



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CONGENÉRICOS
EN CERVEZA ELABORADA A PARTIR DE MOSTOS DE
MALTA DE ALTA GRAVEDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:
IBAÑEZ BALTAZAR ANA TANIA



MÉXICO, D.F

2013



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:** **OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO**

VOCAL: **Profesor:** **JOSÉ MARIANO GARCÍA GARIBAY**

SECRETARIO: **Profesor:** **FRANCISCO RUÍZ TERÁN**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **SANDRA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **VERÓNICA DOMÍNGUEZ VALDEZ**

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO 321.
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. CONJUNTO "E"
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

FRANCISCO RUÍZ TERÁN
ASESOR DEL TEMA

ANA TANIA IBAÑEZ BALTAZAR
SUSTENTANTE

Lo que conseguimos con demasiada facilidad
es objeto de gran estimación, solo lo que nos cuesta obtener
otorga valor a las cosas.

Thomas Paine

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, *mi alma mater*, y a la Facultad de Química por haberme abierto sus puertas y apoyarme en su extraordinaria tarea para formarme como profesionalista.

Agradecer, así mismo, a todas aquellas personas que me impulsaron y que contribuyeron a la realización de esta tesis, muy especialmente:

A mis padres por su amor, su apoyo incondicional y el grandioso esfuerzo realizado para poder concluir esta meta.

A mi asesor de tesis, el Dr. Francisco Ruíz Terán por su confianza y dedicación para el desarrollo de este proyecto y haberme brindado su valiosa amistad y paciencia.

A la Dra. Hilda Calderón por su gran apoyo y disposición que me brindó durante las determinaciones analíticas.

Al profesor Agustín Reyo, por su valiosa amistad, apoyo y entusiasmo.

A mis compañeros de laboratorio que junto conmigo estuvieron hasta el final para sacar adelante nuestro trabajo.

A los miembros de mi jurado: Olga Velázquez y el Dr. Mariano García por sus aportaciones y sugerencias que permitieron enriquecer este trabajo.

En lo personal quiero expresar mi agradecimiento a Octavio por su cariño, apoyo y motivación para salir adelante.

Agradecer a mis amigos que son como mi segunda familia y juntos a lo largo de mi estancia en la facultad me acompañaron en esta gran aventura y compartir grandes experiencias que sin duda han sido y siguen siendo una gran alegría en mi vida.

Esta tesis la dedico a:

Mi mamá: *Olga Baltazar Hernández*, por ser el mejor ejemplo de vida y estar siempre a mi lado, por el gran esfuerzo y sacrificio que ha hecho para sacar adelante una familia, agradezco su infinito amor y el gran apoyo que me ha demostrado para ser día a día, una mejor hija, una mejor persona y algún día una gran mujer como lo es ella. Gracias mammy por ser "la mamá mas mala del mundo".

A mis tíos: *Panchito Normita y Eréndira* a quienes admiro tanto y agradezco por que se han preocupado por mi bienestar, sus consejos y apoyo incondicional.

A mi hermano *Oscar Raúl*, por ser mi único "germen" y compartir conmigo una infancia feliz.

Mis abuelitos: *Martha Hernández Roque* y *Francisco Baltazar Carlos* por su cariño y amor, por ser ejemplo de personas que siempre luchan para salir adelante. Los quiero mucho.

A mis primos por la gran convivencia que tenemos, de una manera en especial a mis primos: *Machefy, Dany, Colín, Quique, Ere, Karen, Yiyin y Lalo* a quienes quiero y aprecio como hermanos.

A mi novio *Octavio*, por escucharme, entenderme, por toda la ayuda que siempre me ha brindado y compartir conmigo tantos momentos buenos, malos, tristes, alegres, y chuscos durante esta etapa y que deseo seguir compartiendo. Te amo "chaparro"

En memoria de *Pablo*[†] por haber tenido la dicha de conocerlo y enseñarme el valor de la amistad.

A todos los mencionados de corazón agradezco infinitamente por acompañarme en este periodo de, por su amistad, apoyo, consejos, alegrías, sorpresas, sonrisas tristezas, y más. Gracias por su valiosa compañía.

ÍNDICE

I.	ÍNDICE DE TABLAS.....	1
I.	ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	2
II.	ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	4
III.	ABREVIATURAS.....	5
IV.	RESUMEN.....	7
	4.1 Justificación.....	9
	4.2 Objetivos.....	9
	4.3. Hipótesis.....	9
V.	MARCO TEÓRICO.....	10
	5.1 Definición de cerveza.....	10
	5.2 Tipos de cerveza.....	10
	5.3 La industria de cerveza en México.....	12
	3.4 Materias primas para la elaboración de cerveza.....	13
	5.4.1 Malta.....	13
	5.4.2 Agua.....	15
	5.4.3 Lúpulo.....	16
	5.4.4 Levadura.....	18
	5.5 Proceso de elaboración de cerveza.....	21
	5.5.1 Molienda de la malta.....	22
	5.5.2 Sacarificación.....	22
	5.5.3 Obtención del mosto.....	26
	5.5.4 Filtración.....	28
	5.5.5 Ebullición del mosto.....	28
	5.5.6 Enfriamiento del mosto.....	29
	5.5.7 Fermentación.....	30

5.5.8 Maduración.....	32
5.5.9 Tratamiento post maduración.....	32
5.6 Metabolismo de la levadura.....	32
5.6.1 Metabolismo del carbono.....	33
5.6.2. Metabolismo del nitrógeno.....	35
5.6.3. Vitaminas.....	36
5.6.4. Iones inorgánicos.....	36
5.7 Cerveza de alta gravedad.....	39
5.7.1 Ventajas y desventajas de la elaboración de cerveza de alta gravedad.....	40
5.8 Compuestos congenéricos.....	41
5.8.1 Precursores de los compuestos congenéricos.....	42
5.8.2. Clasificación de los compuestos congenéricos.....	42
5.9 Microextracción en fase sólida (MEFS).....	49
5.9.1 Dispositivo para microextracción en fase sólida.....	49
5.9.2. Fibras para la extracción en MEFS.....	50
<u>5.9.2.1 Elección de la fibra.....</u>	<u>51</u>
5.9.3 Mecanismo del proceso de MEFS.....	52
5.9.4 Parámetros experimentales que afectan la eficiencia de la extracción.....	56
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
6.1 Aislamiento y propagación de <i>Saccharomyces pastorianus</i>	59
6.2 Cuantificación de almidón en la malta.....	59
6.3 Preparación de mostos.....	60
6.4 Fermentación.....	61
6.5. Determinación de pH.....	62
6.6 Determinación de Sólidos Solubles (°Brix).....	62
6.7 Determinación de azúcares: glucosa y maltosa.....	62

