

**ESTUDIO DE LA FRACCION ALCOHOL - ESTER EN CERVEZAS CLARAS
Y OSCURAS POR CROMATOGRAFIA EN GASES**

TESIS

que presenta para su examen profesional de

QUIMICO FARMACEUTICO-BIOLOGO

GLORIA ONDINA VIJIL GONZALEZ

ante la

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Incorporada a la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

México, D. F.

1 9 6 8



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.

RECONOCIMIENTO

Deseo expresar mi reconocimiento al Personal Técnico del Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas, A. C., y especialmente al Laboratorio Central Analítico, por la asistencia y facilidades que me fueron brindadas para la realización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
I. - ANTECEDENTES	
A) Formación de alcoholes superiores.	5
B) Formación de ésteres.	6
C) Variaciones de la fracción alcohol-éster en el período de fermentación.	6
D) Influencia de la fracción alcohol-éster en las propiedades organolépticas de la cerveza.	7
E) Cromatografía de gases.	7
II. - DESARROLLO EXPERIMENTAL	
A) Diagrama del plan de investigación.	9
B) Trabajo experimental.	
1.- Obtención de la fracción alcohol-éster.	11
2.- Análisis por cromatografía de gases.	12
III. - RESULTADOS Y DISCUSION	15
IV. - CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFIA	19

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág.
Tabla 1. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra I.	21
Tabla 2. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra II.	23
Tabla 3. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra III.	25
Tabla 4. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra IV.	27
Tabla 5. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra V.	29
Tabla 6. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra VI.	31
Tabla 7. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra VII.	33
Tabla 8. - Retenciones, áreas relativas, identificación y cuantificación de los picos del cromatograma correspondiente a la muestra VIII.	35
Figura 1. - Cromatograma de la muestra I.	37
Figura 2. - Cromatograma de la muestra II.	39
Figura 3. - Cromatograma de la muestra III.	41
Figura 4. - Cromatograma de la muestra IV.	43
Figura 5. - Cromatograma de la muestra V.	45
Figura 6. - Cromatograma de la muestra VI.	47

Figura 7.-	Cromatograma de la muestra VII.	49
Figura 8.-	Cromatograma de la muestra VIII.	51
Figura 9.-	Curva de calibración del acetato de isobutilo.	53
Figura 10.-	Curva de calibración del formiato de etilo.	55
Figura 11.-	Curva de calibración del acetato de etilo.	57
Figura 12.-	Curva de calibración del acetato de isoamilo.	59
Figura 13.-	Curva de calibración del alcohol amílico activo.	61
Figura 14.-	Curva de calibración del alcohol isoamílico.	63

RESUMEN

RESUMEN.

Se estudió la fracción alcohol-éster en cuatro muestras de cerveza clara y cuatro muestras de cerveza oscura con el objeto de estimar las diferencias en el contenido de alcoholes y ésteres en los dos tipos de cervezas, y, la posible relación de las variaciones con las propiedades organolépticas de las mismas.

Se seleccionó como técnica analítica para realizar el estudio, la cromatografía gas-líquido.

La fracción alcohol-éster se obtuvo por destilación isotérmica de la cerveza a 78°C. Se colectaron los primeros cuatro mililitros del destilado de los cuales se tomaron diez microlitros para efectuar el análisis cromatográfico.

La columna con la que se obtuvo mejor resolución de la muestra fué la preparada usando como fase estacionaria glicerina al 25% y como soporte Diatoport S, con tamaño de partícula comprendido entre las cribas U.S. 60-80. Se usó helio como gas portador el cual pasó a través de la columna a una velocidad de 27.5 mililitros por minuto.

El detector de flama de ionización se operó con flujos de aire e hidrógeno de 263 y 25 ml por minuto respectivamente, los cuales dieron una temperatura de la celda de ionización de 390°C.

El análisis cualitativo de los picos se efectuó por comparación de los tiempos de retención con componentes conocidos puros y por adición de estos a las muestras, con lo que se obtuvo un aumento del área del pico. El análisis cuantitativo se llevó a cabo por el método de calibración directa en el cual se lleva el área del pico problema a una curva de calibración obtenida con cantidades conocidas del componente puro.

Los resultados obtenidos muestran diferencias en el contenido de alcoholes y ésteres en las diferentes muestras analizadas, observándose especialmente una variación significativa en el contenido de acetato de etilo lo que hace suponer que ejerce una influencia considerable en las propiedades de sabor y aroma de las cervezas.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La industria cervecera en México ocupa un lugar prominente debido a que cuenta con productos de alta calidad e instalaciones modernas. Basándose en la significación de esta industria, tanto en el interior como en el extranjero, se hace necesario contar con técnicas de análisis rápidas y confiables con el fin de determinar la calidad de las cervezas.

Entre los factores que influyen grandemente en la calidad de las cervezas se encuentran las propiedades de sabor y aroma, en las que tiene una influencia considerable la fracción alcohol-éster. El conocimiento de la significación de esta fracción se ha facilitado con el desarrollo de la cromatografía gas-líquido, que permite un examen sistemático de los productos de fermentación.

Este trabajo tuvo por finalidad estudiar las diferencias de la fracción alcohol-éster en algunas muestras de cervezas mexicanas claras y oscuras y la posible influencia de estas diferencias en las propiedades de sabor y aroma, a la vez de proporcionar un método sencillo y práctico que permitiera valorar esta fracción; para alcanzar las finalidades señaladas se empleó como técnica de análisis la cromatografía gas-líquido, y como medio para obtener la fracción volátil, la destilación.

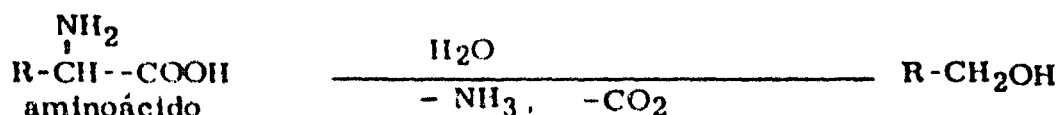
I. - ANTECEDENTES

A) FORMACION DE ALCOHOLES SUPERIORES.

Durante la fermentación alcohólica tiene lugar la formación del grupo de alcoholes conocidos como fusel, que tienen importancia por su influencia determinante en el sabor y aroma de los productos de fermentación.

Los alcoholes fusel, o aceite fusel como también se les conoce, están formados principalmente por: alcohol isoamílico (3 metil, 1 butanol), alcohol isobutílico (2 metil, 1 propanol), alcohol amílico - activo (2 metil, 1 butanol), y alcohol n-propílico. (2), (3), (4), (14).

Aún cuando numerosos mecanismos han sido propuestos para explicar la formación de estos alcoholes en el proceso de fermentación, el de Ehrlich y la modificación de este por Neubauer y Fromherz son los generalmente aceptados a la fecha. Ehrlich indica que la formación de estos alcoholes depende de la fuente de nitrógeno del medio de fermentación (4), (5). Para confirmar lo anterior demostró la formación de estas sustancias a partir de aminoácidos en presencia de azúcar, obteniendo en un caso a partir de leucina alcohol isoamílico, y alcohol amílico de la isoleucina. (1), (2).



Mecanismo de Ehrlich.

Neubauer y Fromherz modificaron el mecanismo de Ehrlich suponiendo que el aminoácido puede transformarse en el iminoácido al ceder hidrógeno a una deshidrasa (aceptor), y que por adición de agua se produce un desprendimiento de amoníaco transformándose a un cetoácido. Este cetoácido sufre una descarboxilación formandose anhídrido carbónico y un aldehido con un átomo de carbono menos, el cual, al tomar hidrógeno del aceptor de la primera fase, forma el alcohol. (1), (4), (6).

Los ésteres aparecen después de la formación de alcoholes y la mayor formación tiene lugar en la segunda mitad de la fermentación primaria y durante la etapa de reposo inicial después de la fermentación. (11), (12), (15).

No obstante, en la formación de la fracción alcohol-éster intervienen diversos factores; así se tiene que las cervezas elaboradas con levaduras de superficie, o con levaduras de fondo presentan diferencias considerables en su contenido de alcoholes y ésteres, (8), explicándose estas diferencias por el hecho de que ambas fermentaciones se realizan a diferentes temperaturas. (12).

Se ha podido comprobar que las propiedades bioquímicas de las levaduras a menudo difieren apreciablemente y pueden tener efectos muy significativos sobre la producción de volátiles y por lo tanto del aroma de la cerveza. (12). Otros factores como la velocidad de inoculación, la composición del mosto, la aereación y agitación de este durante la fermentación tienen notable influencia en la producción de dichos volátiles. (13), (16)

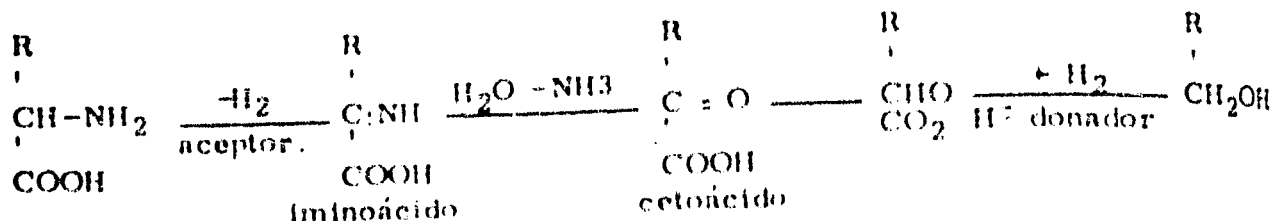
D) INFLUENCIA DE LA FRACCIÓN ALCOHOL-ESTER EN LAS PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DE LA CERVEZA

En lo que respecta al aroma y sabor de la cerveza se ha dicho que es el resultado de un complejo balance de los efectos individuales de sus constituyentes.

La literatura internacional indica que son relativamente pocas las sustancias volátiles presentes en la cerveza que tienen influencia considerable en las propiedades de sabor y aroma de la misma. (13). No obstante, pese a que son pocos los componentes de la fracción alcohol-éster que contribuyen a las propiedades antes mencionadas, y considerando a la vez las pequeñas cantidades en que se encuentran, su presencia en una bebida fermentada como la cerveza le imparte un sabor y aroma peculiar.

E) CROMATOGRAFIA DE GASES.

Se puede definir como un proceso en el cual una mezcla es separada en sus constituyentes por el paso de una fase gaseosa móvil sobre una fase estacionaria.



Modificación de Neubauer y Fromherz.

Estos son los dos mecanismos fundamentales propuestos y hasta ahora aceptados para explicar la formación de alcoholes superiores.

B) FORMACION DE ESTERES.

Otro grupo de compuestos formados como coproductos de la fermentación son los ésteres, que en combinación con los alcoholes actúan las propiedades organolépticas de la cerveza.

La formación de ésteres en la fermentación alcohólica parece estar asociada al metabolismo de las levaduras, en particular al metabolismo de la acil-coenzima A (7). Esto se ha deducido ya que al haber una inhibición de la acil-coenzima A se suspende la formación de ésteres, al contrario, sustancias como la biotina (7), tiamina y ácidos grasos (8), (9), que afectan el crecimiento de las levaduras son inhibidoras de la formación de ésteres, particularmente de acetato de etilo.

