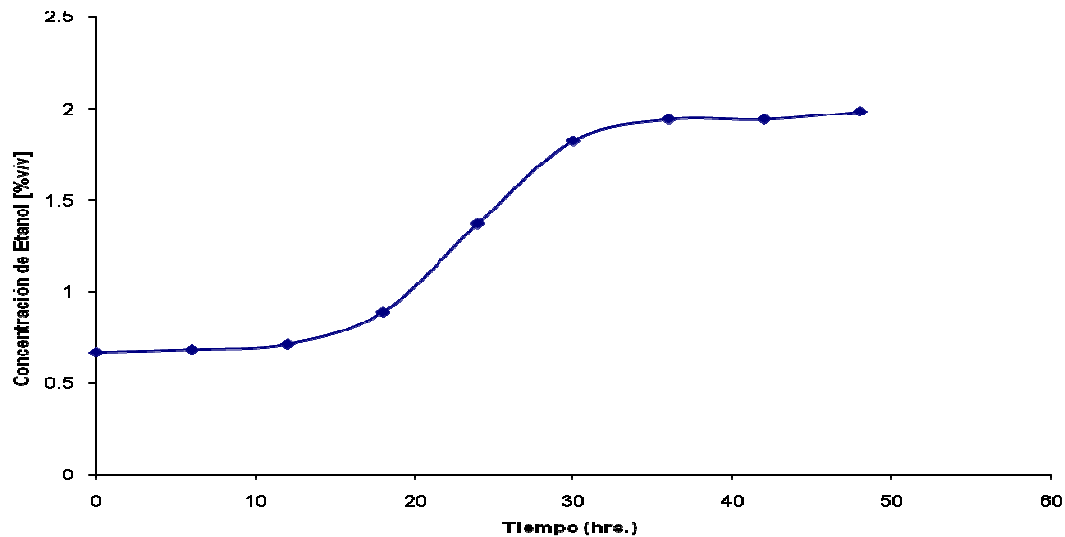


Figura 26.- Etanol generado durante la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae* (condición2)

Al realizar un cociente entre los  $\Delta$  de producto (concentración de etanol) y los  $\Delta$  de sustrato (concentración de azúcares totales), obtenemos un rendimiento para cada condición y volúmenes de fermentación. En la tabla 7 están expresados los rendimientos de cada producción, y el porcentaje de etanol producido, donde se observa que el rendimiento es prácticamente constante y la levadura tiene la misma funcionalidad en cualquiera de las condiciones descritas anteriormente; pero aunque los rendimientos sean constantes si se puede precisar que el tiempo de fermentación disminuye considerablemente utilizando la condición 2.

Tabla 7.- Rendimiento en la producción de etanol,  $Y = P/S$

PRODUCCIÓN	RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL	% v/v DE ETANOL PRODUCIDO
Vol. 3L (condición 1)	0.34	2.71
Vol. 8L (condición 1)	0.33	1.12
Vol. 8L (condición 2)	0.33	1.98



## CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

- La microbiota contaminante en el grano de cebada disminuyó al realizar dos lavados consecutivos con solución salina isotónica.
- Para la cebada Esperanza, el tiempo adecuado de remojo (42-46% Humedad) se alcanza a los dos días, a una temperatura de 20° C
- A una temperatura de 20°C el poder diastásico máximo se observa hacia el quinto día de germinación.
- El poder diastásico máximo a 25° C se obtiene en el tercer día de germinación.
- La máxima concentración de azúcares reductores a 20° C se obtiene en el día cinco de germinación.
- La máxima concentración de azúcares reductores a 25° C se obtiene en el tercer día de germinación.
- La cebada malteada llega a 1.5% de humedad secándola durante 24 horas a 50°C.
- Las condiciones de maceración obtenidas son: Tiempo de 5 horas en un intervalo de temperaturas de 60 – 65 °C.
- El tiempo ideal de crecimiento para *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto de 4 °Brix es a las 24 horas.
- El tiempo ideal de crecimiento para *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto de 6 °Brix es a las 18 horas.
- En la fermentación con 3 litros de mosto, se determinó que el crecimiento ideal de la levadura fue a las 72 horas a 20°C.





- La concentración máxima de alcohol obtenido en la fermentación de 3 litros fue de 2.71 % v/v a las 80 horas.
- En la primera producción (condición 1), el tiempo de fermentación es de aproximadamente 70 horas, con un máximo de crecimiento microbiano a las 40 horas.
- La concentración de etanol obtenida en la condición 1 (8L) fue de 1.12% v/v aproximadamente.
- En la segunda producción a un volumen de 8L (condición 2), el tiempo de fermentación fue de 38 horas, con un máximo de crecimiento microbiano a las 30 horas.
- La concentración de etanol en la condición 2 fue de 1.98% v/v aproximadamente.
- El tiempo de fermentación en 8L (condición2) se redujo con las condiciones de agitación y aireación propuestas.
- El rendimiento en la producción de etanol se mantuvo prácticamente constante en las tres fermentaciones.
- La levadura empleada tuvo la misma funcionalidad prácticamente en las tres producciones a diferentes volúmenes.