6.8	Determinación de proteínas solubles.....	63
6.9	Metodología de elección de las condiciones de extracción.....	63
6.10	Cuantificación de etanol y compuestos congenéricos.....	64
VII.	RESULTADOS.....	66
7.1	Malta	66
7.2	pH	66
7.4	Consumo de azúcares.	68
7.5	Porcentaje de etanol y densidad específica.....	70
7.6	Condiciones de extracción	71
7.6.1	Elección de la fibra.....	71
7.6.2	Comparación entre inyección directa y MEFS-EC utilizando fibra PDMS/DVB.....	72
7.6.3	Efecto de la temperatura en la MEFS-EC.....	73
7.6.4	Efecto del tiempo de extracción.....	74
7.6.5	Efecto de la concentración de sal.....	75
7.6	Congenéricos.....	76
VIII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	77
IX.	CONCLUSIONES.....	82
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	83
XI.	APÉNDICE.....	90
A)	Composición del símil de cerveza.....	90
B)	Tiempos de retención de los compuestos congenéricos.....	90
C)	Concentración de los compuestos congenéricos en ppm	92
D)	Cromatogramas.....	93
E)	Análisis de varianza de la comparación entre distintas fibras para MEFS-EC.....	96

I. ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Subtipos de cervezas y sus características.....	11
Tabla 2. Especificaciones típicas para dos tipos de maltas destinadas a la elaboración de cerveza.....	14
Tabla 3. Temperatura y pH óptimos de actividad de las principales enzimas involucradas durante la sacarificación.	26
Tabla 4. Composición típica del mosto.....	31
Tabla 5. Principales Alcoholes Superiores presentes en la cerveza y sus precursores.....	43
Tabla 6. Clasificación de los principales compuestos congenéricos.	48
Tabla 7. Fibras comerciales para su uso en MEFS.....	52
Tabla 8 Equivalencia entre °Brix , gravedad específica y °P	61
Tabla 9. Porcentajes de consumo de glucosa y maltosa en las fermentaciones. .	69
Tabla 10. Densidad específica, extracto y porcentaje de etanol.	70

II. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Principales productores de cerveza en el mundo.....	13
Figura 2. Tipos de maltas cerveceras.	14
Figura 3. Resinas en el lúpulo.	17
Figura 4. Principales aceites esenciales en el lúpulo	17
Figura 5. Estructura típica del lúpulo.	18
Figura 6. Estructura de la pared celular de la levadura.	19
Figura 7. Diagrama de elaboración de cerveza.....	21
Figura 8. Estructuras de las formas del almidón: a) amilosa y b) amilopectina	23
Figura 9a. Degradación enzimática de amilosa.....	24
Figura 9b. Degradación enzimática de la amilopectina	
Figura 10. Curvas de sacarificación.	28
Figura 11. Conversión de la glucosa a etanol en la levadura.	34
Figura 12. Rutas biocinéticas de la formación de alcoholes superiores y carbonilos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
Figura 13. Esquema de producción y degradación del diacetilo.	47
Figura 14. Dispositivo comercial para MEFS hecho por Supelco [<i>Supelco datasheef</i>].	50

Figura 15. Propiedades de fibras comerciales para MEFS. Fibras .	51
Figura 16. Proceso de extracción y desorción.	55
Figura 17. Cambios térmicos durante la extracción mediante un proceso de decocción.....	60
Figura 18. Montaje del dispositivo para MEFS-EC.....	65

III. ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Variación de los pH a lo largo de las fermentaciones.	66
Gráfica 2. Determinación del porcentaje en peso de los sólidos solubles.....	67
Gráfica 3. Consumo de azúcares a lo largo de la fermentación.....	68
Gráfica 4. Comparación de señales entre fibras para MEFS-EC.	71
Gráfica 5. Comparación entre Inyección directa y MEFS-EC utilizando fibra PDMS/DVB.	72
Gráfica 6. Comparación de temperaturas de extracción.	73
Gráfica 7. Comparación de tiempos de extracción.	74
Gráfica 8. Comparación de la eficiencia de extracción a diferentes concentraciones de NaCl.	75
Gráfica 9. Concentraciones de los compuestos congenéricos en las fermentaciones utilizando mostos F1 (15.67°P) , F2(20.67°P) y F3 (29.8°P).	76

IV. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
CAR/PDMS	Carboxeno Polidimetilsiloxano
CG	Cromatografía de Gases
Co A	Coenzima A
CW/DVB	Carbowax divinilbenceno
DVB	Divinilbenceno
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenceno Carboxeno Polidimetilsiloxano
EDTA	Etilendiamitotetraacético
EMP	Embden-Meyerhot-Parnas
F1	Fermentación a partir de mosto de 15.67° P
F2	Fermentación a partir de mosto de 20.67°P
F3	Fermentación a partir de mosto de 29.8°P
FID	Detector de ionización de flama
G	Gramos
H ⁺	Protones

HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)
K_{fs}	Coeficiente de reparto
Kg	Kilogramos
MEFS-EC	Microextracción en fase solida por espacio de cabeza
MEFS-ID	Microextracción en fase solida por inyección directa
Mg	Miligramos
mM	Mili molar
μm	Micrómetros
$^{\circ}\text{P}$	Grados Plato
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Potencial de hidrógeno
Ppm	Partes por millón
PPT	Pirofosfato de tiamina
TCA	Acido tricarbóxico
Un. Dext	Unidades de dextrinas.
UV	Ultra violeta

V. RESUMEN.

La producción de cerveza con mostos concentrados, o llamados también de alta gravedad, ha sido utilizada desde la década pasada por mostrar eficacia en el mejoramiento de la productividad y la competitividad de la industria cervecera. Este proceso da como resultado una fermentación de alto contenido en etanol, que posteriormente puede ser ajustado al porcentaje de etanol deseado (Dragone *et al.*, 2004; Houg, 1994; Santillan *et al.*, 1998; Tagores, 2003.) adicionado con ventajas económicas como son: mejoramiento en la capacidad de producción y la reducción de consumo energético (Dragone *et al.*, 2004), sin embargo, el uso de mostos concentrados también está asociado a problemas como son: disminución en la viabilidad de la levadura, fermentaciones lentas debido a los altos niveles de etanol, presión osmótica elevada por la cantidad de sólidos solubles, además, la incapacidad de reutilizar la levadura debido al descenso en el crecimiento y disminución de la actividad metabólica, afectando la estabilidad de la espuma de la cerveza (Pratt *et al.*, 2002), así como también la alteración de los compuestos congenéricos que modifican el perfil de sabor y aroma de la cerveza final.

En el presente trabajo se realizó una serie de fermentaciones utilizando mostos de alta gravedad provenientes de únicamente malta como sustrato, ajustados a 15.67°P, 20.67°P y 29.8°P. Las condiciones de fermentación fueron a una temperatura de 13-14 °C, por un periodo de 8 días, utilizando la levadura *Saccharomyces pastorianus*.

En el transcurso de las fermentaciones, se monitorearon parámetros como: pH, cantidad de sólidos solubles, consumo de azúcares, producción de etanol y concentración de compuestos congenéricos.

Para establecer las condiciones óptimas en la técnica de microextracción en fase sólida para la identificación y cuantificación de los productos congenéricos, se

evaluaron tres fibras: CW, PA y PDMS/DVB, así como diferentes temperaturas, tiempos de extracción, y porcentajes de sal con NaCl.

Por los resultados obtenidos se concluyó que al utilizar la levadura proveniente de la industria se logró obtener una cerveza verde de alto contenido de etanol (7.81% v/v) proveniente del mosto concentrado a 20.67°P.