El hecho de que el acetato de etilo sea el éster que se encuentra en mayor proporción en el grupo de ésteres que forman parte de los volátiles de fermentación, está explicado por la presencia de grandes cantidades de alcohol etílico y ácido acético. (10).

C) VARIACIONES DE LA FRACCION ALCOHOL-ESTER EN EL PERIODO DE FERMENTACION.

De acuerdo con los estudios realizados por Hashimoto y Kuroiwa (11), los alcoholes se forman primeramente en el mosto, su formación aumenta gradualmente a medida que disminuye la concentración de azúcares fermentables, de tal manera que alcanzan su más alto nivel al finalizar la fermentación.

Cuando la fase estacionaria es un sólido de gran superficie se habla de cromatografía gas-sólido, cuando la fase estacionaria está constituida por un líquido no volátil que reviste a un soporte sólido inerte se refiere a la cromatografía gas-líquido. (17).

Las partes básicas de un cromatógrafo de gases son: gas portador, puerta de inyección, columna, detector, y registrador.

El gas portador difunde los solutos a través de la columna; a una temperatura dada y a velocidad de flujo constante se eluirán los componentes de la muestra en tiempos característicos según su grado de volatilización. (18).

En la puerta de inyección la muestra es vaporizada y transferida a la columna como una mezcla de vapor-gas portador. La temperatura en la puerta de inyección debe ser ligeramente más alta que el punto de ebullición del componente menos volátil. (17), (18).

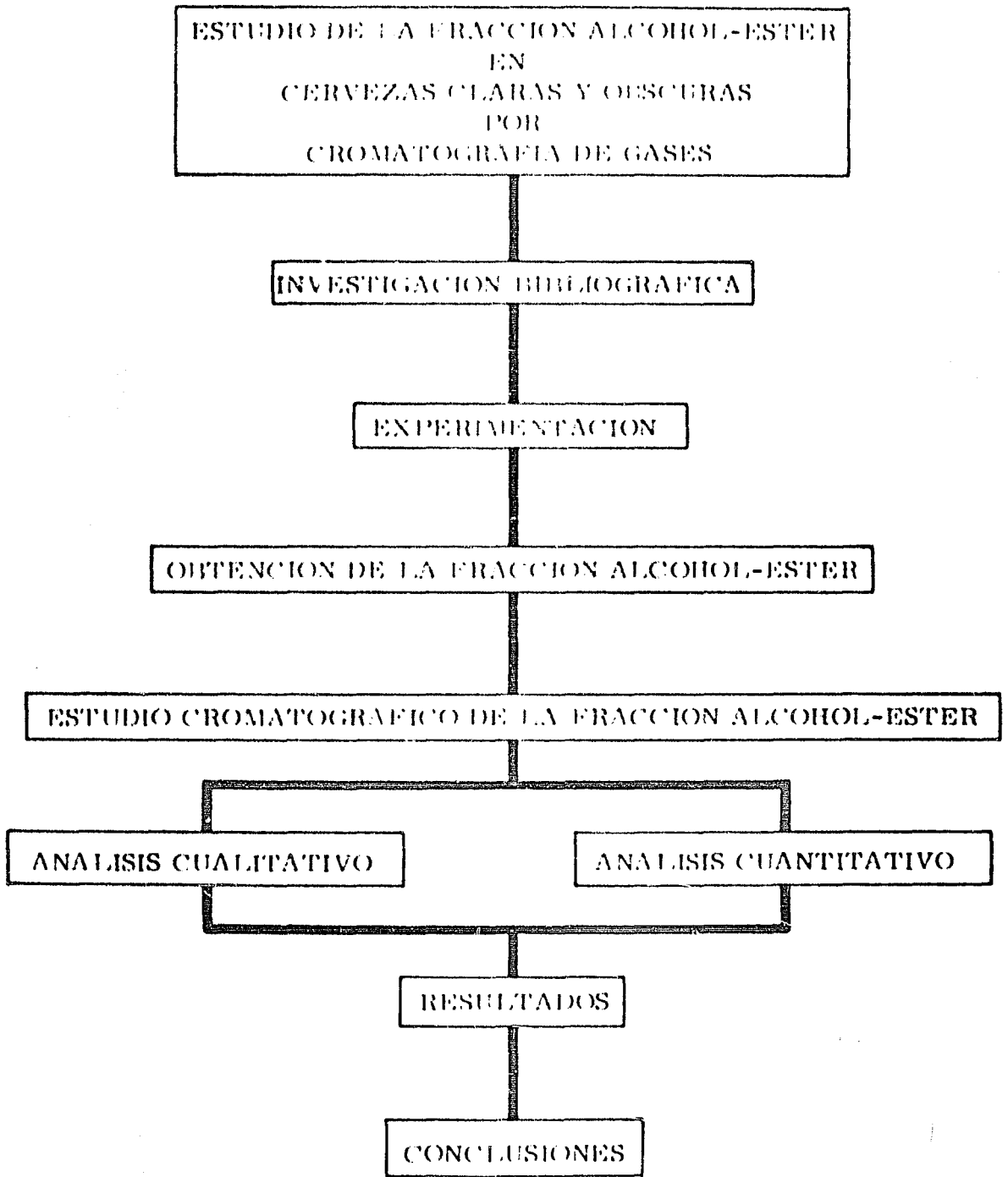
La columna está formada por un soporte sólido inerte recubierto con un líquido no volátil (fase estacionaria) que actúa como separador de los constituyentes de la muestra por analizar. (20). La capacidad de separación de una columna depende de ciertos factores entre los que se pueden incluir: naturaleza y cantidad de la fase estacionaria, tamaño de partícula del soporte, uniformidad del empaque, longitud y diámetro de la columna, temperatura de la columna, velocidad del gas portador, propiedades de los componentes de la mezcla por analizar, su grado de disolución en la fase estacionaria así como el tamaño de la muestra. (19).

El detector indica la presencia de los componentes que con el gas portador abandonan la columna. (20).

En este estudio se utilizó el detector de flama de ionización en el cual los componentes que abandonan la columna son ionizados por una flama de aire-hidrógeno, la corriente producida por las moléculas al estado iónico es medida por un electrómetro y conducida a un amplificador que aumenta la señal. (19).

El registrador imprime las señales recibidas del amplificador.

A) PLAN DE INVESTIGACION



B) TRABAJO EXPERIMENTAL.

Se estudiaron cuatro muestras de cervezas oscuras identificadas como: I, II, III, y IV, y cuatro muestras de cervezas claras - identificadas con los números V, VI, VII, y VIII.

Todas las muestras fueron tratadas en condiciones idénticas. Se empleó en este estudio el cromatógrafo de gases F & M modelo 720 con el detector de flama de ionización modelo 1609.

1.- Obtención de la fracción Alcohol-éster.

La fracción alcohol-éster de la cerveza puede ser extraída - principalmente por dos procedimientos: extracción con disolventes y - por destilación. - La extracción con disolventes aunque presenta la ven- taja de ser más rápida, en el proceso de extracción son arrastrados - ácidos y aldehídos que pueden interferir el análisis cromatográfico, por otra parte se hace necesario el uso de disolventes de alta pureza debido a que de otra manera son registrados componentes extraños a la fracción. Considerando estos aspectos se seleccionó la destilación para obtener la fracción alcohol-éster, ya que por medio de ella es posible obtener a - una temperatura adecuada, una fracción constituida exclusivamente por alcoholes y ésteres, evitándose el empleo de compuestos ajenos a la - fracción deseada.

La selección de la temperatura de destilación se efectuó tenien do en cuenta que el acetato de etilo, que es el éster que se encuentra en mayor proporción tiene un punto de ebullición de 77°C; se fijó así una - temperatura de destilación de 78°C mantenida isotérmica durante el pro ceso. Esta temperatura permite obtener los ésteres de bajo punto de - ebullición presentes en la muestra.

La destilación presentó dos inconvenientes: en primer lugar, siendo la cantidad de destilado muy pequeña era necesario reducir al - mínimo las pérdidas de volátiles; en segundo lugar, se requería mante- ner la temperatura de destilación constante.

Se observó que la condensación de los volátiles no se realizaba de manera completa, y además, dada la longitud del refrigerante, parte de los volátiles quedaban adheridos a las paredes del mismo.

En base a estas observaciones se adaptó directamente a un matraz Claisen de 250 ml un condensador de 18 cm de longitud, la condensación completa se logró haciendo pasar por el refrigerante agua a 2°C usando una bomba de recirculación.

Para mantener la temperatura constante durante el destilado se empleó en primer lugar calentamiento eléctrico, posteriormente baños de arena y agua. El problema se resolvió utilizando un baño de aceite cuya temperatura se mantuvo constante mediante el empleo de un termostato.

175 ml de cerveza se destilaron a 78°C. Se colectaron los primeros cuatro mililitros de destilado procurando evitar pérdidas por volatilización, para lo cual se mantuvo el destilado en congelación hasta el momento de efectuar el análisis cromatográfico.

2.- Análisis por cromatografía de gases.

En cromatografía gas-líquido, la selección de la mejor fase estacionaria para la separación de una muestra en particular es un problema fundamental, que depende de la composición de la muestra; como regla general se puede decir que debe ser similar a los componentes por analizar.

Tomando en cuenta las características químicas de las sustancias a estudiar, se buscó en primer lugar la fase estacionaria adecuada para obtener la mejor separación de la muestra. Como los componentes por analizar eran sustancias polares (R-OH-RCOOR) se eligió la glicerina como fase estacionaria, en virtud de que la afinidad de ésta por los grupos oxhidrilo hace que los alcoholes se retengan mayor tiempo en la columna que los ésteres. Debido a que estos últimos se encuentran en muy pequeñas cantidades es necesario separarlos en primer término, a fin de evitar enmascaramientos por parte de los componentes presentes en mayor proporción.

Preparación de la columna de glicerina al 25%.

Se pesaron 5.25 g de glicerina (fase estacionaria) y 22.1 g de soporte Diatoport S previamente pasado por las cribas U.S. 60-80 con el fin de tener partículas de tamaño uniforme. La fase estacionaria disuelta en metanol se agregó al soporte mezclándose perfectamente.

ner la velocidad de flujo apropiada para realizar la separación.

Controlados los aspectos antes mencionados se establecieron finalmente las condiciones de análisis de la siguiente manera:

Columna, Glicerina al 25% sobre Diatoport S.

Temperatura de la columna.	72°C
Temperatura del detector.	210°C
Temperatura de la puerta de inyección.	175°C
Temperatura de la celda de ionización.	390°C
Atenuaciones, (ver cromatogramas)	
Sensibilidad, 10 (*)	

Flujos:

Helio	27.5 ml/min.
Aire	263 ml/min.
Hidrógeno	25 ml/min.

La cantidad de muestra analizada fue en todos los casos de 10 microlitros de destilado.

El análisis cualitativo de los picos se realizó por comparación de los tiempos de retención de los componentes de la muestra con disolventes puros, y por aumento del área del pico problema al adicionar a la muestra un compuesto conocido.

El análisis cuantitativo se efectuó por el método de calibración directa, que consiste en comparar el área de un pico con el área obtenida con una cantidad conocida de un compuesto puro.

(*) De acuerdo con las atenuaciones empleadas corresponde a:
16 x 10⁻¹¹ amperios, 32 x 10⁻¹¹ amp., 64 x 10⁻¹¹ amp., y 1024 x 10⁻¹¹ amp.