## CAPITULO IX. BIBLIOGRAFÍA:

- AACC (2001). “**Approved Methods of American Association of Cereal Chemists**”, 10<sup>th</sup> Edition.
- American Society of Brewing Chemists, “**Methods of Analysis**”, Chicago Illinois, Third Edition.
- Arnold, J.P. “**Origin and History of Beer and Brewing, Wahl-Henius Institute of Fermentology**”, Chicago, Illinois, 1911
- Bamforth, C., “**BEER Tap into the art and science of brewing**”. Insight Books. New York. pág. 74-94, 1998.
- Canadian Grain Comition, “**Malting Barley, Grain from Canadian**”, pp. 22-23,2001
- Clerk, J.A. “**Text Book of Brewing**”, Chapman and Hall, Volumen 1, England, 1957.
- Collins C.H., Lyne M. P., “**Microbiological Methods**”, Fifth Edition; Butterworths England, 1984.
- Díaz, R.G.2003; “**Fermentación del Almidón por Bacterias Lácticas Amilolíticas Aisladas del Pozol**”. Tesis Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química-UNAM. Pág. 118,119.
- Dubois, M. *et al.* 1956. “**Colorimetric method for determination of sugars and related substances**”. Anal. Chem. 28, 350-356
- García Garibay M. *et al.* 2002. “**Biotecnología Alimentaria**”.
- Hop Union. “**Hop Variety Characteristics**”, Hop Union U.S.A., Yakima, Washington, U.S.A. pp. 7-15, 1999.



- Hornsey Ian. **“Elaboración de cerveza (microbiología, bioquímica y tecnología)”**. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España (1991).
- Hough, J. S., **“Biotecnología de la cerveza y de la malta”**. Acribia, S. A. Zaragoza España. pág. 9-47, 1990.
- KIRK R.S., Sawyer, R. y Egan, H. **“Composición y Análisis de Alimentos de Pearson”**. Segunda edición. Editorial CECSA. México 1996. Páginas: 11 – 12.
- Lowry, O.H. et al. 1951. **“Protein measurement with the folin phenol reagent.”** J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Miller, G. L. 1959. **“Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”**. Anal. Chem. 31, 426-428
- MNX-FF-043-SCFI-2003, **“Producto Alimenticio no Industrializado para Consumo Humano – Cereal- Cebada Maltera (*Hordeum vulgare L. Y Hordeum distichum L.*)”**
- Muralikrishna, M. Nirmala 2005. **“Cereal  $\alpha$ -amylases-an overview”**, 60, 163-173.
- Padilla, L. **“Apuntes Sobre Cervecería”**, México, D.F. 2000.
- PANREAC QUÍMICA. **“Métodos oficiales de análisis, Cereales, derivados de cereales y cerveza”** [en línea, disponible en Internet
- Pollock J.R.A, **Food Science and Technology a Series of monographs “Brewing Science”**. Academic Press Inc. Great Britain, volume 1 1979.
- Ponte G. Joseph, Kulp K. **“Handbook of Cereal Science an Technology, Barley”**. Marcel Dekker Inc. Second Edition, New york, 2000.



- R. M Ramírez Gama, B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, et. al, **“Manual de Prácticas de Microbiología General”**, Facultad de Química UNAM 2000.
- Ruíz, S. Y., **“Elaboración y evaluación de maltas cerveceras de diferentes variedades de cebada (*Hordeum sativum jess*) producidas en los estado de Hidalgo y Tlaxcala”**. Tesis licenciatura, UAE, México 2006.
- Santillán Valverde, García Garibay., **“Producción de Congenéricos en la Fermentación de Cerveza”**, BEBIDAS MEXICANAS, junio 2000.
- Velázquez Madrazo O. *et al.*, **“Productos de Cereales y Leguminosas, Manual de Prácticas”**, Facultad de Química UNAM 2004.

#### Fuentes en línea

- [www.bifi.unizar.es/.../almidon/amilopectina2](http://www.bifi.unizar.es/.../almidon/amilopectina2)
- [www.javeriana.edu.co/.../celular/amilosa](http://www.javeriana.edu.co/.../celular/amilosa)
- [www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/7522/maltade.htm](http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/7522/maltade.htm)
- [www.panreac.com/new/esp/publicaciones/docs/cerveza.zip](http://www.panreac.com/new/esp/publicaciones/docs/cerveza.zip)
- [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
- <http://cerveceroscaserosmx.blogspot.com/2009/03/microcervecerias-en-mexico.html>
- <http://www.cervezacasera.com.mx>, 2009).