La cuantificación de compuestos congenéricos fue realizada utilizando la técnica de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza, utilizando una fibra de polidimetilsiloxano- divinil benceno, a una temperatura de 60 ° C, durante 7 minutos y con una concentración de sal de 80% con NaCl. Con esta técnica se pudieron detectar altas concentraciones de distintos compuestos de tipo éster, por otro lado, también se detectaron altas concentraciones de alcoholes superiores, consecuencia del alto contenido de azúcares fermentables disponibles.

4.1 Justificación

En la industria cervecera resulta muy rentable obtener mostos de densidades superiores, por ende, obtener cervezas con alto contenido alcohólico, y al final del proceso diluir la cerveza a la concentración de etanol deseada. Esto implicaría la reducción de costos por energía y mejoramiento en la capacidad de producción.

4.2 Objetivos

Objetivo General

- Analizar los compuestos congenéricos producidos en la elaboración de cerveza a partir de mostos de malta de alta gravedad.

Objetivos específicos.

- Estudiar el efecto de la fermentación de *Saccharomyces pastorianus* a partir de mostos de alta gravedad
- Estudiar la relación del consumo de azúcares en la fermentación y el porcentaje de etanol obtenido con mostos de alta gravedad.
- Determinar las condiciones óptimas de extracción para la determinación de los compuestos congenéricos.

4.3. Hipótesis.

En la literatura se reporta que el uso de mostos de alta gravedad o llamados también concentrados, influye en el aumento del porcentaje de etanol y alcoholes superiores, responsables del sabor y olor de la cerveza, sin embargo, también se relaciona con la producción de compuestos que modifican el perfil de sabor como son acetato de etilo y diacetilo principalmente. Se espera que de una fermentación de alta gravedad se obtenga mayor cantidad de etanol y se vea disminuido los compuestos modificadores de sabor.

VI. MARCO TEÓRICO

5.1 Definición de cerveza.

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada, de bajo contenido alcohólico (3 a 6 % v/v) resultante de la fermentación con el uso de una levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y sometido a un proceso de cocción. (García *et al.*, 2003).

5.2 Tipos de cerveza

Antiguamente se había clasificado a la cerveza con respecto a la manera de migración de la levadura al final del proceso de fermentación, clasificándolas en levaduras de fermentación alta y levaduras de fermentación baja, sin embargo, no es la única razón para diferenciarlas. En general se ha clasificado a la cerveza de acuerdo a su composición, tipo de levadura y características de producción. Se conocen así, dos grandes grupos de cerveza, cervezas ale elaboradas con levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* y lager a partir del género *Saccharomyces pastorianus* (Hough, 1994).

Cerveza Ale. Hasta el año 1840 era el proceso más común en Europa, aún se encuentra en países como Inglaterra y el Norte de Europa. Se produce utilizando la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, fermentándola en un intervalo de temperatura entre 15-22°C. Estas cervezas se caracterizan por ser más aromáticas debido a un mayor contenido de compuestos volátiles, como alcoholes superiores, ésteres, aldehídos y cetonas.

Cerveza Lager. Representa más del 90% de la producción mundial, se produce utilizando levadura *Saccharomyces pastorianus*. La fermentación ocurre en un

intervalo de temperaturas entre 8-15°C, se caracteriza por ser una cerveza menos aromática pero mayor cuerpo.

En cada uno de estos tipos de cerveza existen subtipos con diferentes características.

Tabla 1. Subtipos de cervezas y sus características

Lager	Ale
<p>Pilsener, Hell o Pale: Clara (dorado ambar), muy aromatizada con lúpulo (amarga), poco cuerpo, dulces o secas, buena carbonatación.</p> <p>Dortmunder: Menos lupulada, más ligera y seca.</p> <p>Dark, Munich o Dunkel: Oscura, sabor a malta, ligeramente dulce, amargo moderado, mucho cuerpo.</p> <p>Märzen o Bock: Oscura, sabor intenso y mucho cuerpo, alto nivel de lúpulo (amarga), alto contenido alcohólico.</p> <p>Doppelbock: Con más cuerpo y más alcohol, muy aromática.</p> <p>Eisbock: Destilada por congelamiento: muchísimo cuerpo y muy alto contenido alcohólico (hasta 18%).</p> <p>Viena: Semiobscura, ligera (poco cuerpo), sabor a malta y ligeramente dulce.</p>	<p>Pale ale: Clara (cobre), muy lupulada (muy amarga), mucho cuerpo, seca.</p> <p>Bitter: Clara (poco más oscura que Pale ale), más amarga, mucho cuerpo, seca, afrutada.</p> <p>Brown ale: Oscura, poco lúpulo, dulce, afrutada.</p> <p>Mild ale: Semioscura, dulce, amarga, ligera, moderadamente amarga, bajo contenido alcohólico (3.5%), afrutada.</p> <p>Indian Pale Ale, Strong Ale: Mayor contenido alcohólico y fuertemente lupulada,</p> <p>Stout o Porter: Muy oscura (negra), mucho cuerpo, muy amargas, dulces o secas, sabores tostados, afrutada, mucha espuma consistente.</p> <p>Trappist: Producida solo en Bélgica operadas por monjes trappistes con certificación de autenticidad. Azúcar como adjunto, muy alcohólica (hasta 12.5%), mucho sabor, mucho cuerpo, maduras en botella, color cobrizo oscuro, ligeramente turbia, muy amarga, ácida, afrutada.</p> <p>Altbier : Semiobscura, amarga, afrutada, cuerpo y contenido de alcohol moderados.</p> <p>Kölsch, Colonial: Clara a semiobscura, cuerpo y contenido de alcohol moderados, amargo moderado, afrutada.</p>

(Tomada de García, *et al.* 2003)



5.3 La industria de cerveza en México

La industria cervecera mexicana está conformada por un conjunto de empresas y actividades que se dedican a la elaboración de cerveza. En la actualidad, México ha llegado a posicionarse como uno de los más importantes productores de cerveza a nivel internacional, además, a nivel interno su consumo se ha visto incrementado (Rojas *et al.*, 2010).

De acuerdo a datos obtenidos de la Cámara Nacional de Industria de la Cerveza y de la Malta CANICERM, esta industria involucra gran capital, alto financiamiento, una fuerte inversión inicial y el requerimiento de un elevado grado de tecnología.

El Mercado de la cerveza en México se encuentra controlado por dos principales empresas, Grupo Modelo y Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, esta última filial de Fomento Económico Mexicano (FEMSA), empresa líder de bebidas carbonatadas a nivel internacional (Rojas *et al.*, 2010), con participaciones de 63% y 32%, respectivamente, el 5% restante se reparte en marcas de importación, de acuerdo con datos de CANICERM (Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y de la Malta www.canicerm.org.mx).

Hasta el año 2009, México se había constituido como el sexto productor de cerveza en el mundo y segundo a nivel Latinoamérica, solo superado por Brasil. México produce el 4.5% de la producción de cerveza en el mundo, quedando por debajo del 22.6% que representa la producción de China, quien en los últimos años ha sido el mayor productor de cerveza.

El volumen nacional producido en los últimos años, coloca a México como el séptimo país productor de cerveza del mundo, registrando un mayor nivel de producción de cerveza con 7.59 millones de hectolitros, que representa el 26.1 % del total de la producción.