En las diferentes cervezas analizadas claras y oscuras se encontraron los siguientes componentes:

Acetato de isobutilo
Formiato de etilo
Acetato de etilo
Acetato de isoamilo
Alcohol etílico
Alcohol metílico
Alcohol amílico activo (2 metil, 1 butanol).
Alcohol isoamílico (3 metil, 1 butanol).

El pico correspondiente al etanol enmascara al alcohol metílico y probablemente a otros alcoholes que se encuentran en pequeñas cantidades. Los componentes antes mencionados se encontraron en todas las cervezas analizadas a excepción del acetato de isobutilo que no se encontró en las muestras III y IV. (Figuras 3 y 4).

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo observar que el contenido de acetato de isobutilo presentó diferencias en las distintas muestras de cervezas analizadas, no obstante el contenido promedio total resultó ser mayor en las oscuras que en las claras.

Los valores de formiato de etilo indican que se encuentran en la misma proporción en los dos tipos de cervezas: oscuras 2.9 p.p.m., claras 2.7 p.p.m.

El contenido de acetato de isoamilo promedio fué mayor en las cervezas oscuras que en las claras.

El contenido de acetato de etilo en las cervezas claras está en un rango de 8 a 41 p.p.m. y en las cervezas oscuras estos valores se encuentran significativamente aumentados alcanzando cifras de 31 a 70 p.p.m.

El hecho de que el acetato de etilo sea el éster que se encuentra en mayor proporción y que su contenido varíe apreciablemente de una cerveza a otra, hace pensar que probablemente sea uno de los componentes de la fracción volátil y en particular de la fracción alcohol-éster que más contribuya a las propiedades organolépticas de la cerveza.

El contenido de alcohol amílico activo no presentó variaciones marcadas de uno a otro tipo de cerveza, pero sí variaciones apreciables

de una a otra muestra. El alcohol isoamílico se encontró siempre en mayor proporción que el alcohol amílico activo a excepción de las muestras VI y VIII. (figuras 7 y 8).

Las variaciones encontradas en las muestras analizadas pueden ser explicadas en función del proceso de elaboración de la cerveza. Se ha visto que la formación de volátiles está condicionada por ciertos factores que pueden favorecer o disminuir su volumen, entre estos factores pueden citarse: tipo de levadura empleada, velocidad de inoculación, temperatura de fermentación, composición, pH, agitación y aereación del mosto, temperatura de almacenamiento y maduración.

Las diferencias significativas en el contenido de la fracción alcohol-éster encontradas en las cervezas claras y oscuras, aparte de los factores antes mencionados, puede probablemente estar influenciada por el tipo de malta empleada en la elaboración de los dos tipos de cerveza.

En el proceso de secado, en la elaboración de maltas claras, la eliminación de agua se realiza rápidamente de tal manera que se reduce la actividad enzimática, en tanto que en el secado de la malta para la elaboración de cervezas oscuras la eliminación de agua es lenta, lo que ocasiona un aumento en la actividad amilolítica y proteolítica de las enzimas, dando lugar a una mayor formación de azúcares y compuestos nitrogenados simples; esta malta tiene la ventaja sobre la clara que los materiales nutritivos se encuentran parcialmente hidrolizados lo que favorece la formación de volátiles.

CONCLUSIONES

1. - Los estudios efectuados en diversas muestras de cervezas claras y oscuras mostraron variaciones significativas en el contenido de acetato de etilo, lo que hace suponer que sea uno de los componentes que tienen mayor influencia en las propiedades organolépticas de las cervezas
2. - Las cervezas oscuras mostraron en general mayor contenido de alcoholes y ésteres que las cervezas claras, debido probablemente a la influencia que ejerce en la formación de volátiles los diferentes tipos de malta empleada.
3. - Las variaciones encontradas en el contenido de alcoholes y ésteres en las diferentes muestras analizadas pueden ser explicadas tomando en consideración que la formación de volátiles está en parte influenciada por las condiciones en que se realice la fermentación de la cerveza.
4. - La destilación isotérmica a 78°C permitió obtener una fracción constituida exclusivamente por alcoholes y ésteres. La resolución adecuada de estos componentes se logra con el empleo de una columna de glicerina.
5. - La cromatografía de gases es una técnica analítica sencilla y práctica que permite evaluar los componentes volátiles que contribuyen directamente a las propiedades de sabor y aroma de las cervezas.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. - Guynon, James F., Ingraham, John L., and Crowell, Edward A. The formation of n-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*.
Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, -
No. 1: 163 - 8 (1961).
2. - Lawrence, William C.
Volatile compounds affecting beer flavor.
Wallerstein Laboratories Communications. Vol. 27,
No. 93/94: 123-52 (1964).
3. - Ingrah, J. L.
Fusel oil formation by yeast.
Journal of the Institute of Brewing . Vol. 71, No. 4:352 (1965).
4. - Hahn, Hugo.
Bioquímica de las Fermentaciones.
Ediciones Aguilar, S. A., Madrid (1956): 514-8.
5. - Ayrapää, T.
Formation of higher alcohols from ^{14}C labelled valine and
leucine.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 73, No. 1: 17-29 (1967).
6. - Ayrapää, T.
Formation of higher alcohols from amino acids derived from
yeast proteins.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 73, No. 1:31-33 (1967).
7. - Nordström, Kurt.
Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 70, No. 3:209-21 (1964).
8. - Nordström, Kurt.
Formation of esters from acids by brewers yeast. Formation by
various strains.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 70, No. 3:226-33 (1964).
9. - Nordström, Kurt.
Formation of esters from acids by brewer's yeast. Formation -
from lower fatty acids.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 70, No. 1:42-55 (1964).

- 10.- Jenard, H.
Study of the volatile constituents of beer.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 71, No. 2:189-90
(1965).
- 11.- Hashimoto, Naoki, and Kuroiwa, Yoshiro.
Gas chromatographic studies on volatile alcohol and esters
of beer.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 72, No. 2:151 (1966).
- 12.- Harrison, G.A.F.
Some practical investigations of beer aroma.
The Brewer Digest. Vol. 42, No. 6:74-6 (1967).
- 13.- Jenard, H.
Study of the conditions of formation of volatile constituents -
during fermentation.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 7, No. 4:4:35 (1965).
- 14.- Morgan, K.
Fusel oil in beer. Quantitative analysis by gas-liquid chromato-
graphy.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 71, No. 2:166-73 (1965).
- 15.- Arkima, V., and Sihto, E.
Amyl alcohol during fermentation.
Journal of the Institute of Brewing. Vol. 71, No. 2:187-9 (1965).
- 16.- Lloyd, Hind H.
Brewing science and practice. Vol. II
Chapman & Hall Ltd. London (1950): 846.
- 17.- Dal Nogare, Stephen, and Juvent, Richards.
Gas-liquid chromatography.
Interscience Publisher. New York (1962): 22-217.
- 18.- Mc Nair, Harold M. y Bonelli, Ernest J.
Curso básico de cromatografía en fase de gas.
Varian Aerograph. California. (1966) II-p5, I. p9.
- 19.- Keulemans, A.I.M.
Gas chromatography. 2nd. Edition.
Reinhold Publishing Corporation. New York (1959): 12, 102.
- 20.- Heftmann, Erich.
Chromatography.
Reinhold Publishing Corporation. New York (1961): 164.

**RETENCIONES, AREAS RELATIVAS, IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION
DE LOS PICOS DE LOS CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A
LAS MUESTRAS ANALIZADAS**

Tabla No. 1

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p. p. m.
# 1	4 1	1 min. 43 seg.	12	Acetato de isobutilo	7.9
# 2	4	2 min. 14 seg.	2.8	Formiato de etilo	3.6
# 3	4	3 min. 36 seg.	33.6	Acetato de etilo	58.0
# 4	4	3 min. 53 seg.	13.6	Acetato de isoamilo	10.7
# 5	256	14 min. 27 seg.	33049	Etanol, metanol.	*
# 6	16	18 min. 27 seg.	320	Alcohol amílico activo.	40.1
# 7	16	21 min. 7 seg.	424	Alcohol isoamílico.	63.3

* El pico correspondiente al etanol no se cuantificó debido a que enmascara pequeñas cantidades de alcohol metílico.

Tabla No. 2

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p.p.m.
# 1	4	1 min. 45 seg.	.8	Acetato de isobutilo.	.013
# 2	4	2 min. 15 seg.	2.4	Formiato de etilo.	3.3
# 3	4	3 min. 37 seg.	38.4	Acetato de etilo.	63
# 4	4	3 min. 51 seg.	8.8	Acetato de isoamilo.	5.7
# 5	256	14 min. 27 seg.	30412	Etanol, metanol.	- - -
# 6	16	18 min. 14 seg.	336	Alcohol amílico activo.	42.5
# 7	16	21 min. 3 seg.	400	Alcohol isoamílico.	60.8

Tabla No. 3

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p. p. m.
# 2	4	2 min. 15 seg.	.8	Formiato de etilo.	1.4
# 3	4	3 min. 37 seg.	41.2	Acetato de etilo.	70
# 4	4	3 min. 52 seg.	15	Acetato de - isoamilo.	12.3
# 5	258	14 min. 36 seg.	35328	E ^t anol, meta ⁿ ol.	- - -
# 6	16	18 min. 15 seg.	352	Alcohol amí-lico activo.	45.8
# 7	16	21 min. 5 seg.	444	Alcohol iso-amílico.	65.7

Tabla No. 4

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p. p. m.
# 1	4	1 min. 42 seg.	6.8	Acetato de isobutilo.	3.4
# 2	4	2 min. 14 seg.	2.8	Formiato de etilo	3.6
# 3	4	3 min. 38 seg.	10.8	Acetato de etilo.	30.8
# 4	4	3 min. 52 seg.	14.8	Acetato de isoamilo.	12
# 5	256	14 min. 26 seg.	30822	Etanol, metanol	--
# 6	16	18 min. 27 seg.	464	Alcohol amílico activo.	65.5
# 7	16	21 min. 7 seg.	505	Alcohol isoamílico.	73.8

Tabla No. 5

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p.p.m.
# 2	2	2 min. 14 seg.	1.8	Formiato de etilo	2.2
# 3	2	3 min. 36 seg.	14.4	Acetato de etilo	22
# 4	2	3 min. 53 seg.	9.8	Acetato de isoamilo	6.7
# 5	256	14 min. 27 seg.	30460	Etanol, metanol	- - -
# 6	16	18 min. 27 seg.	276.8	Alcohol amflico activo.	32.7
# 7	16	21 min. 7 seg.	483	Alcohol isoamflico.	72.2

Tabla No. 6

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p.p.m.
# 1	2	1 min. 40 seg.	7.2	Acetato de isobutilo.	4.1
# 2	2	2 min. 10 seg.	1.8	Formiato de etilo	2.2
# 3	2	3 min. 30 seg.	4.8	Acetato de etilo	7.9
# 4	2	3 min. 48 seg.	5.8	Acetato de isoamilo.	2.5
# 5	256	14 min. 22 seg.	28578	Etanol, metanol.	- - -
# 6	16	18 min. 25 seg.	505	Alcohol amílico activo.	74.7
# 7	16	21 min. 3 seg.	400	Alcohol isoamílico.	60.8

Tabla No. 6

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p. p. m.
# 1	2	1 min. 40 seg.	7.2	Acetato de isobutilo.	4.1
# 2	2	2 min. 10 seg.	1.8	Formiato de etilo	2.2
# 3	2	3 min. 30 seg.	4.8	Acetato de etilo	7.9
# 4	2	3 min. 48 seg.	5.8	Acetato de isoamilo.	2.5
# 5	256	14 min. 22 seg.	28578	Etanol, metanol.	- - -
# 6	16	18 min. 25 seg.	505	Alcohol amílico activo.	74.7
# 7	16	21 min. 3 seg.	400	Alcohol isoamílico.	60.8

Tabla No. 7

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p. p. m.
# 1	2	1 min. 40 seg.	4	Acetato de isobutilo.	.17
# 2	2	2 min. 12 seg.	2	Formiato de etilo.	2.8
# 3	2	3 min. 34 seg.	25.1	Acetato de etilo	41.3
# 4	2	3 min. 53 seg.	4.3	Acetato de isoamilo	1.39
# 5	256	14 min. 25 seg.	30464	Etanol, metanol.	---
# 6	16	18 min. 25 seg.	400	Alcohol amfílico activo.	54.8
# 7	16	21 min. 7 seg.	384	Alcohol isoamfílico.	57.8

Tabla No. 8

Pico	Atenuación	Tiempo de retención	Area relativa	Componente	Contenido en p.p.m.
# 1	2	1 min. 39 seg.	3.6	Acetato de isobutilo.	.15
# 2	2	2 min. 12 seg.	3	Formiato de etilo	3.9
# 3	2	2 min. 12 seg.	4.8	Acetato de etilo.	7.9
# 4	2	3 min. 52 seg.	8.2	Acetato de isoamilo.	5.0
# 5	256	14 min. 26 seg.	30566	Etanol, metanol.	- - -
# 6	16	18 min. 25 seg.	379.2	Alcohol amfílico activo.	50.7
# 7	16	21 min. 5 seg.	452	Alcohol isoamfílico.	67.3

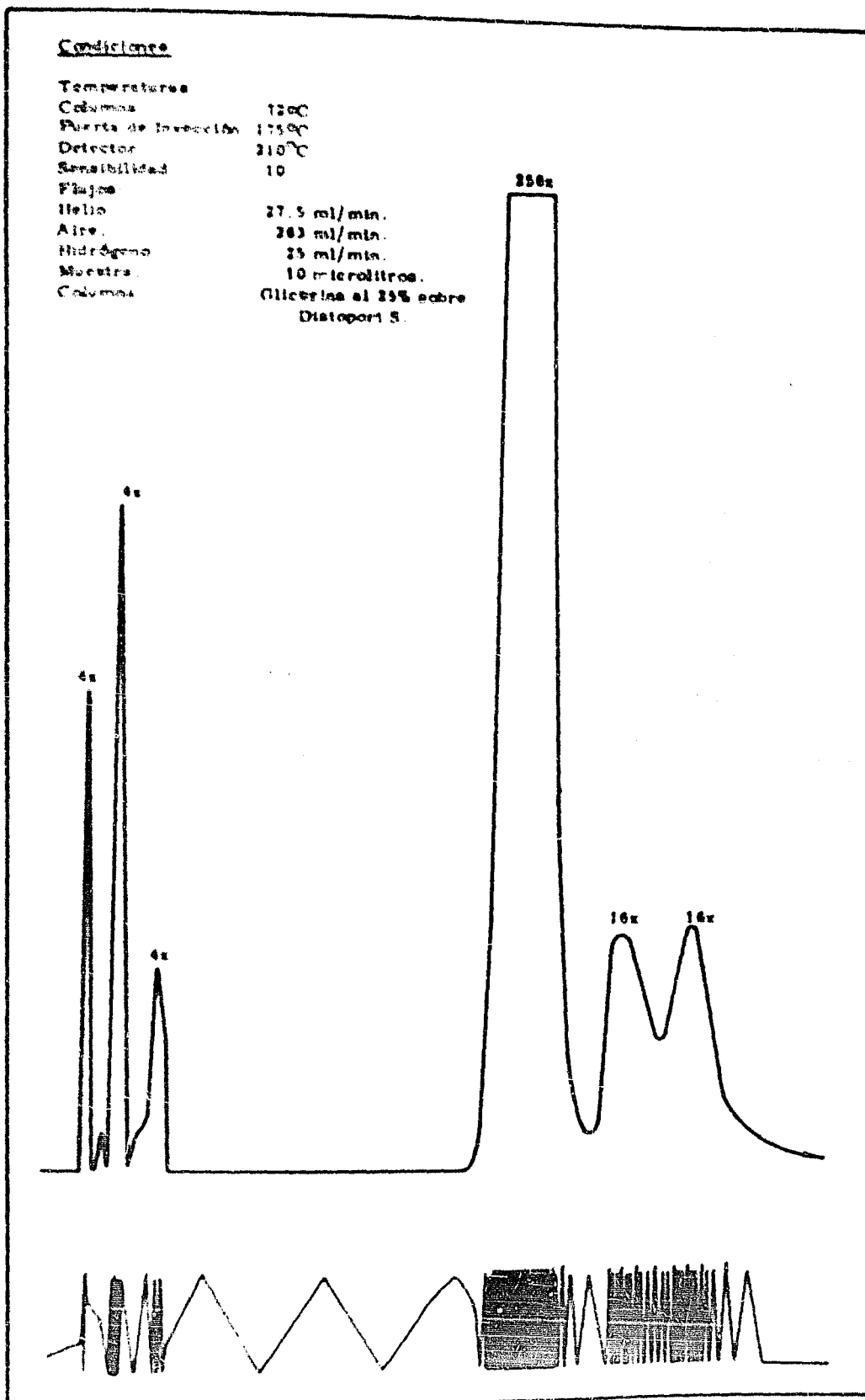


FIGURA 1 - CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA 1.

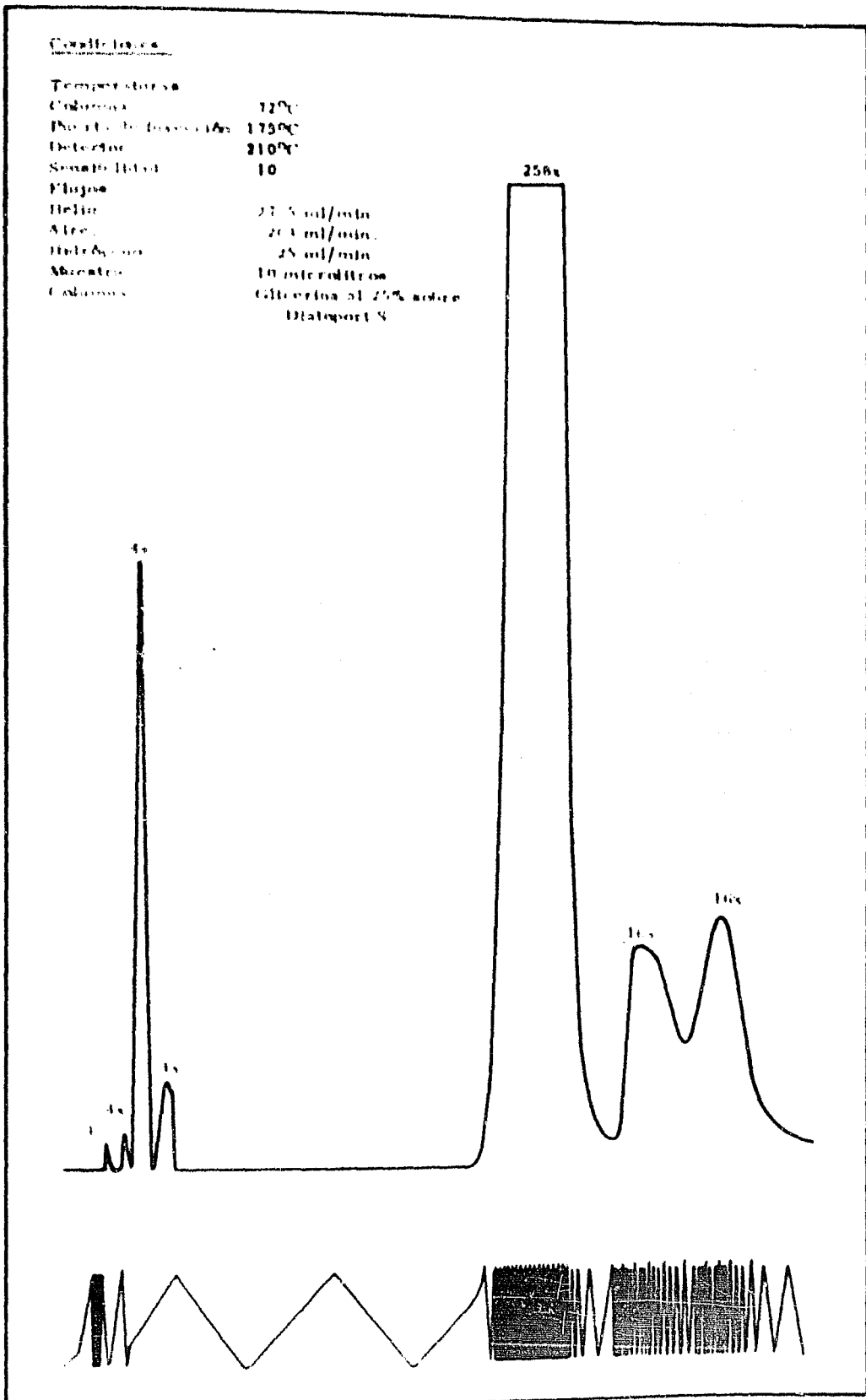


FIGURA 2. CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA II.