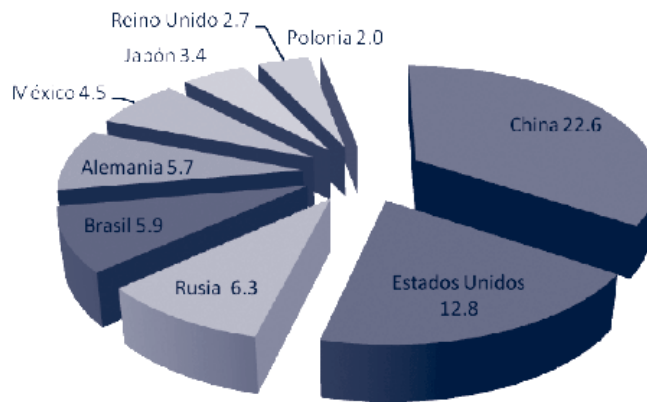


Figura 1 Principales productores de cerveza en el mundo.

3.4 Materias primas para la elaboración de cerveza.

5.4.1 Malta.

Se conoce como malta al grano de cereal, comúnmente cebada, que ha sido sometido a un proceso denominado malteo, en el cual, el grano es germinado de una manera controlada a condiciones adecuadas, con el objetivo de generar enzimas amilolíticas, que hidrolizan el almidón de la malta y los adjuntos, también, se producen otras enzimas importantes para la elaboración de cerveza como: proteasas, β -glucanasas y pentosanasas.

El propósito de la malta en el proceso de elaboración de cerveza es proporcionar el extracto, que es la fuente de carbohidratos durante la fermentación de la cerveza y la formación de un lecho filtrante proporcionado por la cascarilla con el propósito de clarificar el mosto (Hough, 1994).

La composición del mosto dulce es totalmente dependiente del tipo de maceración y de las materias primas empleadas, sin embargo, el contenido de carbohidratos tienen un perfil similar de carbohidratos independientemente de los procesos de molienda y maceración (Hough, 1994).

Tabla 2. Especificaciones típicas para dos tipos de maltas destinadas a la elaboración de cerveza.

	Malta proveniente de cebada de seis hileras	Malta proveniente de cebada de dos hileras
Agua %	4.0	3.5
Extracto (% en peso seco)	77.0	79.0
Nitrógeno total (%)	2.1	1.75
Actividad de α amilasas (Un. Dextr.)	40.0	35.0
Poder diastásico (grados Lintner)	140	75

(Tomada y modificada de Hough, 1994)



Figura 2. Tipos de maltas cerveceras.

El nivel de tostado en la malta, genera una diversa gama de color y confiere diferentes propiedades funcionales.(Hough, 1994).

5.4.2 Agua.

El agua es el ingrediente en mayor cantidad en la cerveza; forma parte del 95% de su peso (Hough, 1994). Anteriormente el agua se extraía de corrientes, ríos, pozos o manantiales, y su composición química natural determinaba las características finales de la cerveza (Hornsey, 2003). En la actualidad, conocimientos adquiridos sobre la influencia de las sales en la fabricación y métodos de corrección el agua permite adaptarla a cada tipo de cerveza (Montanari *et al.*, 2009).

La dureza del agua es un aspecto importante para la elaboración de cerveza, particularmente durante la sacarificación. Se ha clasificado a la dureza del agua en dos categorías: dureza permanente y la dureza temporal, la primera es causada por CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , MgO y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, mientras que, los bicarbonatos de calcio y magnesio son responsables de la dureza temporal. La dureza temporal es uno de los principales problemas en el agua cervecera, debido a la disociación de bicarbonatos, ya que aumenta el pH durante la sacarificación (Hornsey, 2003).

Una de las formas más comunes del tratamiento del agua, se basa en la adición de un ácido (frecuentemente sulfúrico) para eliminar la dureza temporal, acompañada de yeso para mantener la dureza permanente (Hornsey, 2003). Sin embargo, la dureza temporal puede eliminarse parcialmente por ebullición, especialmente si el agua en ebullición es aireada; esto ayuda a eliminar el dióxido de carbono y precipita carbonato de calcio. Otro método tradicional consiste en añadir cal de manera que precipite al carbonato (Hough, 1994).

Cuando se hierve el mosto, el bicarbonato libera dióxido de carbono tomando protones (H^+), este consumo de iones hidrógeno, reduce la acidez, por lo tanto, eleva el pH (Hough, 1994). El pH durante la sacarificación es alrededor de 5.4,

importante ya que es el óptimo para la actividad amilolítica y produce por consiguiente niveles máximos de degradación de almidón (Hornsey, 2003).

5.4.3 Lúpulo.

El lúpulo (*Humulus lupulus.*) perteneciente botánicamente a la familia *Cannabaceae* (Hornsey, 2003), se emplea para aromatizar la cerveza y obtener el característico sabor amargo de la bebida. Pero también funciona como un conservador inhibiendo microorganismos patógenos e indeseables (García *et al.*, 2003).

El lúpulo es una planta dioica, por lo que las flores masculinas y femeninas se producen en distintas plantas. Desde el punto de vista cervecero, la parte útil de la planta es el cono femenino (o estróbilo) que contienen aceites esenciales y resinas. Las flores femeninas en la base de las escamas contienen la lupulina, una sustancia amarillenta y amarga que contiene las resinas, aceites esenciales y taninos; los primeros dos importantes en la industria cervecera (Hornsey, 2003).

En el lúpulo seco el 15% lo constituyen las resinas, siendo las importantes las que pertenecen a la fracción de α - ácidos: humulona, cohumulona, adhumulona, posthumulona y prehumulona; y de la fracción de β -ácidos: lupulona, colupulona, adlupulona y prelupulona. Los aceites esenciales se encuentran en una proporción de alrededor del 0.5% del lúpulo seco, entre ellos hidrocarburos terpénicos y otros compuestos como: mirceno, humuleno ferneseno, cariofileno.

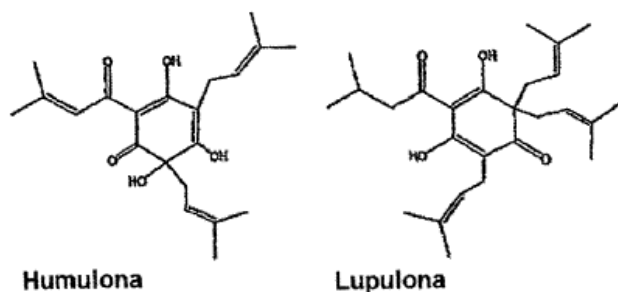


Figura 3. Resinas en el lúpulo.

α -ácidos o humulonas y β -ácidos o lupulonas. (Tomada de Hornsey, 2003).

En las resinas los α -ácidos o humulonas, constituyen el principal componente que da amargor a la cerveza, durante la cocción del lúpulo en el mosto éstas se isomerizan; los compuestos formados llamados iso α -ácidos son mucho más amargos y más solubles que los α -ácidos. Por otro lado, los β -ácidos durante la ebullición tienden a oxidarse, generando otros compuestos amargos (Hough, 1994).