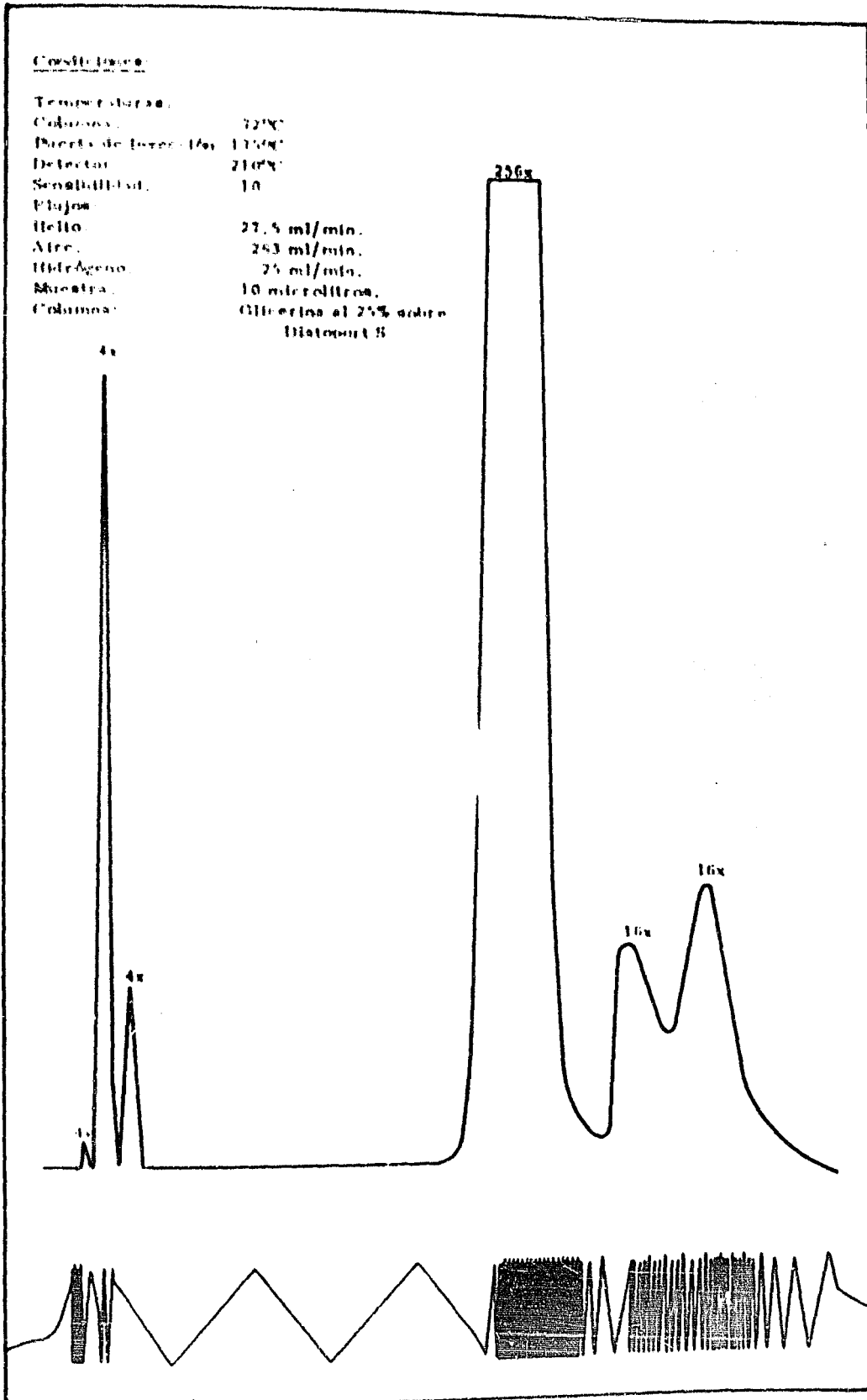


FIGURA 3. - CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA III.

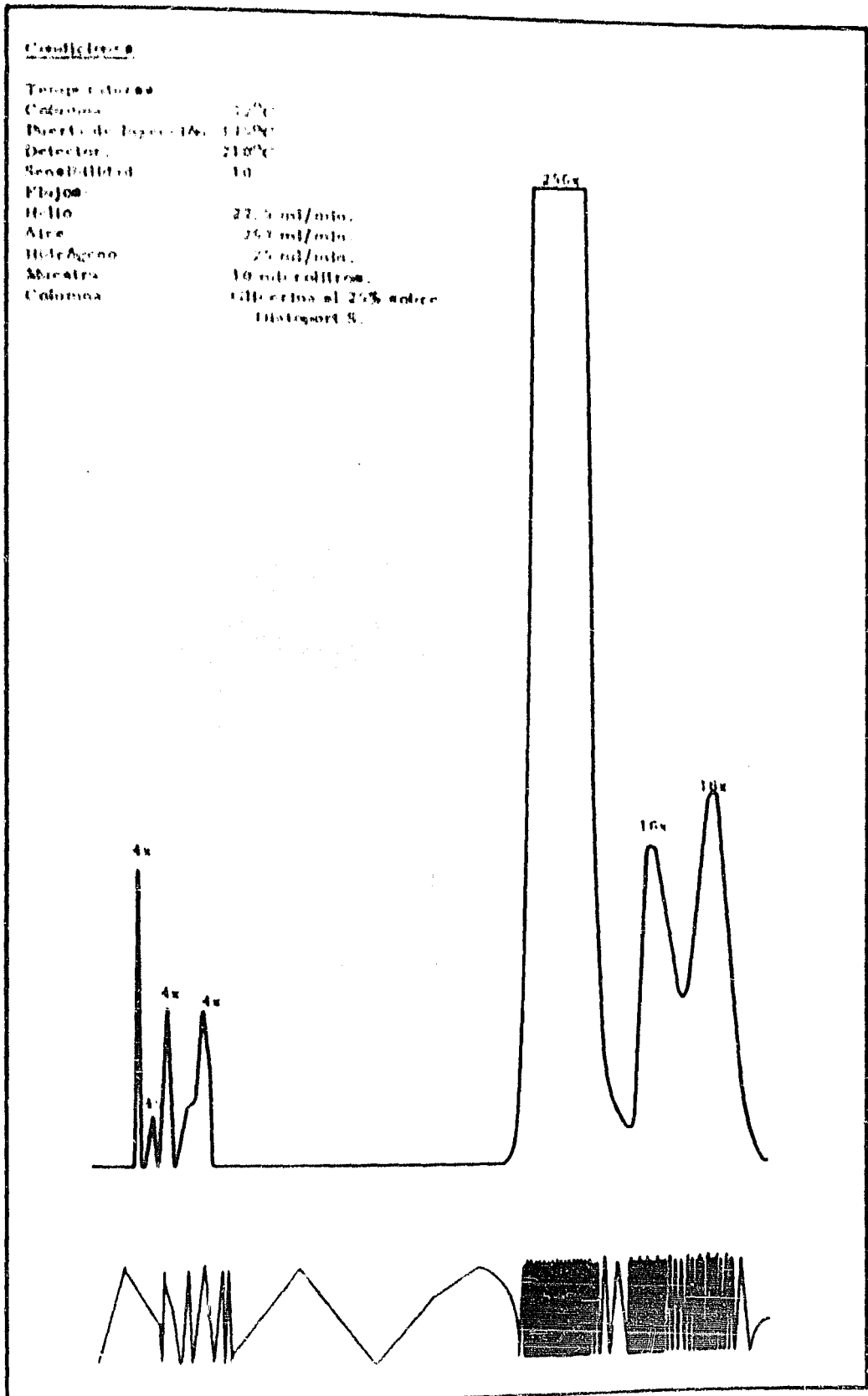


FIGURA 1.5. CRÓMATOGRAMA DE LA MUESTRA IV.

Condiciones:

Temperatura: 120°C
Columna: 120°C
Puerta de inyección: 120°C
Detector: 210°C
Sensibilidad: 10
Flujos:
Helio: 21.5 ml/min.
Aire: 263 ml/min.
Hidrógeno: 25 ml/min.
Muestra: 10 microlitros.
Columna: Celvolona al 25% sobre
Catoport S.