Los aceites esenciales del lúpulo son mezclas complejas, entre las cuales se encuentran hidrocarburos terpenoides, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes. Estos influyen tanto en sabor como aroma en la cerveza.

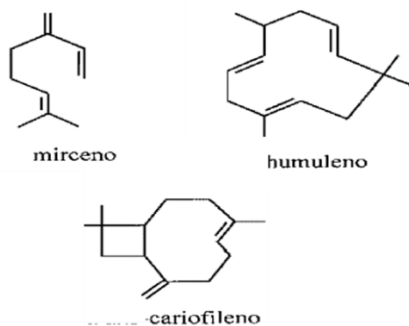


Figura 4. Principales aceites esenciales. Distribuidos y cuantitativamente abundantes en el lúpulo. (Tomada y modificada de Baxter, 2004).



Figura 5. Estructura típica del lúpulo.

5.4.4 Levadura.

Las levaduras ampliamente usadas en la industria cervecera pertenecen al género *Saccharomyces*, del que se conocen más de 30 especies (Hornsey, 2003) *Saccharomyces spp.*, se encuentran dentro de la familia *Saccharomycetaceae* y se distinguen de los restantes por su característica morfológica y fisiológica. Se reproducen vegetativamente por gemación, bajo determinadas condiciones (Hough, 1994). Cada célula plenamente desarrollada tiene entre 8-14 μm de diámetro, está rodeada por una pared constituida de β -glucanos y manoproteínas (α -mananos) y representa el 30% del peso seco, es metabólicamente activa, conteniendo enzimas que son capaces de permitir la transferencia macromolecular al interior de la célula (Hornsey, 2003). Su estructura (Figura 6) se compone por tres partes bien diferenciadas: la pared externa, que está compuesta por las manoproteínas; la pared interna, compuesta por los glucanos fibrosos asociados a la quitina y es de carácter rígido; y por último, el espacio periplásmico situado entre la pared y la membrana plasmática donde se localizan las enzimas necesarias para la célula, destacando entre la más importante para el crecimiento de la levadura, la invertasa capaz de desdoblar la sacarosa en glucosa y fructosa y también algunas β -glucanasas (Tornai *et al.*, 2000).

La constitución de la pared celular es importante debido a que se conoce que las levaduras llamadas de fermentación alta están cubiertas por pequeñas protuberancias morfológicas (manoproteínas) que les confieren una aspereza permitiendo que las células asciendan a la superficie durante la fermentación; además, la pared celular posee una carga negativa y tiene hidrofobicidad. La carga negativa se atribuye a las cadenas de fosfato localizadas en la pared externa de manoproteínas (Hornsey, 2003).

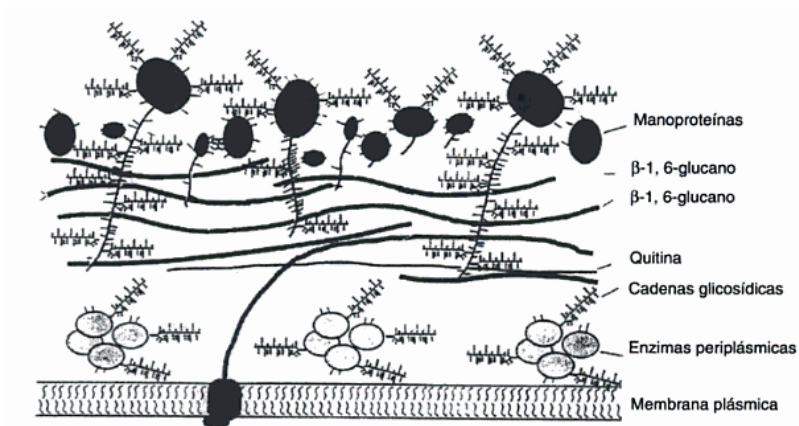


Figura 6. Estructura de la pared celular de la levadura. (Tomada de Togores, 2003).

Las levaduras utilizadas en la industria cervecera inicialmente se clasificaron de acuerdo a su capacidad de floculación, las levaduras para cerveza tipo ale tendían a aglomerarse en la parte superior del tanque de fermentación, llamadas levaduras de fermentación alta, estas se relacionaron estrechamente con la especie *S.cerevisiae*. Por otra parte las levaduras que durante la fermentación floculaban al fondo del tanque de fermentación se relacionaron con la especie *S. pastorianus* (Hellborg *et al.*, 2009).

La pared celular es permeada por algunas enzimas segregadas por la levadura; la más importante, la invertasa, que hidroliza la sacarosa antes de que penetre en la célula; entre ellos se encuentra también la fosfatasa. Por ejemplo, *Saccharomyces*

pastorianus segrega melibiasa, pero *Saccharomyces cerevisiae* no, por otro lado, algunas levaduras segregan cantidades apreciables de proteasas, sin embargo, las del genero *Saccharomyces* tienen limitada esta actividad. (Hough, 1994). Estas diferencias, aunadas a la morfología celular, la fisiología y tecnología de fermentación de cada levadura, están muy delimitadas, sin embargo, no son lo suficientemente constantes y pueden variar en mayor o menor medida. (Hellborg *et al.*, 2009; Vidgren *et al.*, 2010).

5.5 Proceso de elaboración de cerveza.

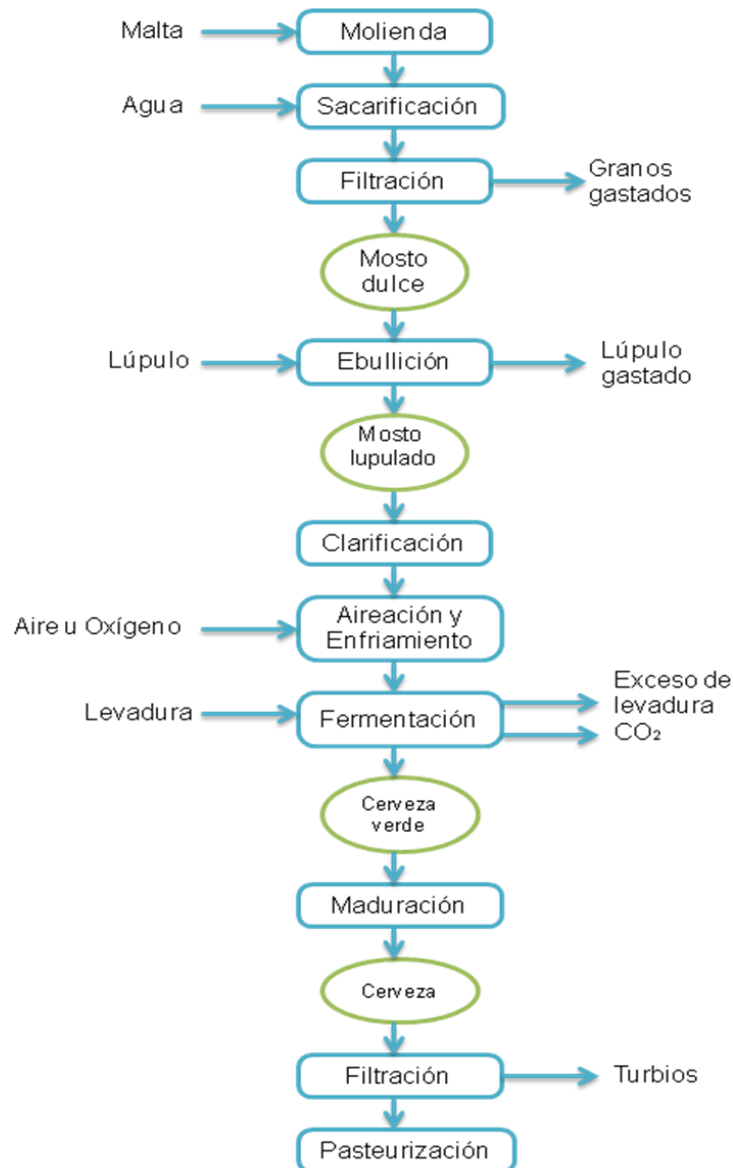


Figura 7. Diagrama de elaboración de cerveza.

Fuente. (Hornsey, 2003; Hough, 1994).

5.5.1 Molienda de la malta.

La molienda de la malta tiene como objetivo triturarla, de esta manera se facilita el contacto de las enzimas y los sustratos presentes en ella (Hernández, 2003). Es necesario que la cascarilla permanezca tan entera como sea posible y que, en cambio, el endospermo se quiebre hasta un tamaño de partícula que permita la fácil liberación del extracto. Si se desintegra demasiado, la cascarilla no puede formar un filtro suficientemente eficaz y permeable durante la recuperación del mosto a partir de la masa. Por otra parte, la cascarilla rota libera más sustancias tánicas que resultan poco deseables. En cuanto a la trituración del endospermo, es preciso que las partículas del mismo se encuentren bien hidratadas y liberen fácilmente las enzimas y otros constituyentes celulares para que puedan ser degradados rápidamente. Serían ideales partículas de tamaño muy reducido pero éstas tienden a apelmazarse demasiado y a formar un lecho impermeable, que impediría la posterior filtración (Hough, 1994).

5.5.2 Sacarificación.

La sacarificación por definición, es el proceso en el que la malta molida, o sémola, se mezcla con agua agitando lentamente, para producir un extracto fácilmente fermentable que permita el crecimiento de la levadura (Hornsey, 2003). Las enzimas en la malta, degradan los constituyentes de ésta, principalmente proteínas y carbohidratos a formas solubles para formar el extracto denominado *mosto* (Hernández, 2003).

La mezcla de malta y agua es sometida a un calentamiento gradual en un tanque de maceración principal. En el caso donde se desea utilizar adjuntos sólidos, estos se tratan en un tanque aparte con una porción de malta de cebada para proporcionar las enzimas capaces de hidrolizar el almidón de los adjuntos; este tanque alternativo se llamado macerador de adjuntos.

La sacarificación implica una combinación de reacciones enzimáticas donde se destacan principalmente cuatro.

- **Degradación del almidón.** El almidón está constituido por dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa, molécula esencialmente lineal, contiene de 1000 a 4000 unidades de glucosa unidas mediante un enlace α 1,4, y amilopectina, molécula mucho más grande, unidas por enlaces α 1,4 y ramificada en forma de arbusto mediante enlaces α 1,6 (Flint, 1996; Hornsey, 2003) (Figura 8). El almidón es hidrolizado por acción de las enzimas α -amilasa y β -amilasa, presentes en la malta.

La α -amilasa es una endoenzima que ataca al azar, hidrolizando cualquier enlace α 1, 4, excepto los cercanos a un punto de ramificación y los situados en las proximidades de los extremos de la molécula, actuando sobre la amilosa se obtienen moléculas de diversas longitudes y de cadena lineal; cuando ataca la molécula de amilopectina produce moléculas lineales y ramificadas, proporciona nuevos extremos, donde la β -amilasa puede actuar. La β -amilasa, exoenzima, ataca las moléculas de almidón en sus extremos no reductores obteniendo maltosa (Hough, 1994).

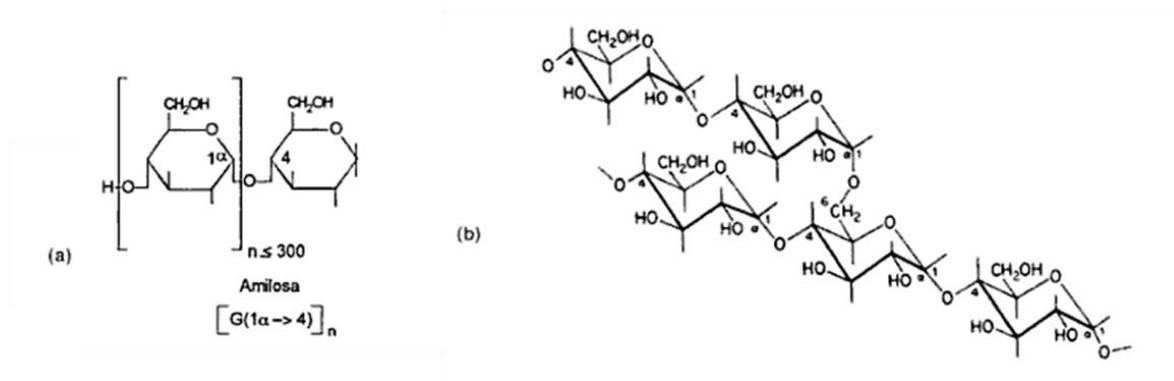


Figura 8. Estructuras de las formas del almidón: a) amilosa y b) amilopectina (Tomada y modificada de Badui, 1999).

Existen otras enzimas de importancia cervecera que actúan sobre subproductos de las amilasas. Dextrinasas o también llamadas dextrinas límite, actúan sobre los enlaces α 1,6 desramificando la molécula de almidón, y α -glucosidasas que hidrolizan el enlace α 1 \rightarrow 4 de maltosa y otros oligosacáridos liberando glucosa.

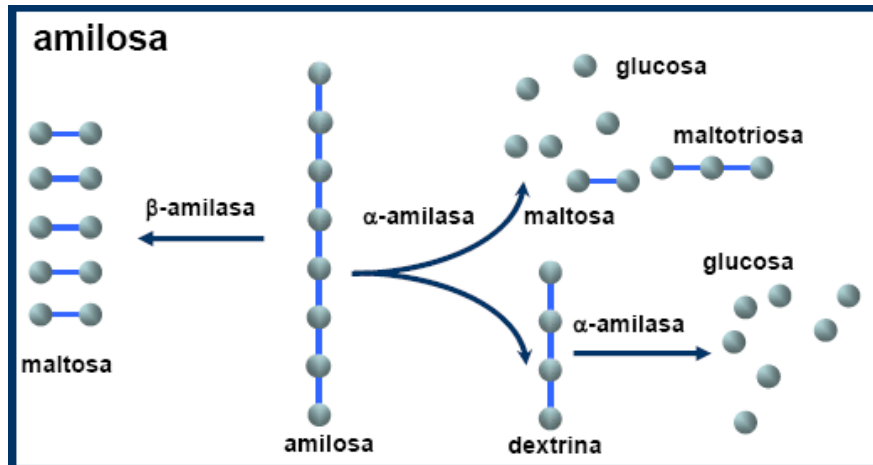


Figura 9a. Degradación enzimática de amilosa.