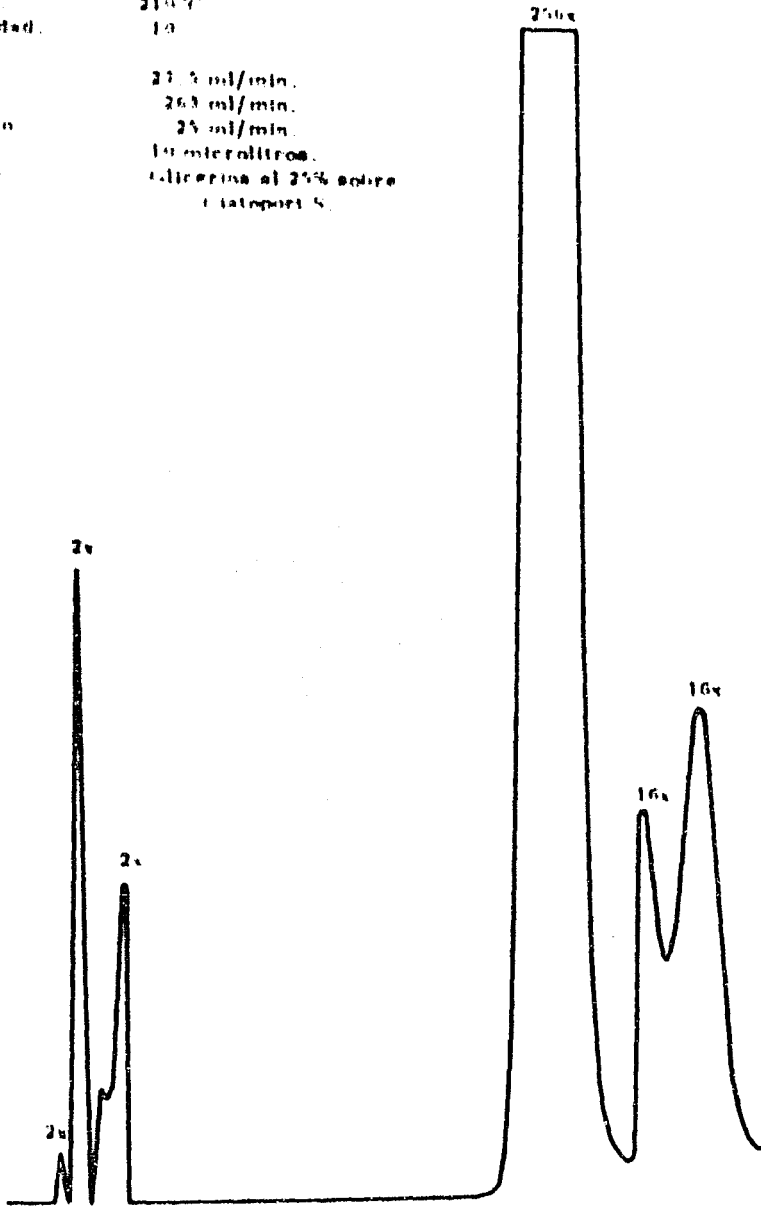


FIGURA 1. CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA 3

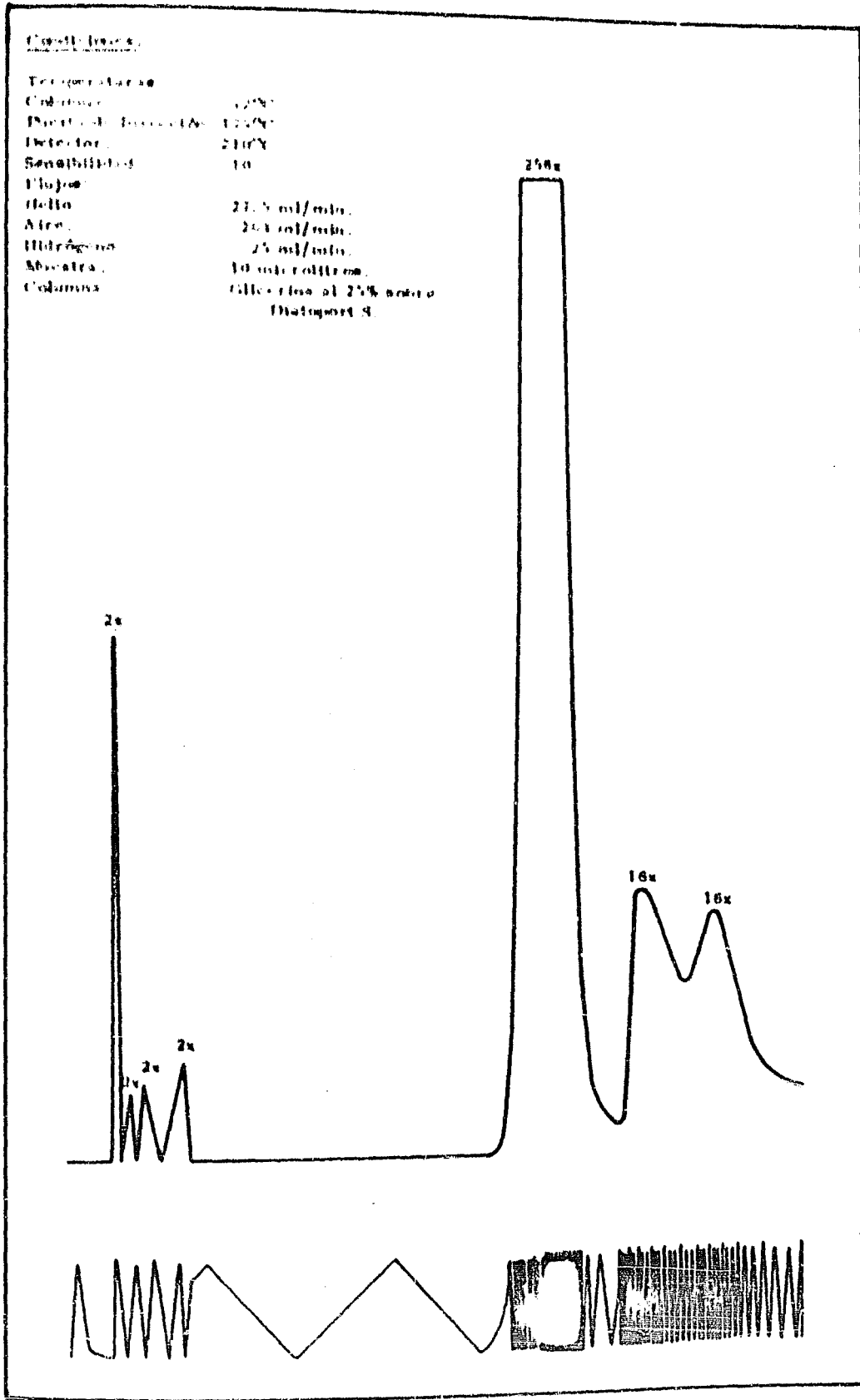


FIGURA C. - CROMATOGRAMMA DE LA MUESTRA VI.

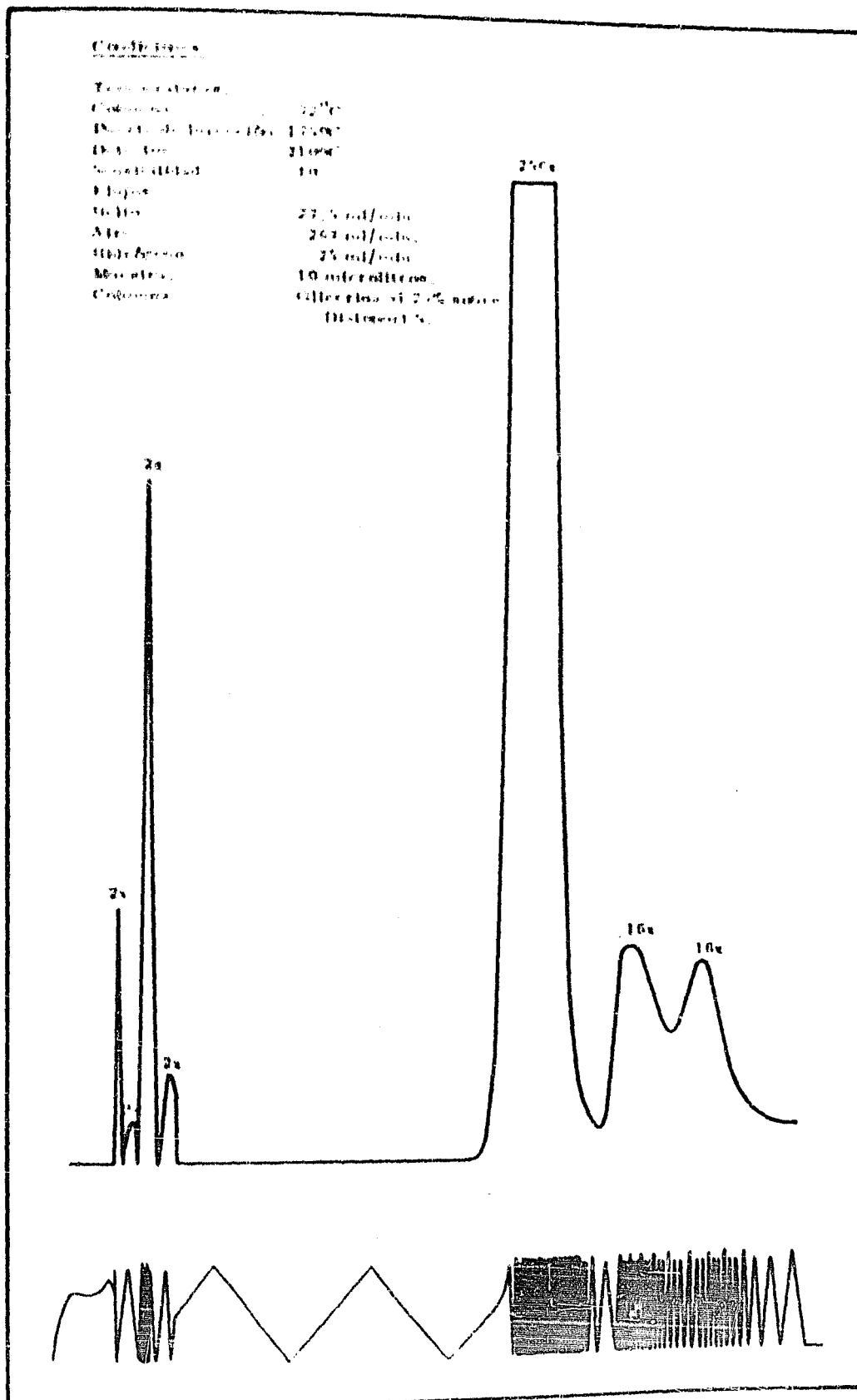


FIGURA 1. - CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA VII.

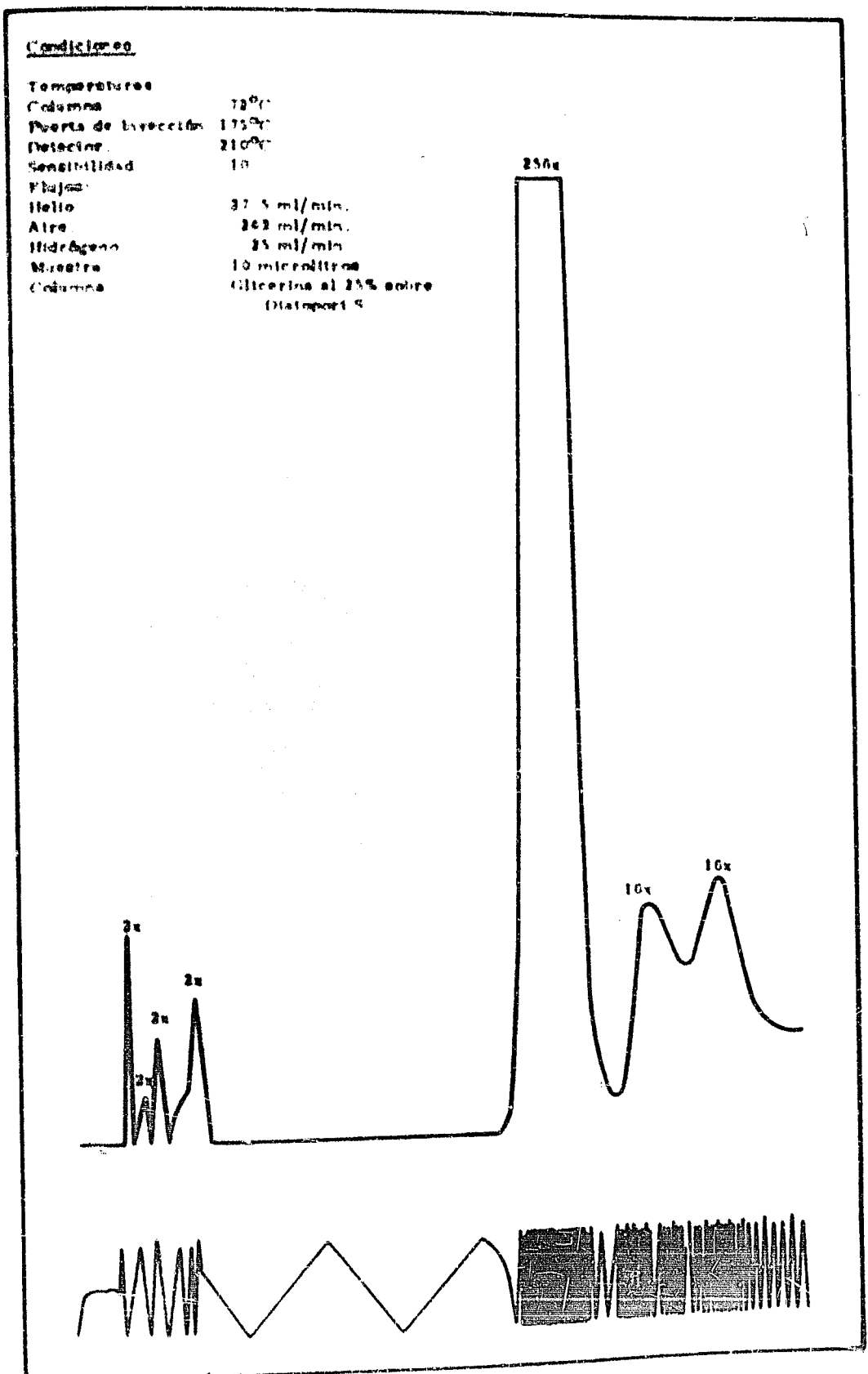


FIGURA 6. - CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA VIII.