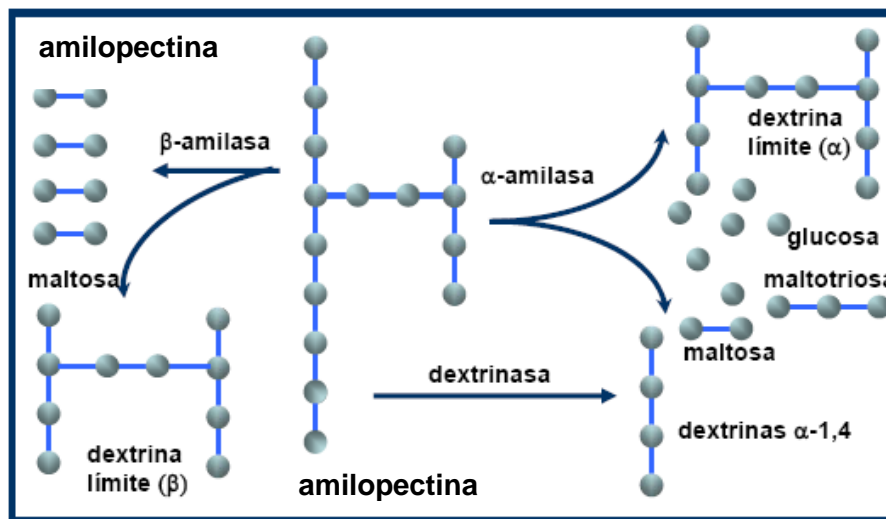


Figura 9b. Degradación enzimática de amilopectina.

- **Degradación de las proteínas.** Las proteasas hidrolizan a las proteínas en péptidos y aminoácidos libres, que son nutrientes para la levadura durante la fermentación, contribuyen al sabor, por ser precursores de algunos compuestos congénicos y a la formación de la estabilidad de la espuma (Hernández, 2003). La temperatura óptima para que se lleve a cabo la proteólisis es de 50°C.
- **Degradación de β -glucanos y pentosanos.** La pared celular del endospermo de la malta consta fundamentalmente de compuestos insoluble en agua caliente. Algunas de las moléculas de la pared celular son polímeros de pentosas, llamados pentosanós; otros son polímeros de glucosa o glucanos y algunas mezclas de pentosa y glucosa. Los β -glucanos, de importancia en la fabricación de cerveza, a medida que van siendo hidrolizados durante la sacarificación, van generando polímeros de menor tamaño que son solubles en agua y el mosto caliente que más tarde serán solubles en mosto frío. Las glucanasas son endoenzimas, como la celulasa, que ataca los enlaces β 1,4; y laminarinasa que ataca enlaces β 1,3; o exoenzimas, que separan unidades de glucosa. Es importante la degradación de los glucanos y pentosanós para disminuir la viscosidad del mosto, que facilitará la filtración. (Hough, 1994).

La proteólisis, hidrólisis del almidón, y lípidos no son independientes. La degradación del almidón se ve facilitada por una solubilización parcial de las proteínas, por la movilización de los lípidos y por la degradación de los β glucanos.

Tabla 3. Temperatura y pH óptimos de actividad de las principales enzimas involucradas durante la sacarificación.

		Temperatura (°C)	pH
Amilasas	Actividad de α -amilasa	69-72	5.5
	Actividad de β -amilasa	60-65	5.2
Proteasas		50-55	5.3-5.7
Endo β Glucanasas		40-50	4.5-5.0
Pentosanasas		45-60	No reportado

Valores tomados de: (Hough, 1994.)

5.5.3 Obtención del mosto.

Para realizar la sacarificación, en la industria se utilizan las llamadas curvas de sacarificación, que son diseñadas considerando básicamente las temperaturas y los tiempos a los que debe ser sometida la malta.

Existen diferentes métodos de obtención del mosto, en todos los casos la papilla o masa debe ser calentada a diferentes temperaturas por tiempos determinados.

- **Infusión:** Es un sistema comúnmente asociado con la producción de cervezas tipo ale, implica la mezcla con agua caliente, a una temperatura alrededor de 63 a 65°C durante un periodo aproximado de 30 minutos que puede extenderse hasta 90 min. Se suministra más agua caliente con la finalidad de extraer casi todo el mosto dulce del grano gastado a una temperatura de 78 a 80°C. Esto requiere sólo de una sacarificación, teniendo como ventaja una sola operación y en consecuencia un bajo capital con respecto al consumo de energía. (Pavslar *et al.*, 2009).

- Decocción. Este sistema es tradicional para cervezas tipo lager (Figura 10). Se inicia con la mezcla con agua a una temperatura de entre 35 a 40°C después una porción de la mezcla (un cuarto) se hierve. Se regresa a la inicial, la temperatura incrementa a 50°C, este proceso se repite hasta alcanzar una temperatura final de 75°C, esta secuencia de cambios de temperatura permite que en distintos momentos predominen condiciones óptimas para la acción de las enzimas (Hough, 1994).

- Doble extracción. El sistema americano denominado doble extracción utiliza calderas de crudos, las maltas americanas suelen estar bien desagregadas y poseer una elevada cantidad de enzimas, por ello suelen utilizarse cantidades considerables de cereales como adjuntos para aprovechar la gran actividad enzimática. La cocción de los adjuntos, junto con un poco de malta, se realizan en la caldera de crudos, la temperatura se eleva inicialmente a 65°C, las enzimas de la malta reducen la viscosidad del mosto, alternamente, la proporción principal de la malta se calienta primero a 45°C, facilitando la actividad proteolítica y en menor cuantía la amilolítica; cuando se mezcla con la caldera de crudos, la temperatura asciende, lo que favorece la degradación del almidón, tanto de la malta como de los adjuntos. (Hough, 1994).

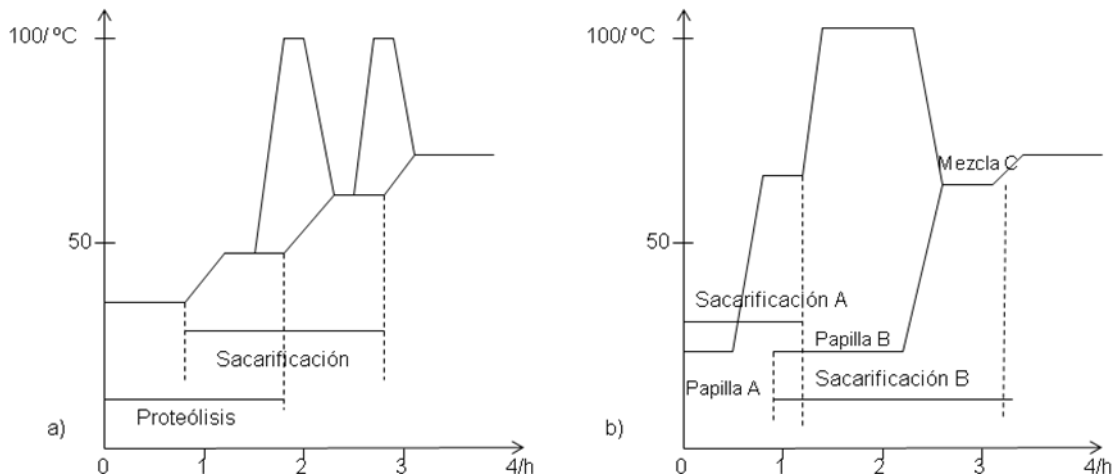


Figura 10. Curvas de sacarificación. a) Cambios térmicos durante la sacarificación por decocción. b) Cambios de temperatura durante una operación del sistema de doble extracción. (Tomada de: Pavslar, 2009).