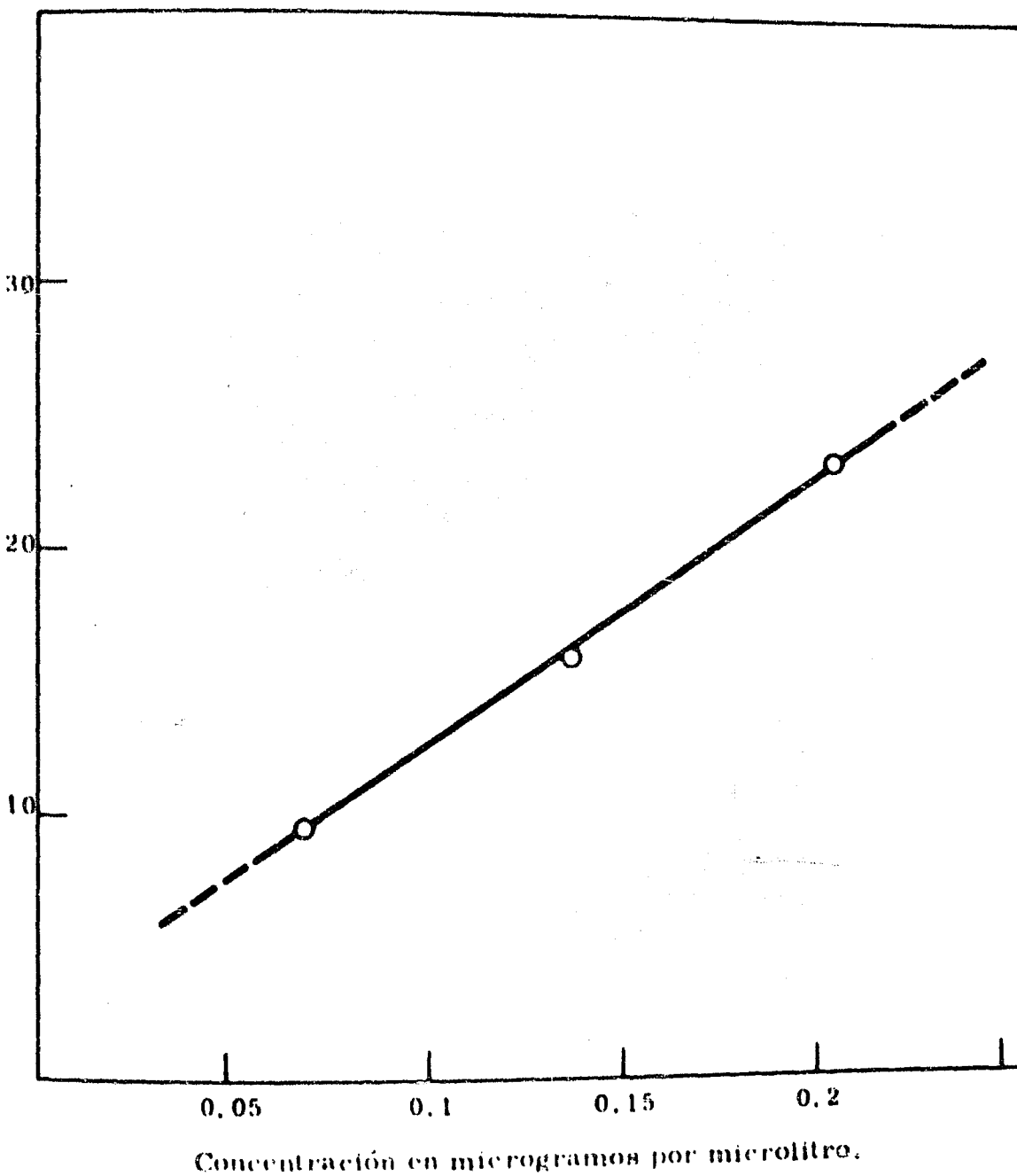
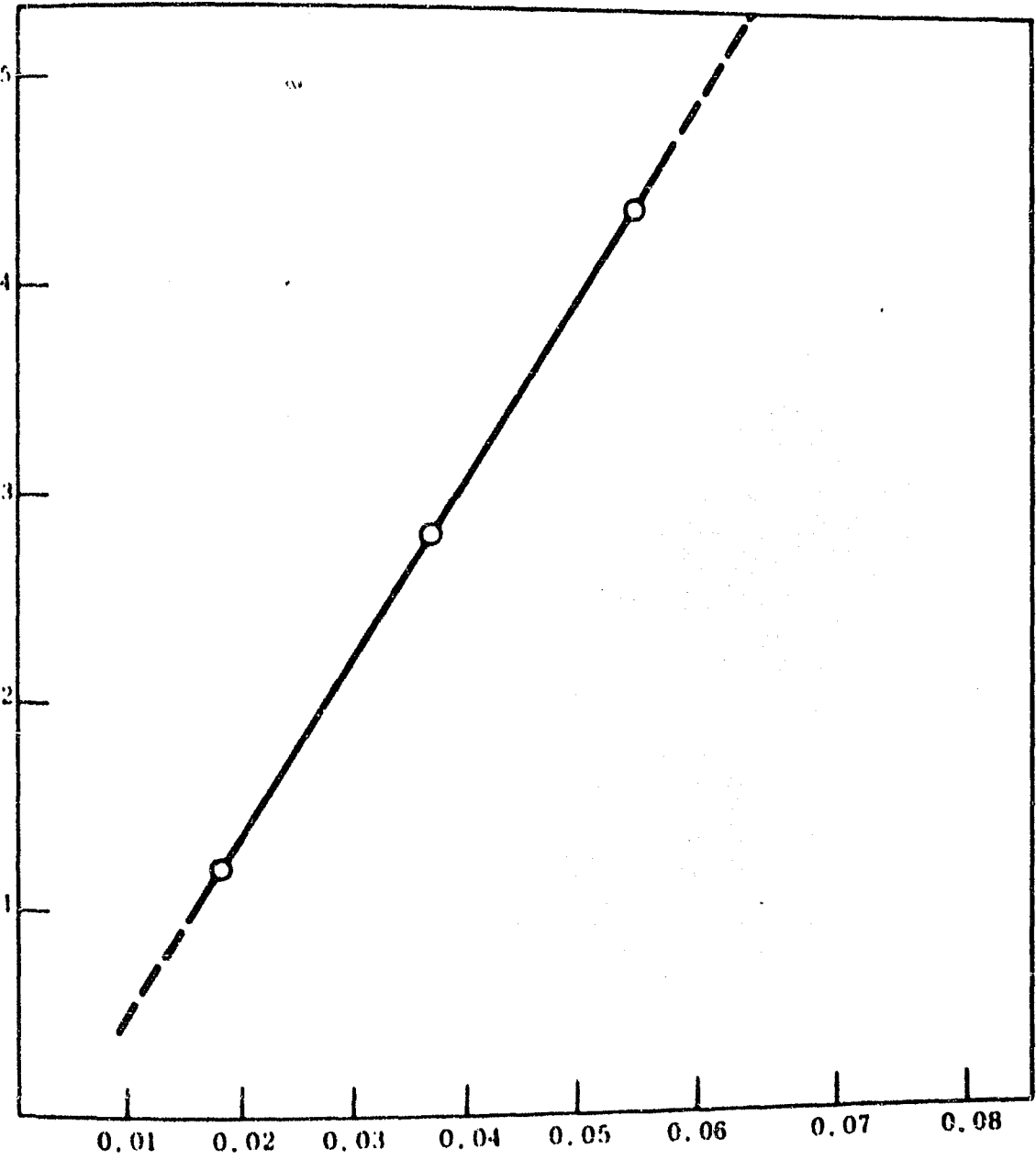


FIGURA No. 9. - CURVA DE CALIBRACION PARA EL ACETATO DE ISOBUTILO.



Concentración en microgramos por microlitro.

FIGURA No. 10. - CURVA DE CALIBRACION PARA EL FORMIATO DE ETILO.

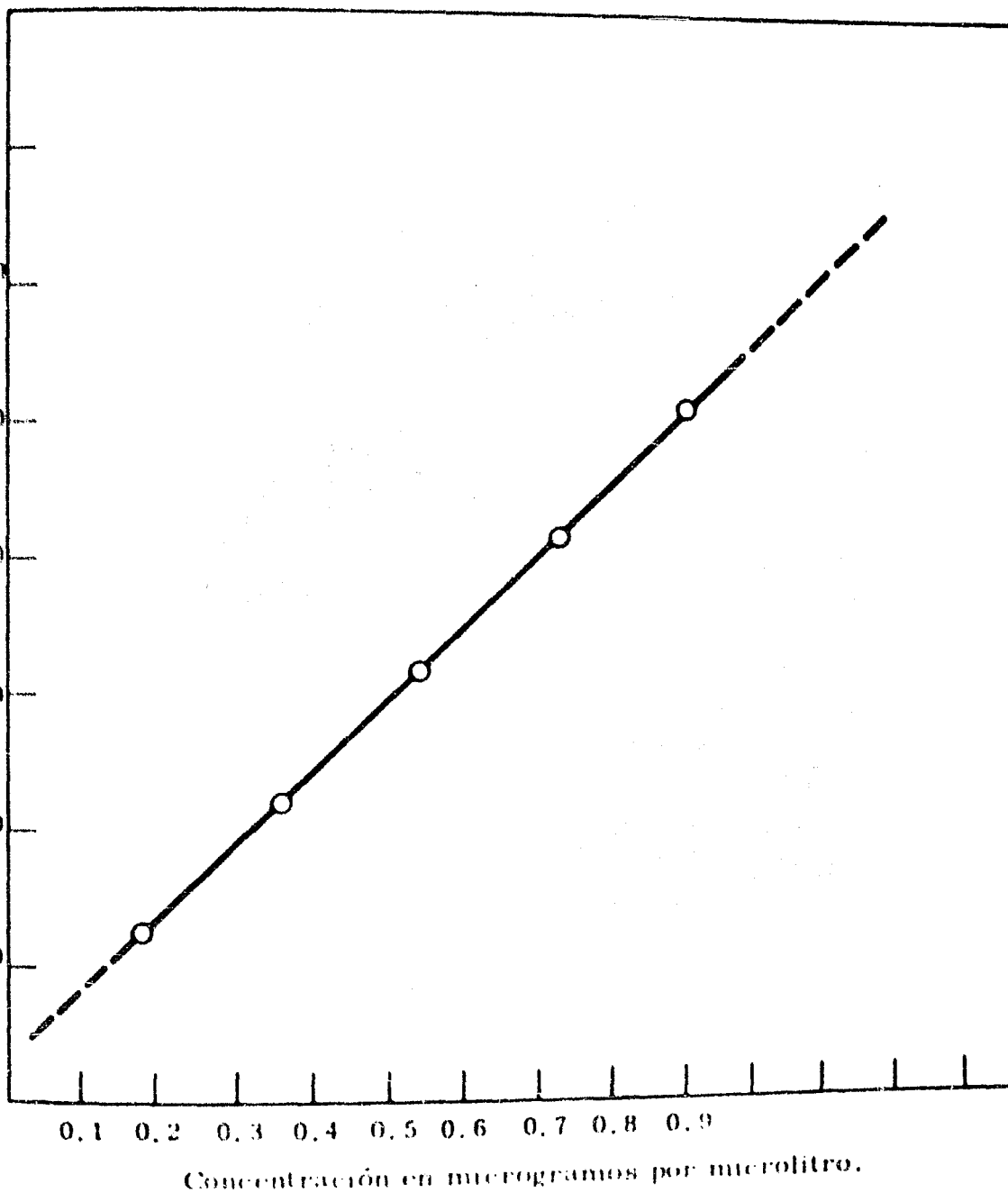
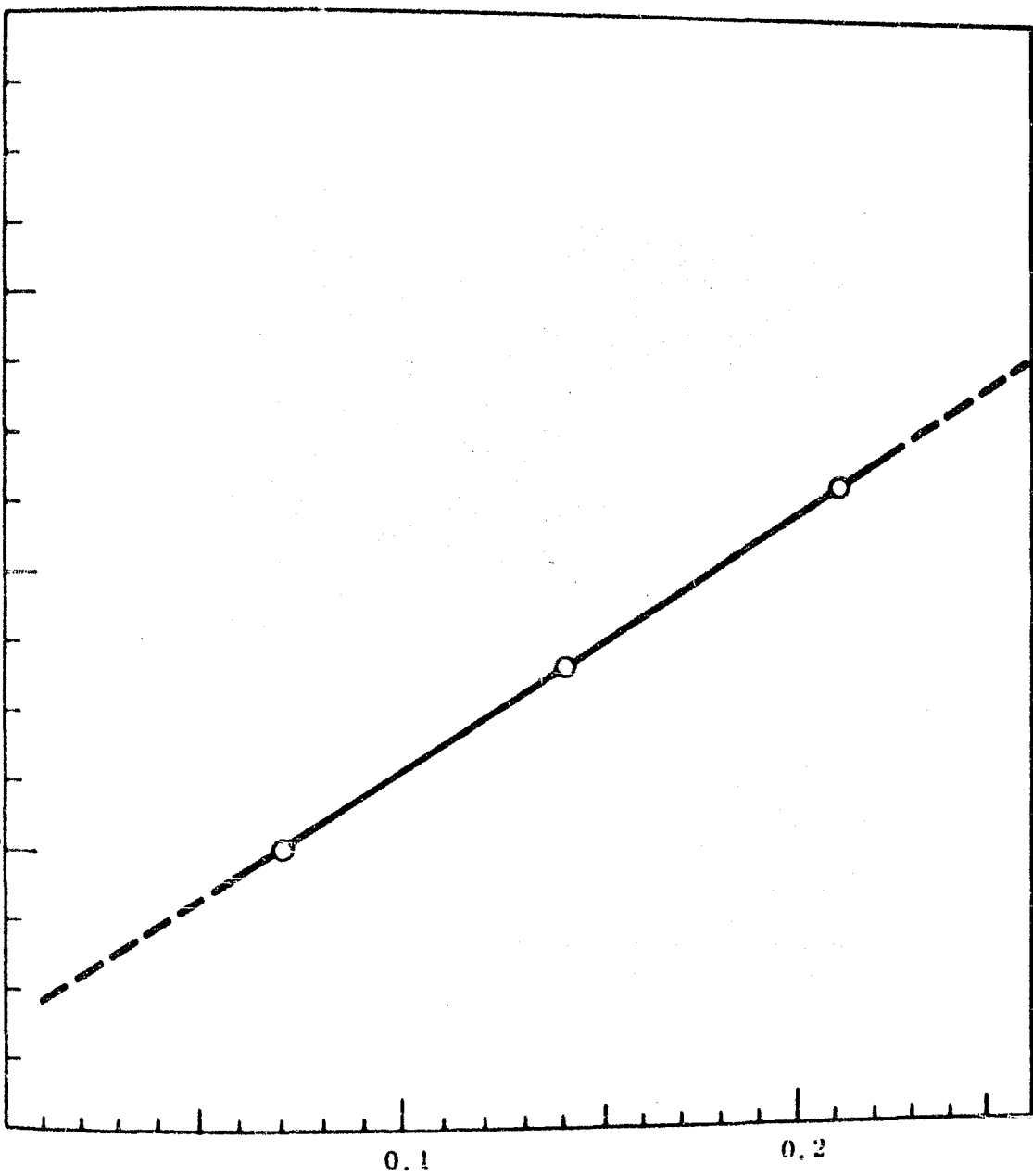
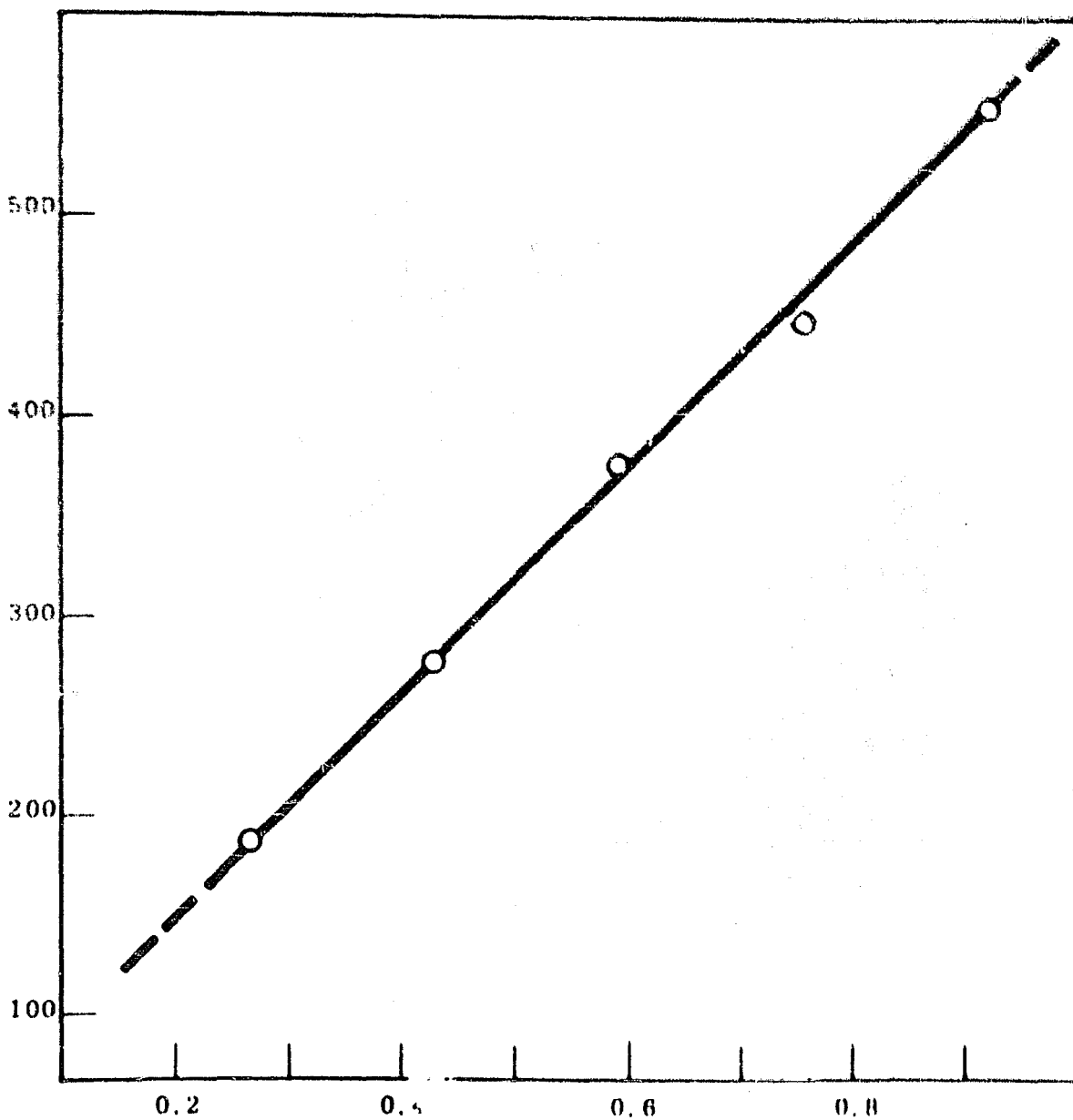


FIGURA No. 11. - CURVA DE CALIBRACION PARA EL ACETATO DE ETILO.



Concentración en microgramos por microlitro.

GRA No. 12. - CURVA DE CALIBRACION PARA EL ACETATO DE ISOAMILO.



Concentración en microgramos por microlitro.

FIGURA No. 13. - CURVA DE CALIBRACION PARA EL ALCOHOL AMILICO ACTIVO.

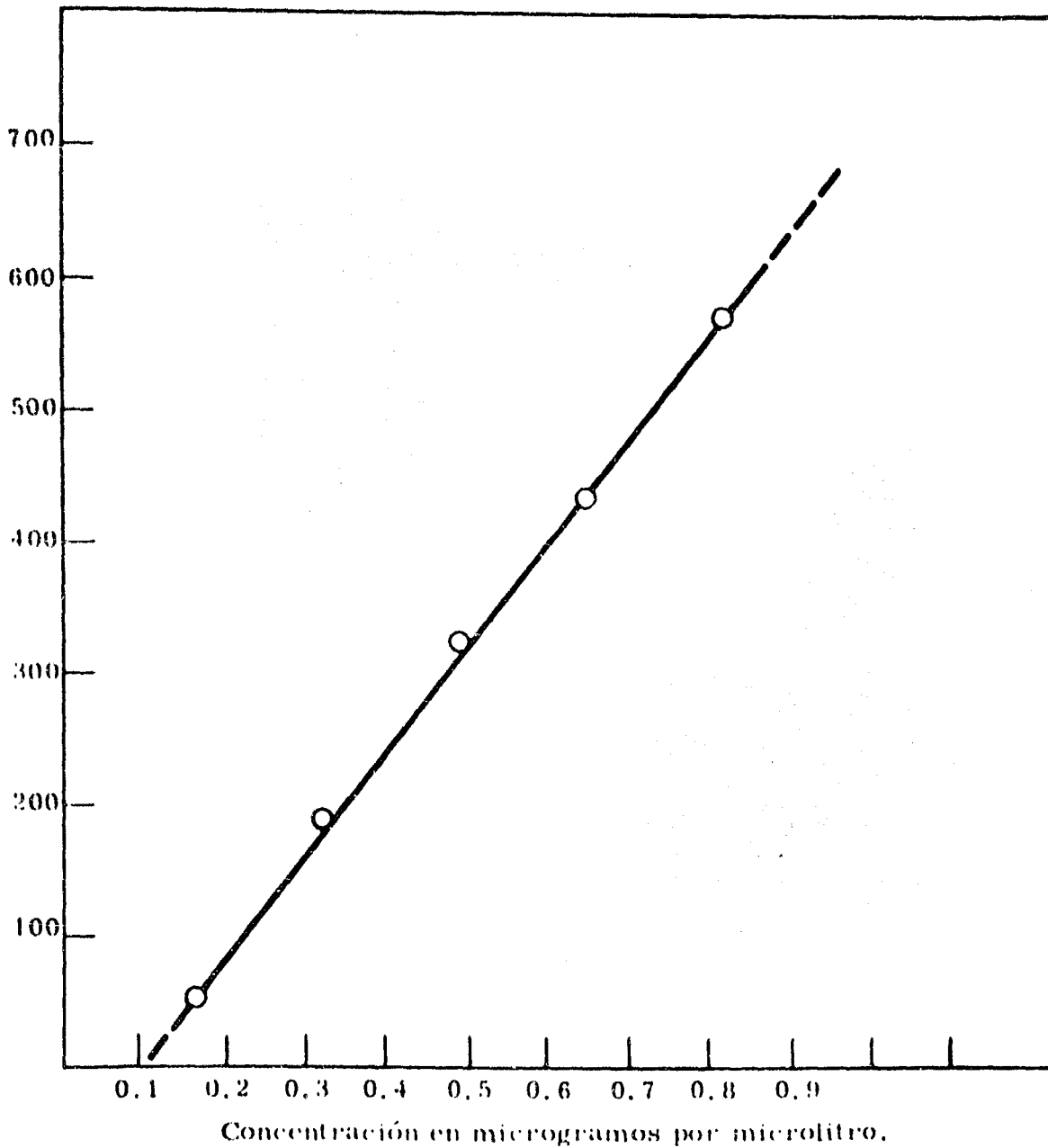


FIGURA No. 14. - CURVA DE CALIBRACION PARA EL ALCOHOL ISOAMILICO.