5.5.4 Filtración

Una vez concluida la sacarificación, el producto se filtra separando el líquido o mosto dulce del bagazo. En la industria se utiliza un equipo clarificador llamado *Lauter tun*, el cual es un recipiente cilíndrico con una perforación en el fondo en la que se deposita el bagazo y forma una capa filtrante natural para separar el mosto; que se obtiene un líquido claro (Hernández, 2003).

5.5.5 Ebullición del mosto

El mosto dulce es sometido a ebullición donde es adicionado el lúpulo; se mantiene la temperatura de ebullición por un periodo establecido.

Entre las funciones que cumple esta operación son:

- a) Asegurar la total disolución e isomerización de los α - ácidos o humulonas y la oxidación de los β - ácidos o lupulonas. Éstos compuestos aportan el

sabor amargo. Los aceites esenciales se oxidan y aceleran la oxidación de las resinas

- b) Coagulación de las proteínas y taninos presentes en el mosto. Durante la maceración, parte de las proteínas se solubilizan en el mosto y en presencia del calor precipitan por desnaturalización.
- c) Inactivar toda actividad enzimática derivada de la malta. Es indeseable cualquier actividad enzimática posterior a esta etapa, debido a que puede modificar las características obtenidas. El calor inactiva las enzimas presentes.
- d) Concentrar el mosto. Cuando el agua se evapora, se consigue alcanzar las concentraciones necesarias de solutos.
- e) Esterilización del mosto. A estas temperaturas, se disminuye notablemente la carga microbiana que puedan causar deterioro durante el proceso.
- f) Formación de algunas sustancias responsables del aroma y color de la cerveza. Estos se producen por la reacción de los azúcares reductores con los aminoácidos presentes, llamadas reacciones de Maillard y reacciones de caramelización.

5.5.6 Enfriamiento del mosto.

El mosto en esta etapa se suele llamar mosto lupulado. Después de la ebullición debe enfriarse, debido a que se forma un precipitado que es insoluble y consta de proteínas y polifenoles (Hornsey, 2003). Otra razón del enfriamiento es llegar a la temperatura de fermentación, dependiendo del tipo de cerveza que se va a realizar: para cervezas tipo lager el mosto se enfría entre 10-15 °C y para cervezas tipo ale se requiere una temperatura entre 16-20 °C.

5.5.7 Fermentación.

La fermentación es el proceso mediante el cual se convierten los carbohidratos fermentables en etanol, dióxido de carbono y muchos otros subproductos por acción de la levadura. Estos subproductos, llamados también congenéricos, tienen un efecto considerable en el sabor, aroma y otras propiedades que caracterizan el estilo de cada cerveza (Goldammer, 2008).

La fermentación inicia al momento de inocular el mosto lupulado; tradicionalmente, las cervezas tipo ale se fermentan con *S. cerevisiae*, la inoculación se realiza a 15 °C y la fermentación se lleva a cabo en un rango de temperatura de entre 15-20 °C durante 2-3 días. Por otro lado las cervezas lager son inoculadas con *S.pastorianus*, éstas son fermentadas a bajas temperaturas, entre 7-14 °C.

La composición típica del mosto (Tabla 4.) contiene carbohidratos asimilables, aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, sales minerales y vitaminas de importancia para el crecimiento de la levadura para la producción de etanol.

Tabla 4. Composición típica del mosto.

Sustancia	Cantidad (g/L)	%Composición de azúcares presentes
Fructosa	2.1	1-2
Sacarosa	2.3	1-2
Glucosa	9.1	10-15
Maltotriosa	12.8	15-20
Maltosa	52.4	50-60
Carbohidratos no fermentables	23.9	20-30
Nitrógeno total	0.8	-
Aminoácidos totales	1.65	-

Tomada y modificada de: Hornsey, 2003 y Hough, 1994.

La tasa de inoculación normal es del orden de 0.45 kg de levadura prensada por barril de mosto, o bien 0.3 kg/hl. Si la inoculación es insuficiente, se produce una fermentación inicial lenta, mientras que el exceso (el doble de lo normal) crea una demanda por los nutrientes que resulta en la disminución del crecimiento de las células y un aumento final del nivel de ciertos ésteres como es el acetaldehído (Hornsey, 2003).

5.5.8 Maduración.

La maduración de la cerveza implica una segunda fermentación por cantidades pequeñas de levadura. Esta segunda fermentación se produce a una tasa reducida a bajas temperaturas, que también favorecen la clarificación de la cerveza debido a la precipitación de proteínas y polifenoles principalmente. Para la “lagerización”, típicamente llamada así al proceso de la cerveza lager después de la fermentación, se deja reposar hasta dos semanas (Dietvorst, 2006).

5.5.9 Tratamiento post maduración.

Posteriormente de la maduración, donde se produce la precipitación de algunas proteínas y levaduras, la cerveza suele someterse a un proceso de filtración para obtener la cerveza madura, que después puede ser embotellada y finalmente darle un tratamiento térmico (pasteurización) para aumentar la vida de anaquel.

5.6 Metabolismo de la levadura.

Para que una levadura cervecera inicie su proceso de fermentación, es necesario una fuente de carbono (azúcares fermentables), una fuente de nitrógeno, vitaminas como factores de crecimiento, algunos iones inorgánicos y oxígeno disuelto en pequeñas cantidades, especialmente en las primeras etapas de la fermentación y agua.

5.6.1 Metabolismo del carbono.

El mosto es la fuente de carbono, donde los principales azúcares son: maltosa, dextrinas, maltotriosas, glucosa y fructosa (tabla 4), algunos son metabolizados por la célula de manera intacta como es el caso de la glucosa y fructosa. La sacarosa es hidrolizada fuera de la célula por medio de transportadores específicos (sección 3.4.4), otros como la maltosa y maltotriosa son transportados activamente a través de la membrana e hidrolizados en el citosol de la célula. Las dextrinas por su parte y otros productos de degradación mayores no son metabolizados (Hornsey, 2003).

Durante el crecimiento se sintetizan enzimas que permiten a la levadura utilizar una amplia variedad de constituyentes del mosto. Por ejemplo, en la fase de latencia, se sintetiza una permeasa de maltosa y se produce simultáneamente una maltasa (glucosidasa) que permite que la maltosa sea hidrolizada a glucosa.

Para la captación de maltotriosa, también es necesaria una permeasa. La producción de estas permeasas, es inhibida por bajos niveles de glucosa y fructuosa, ejemplo de una represión catabólica. La producción de permeasas de maltotriosa, también es inhibida por la presencia de maltosa.

Durante la fermentación alcohólica, los azúcares del mosto, se transforman en etanol y dióxido de carbono en condiciones anaeróbicas, sin embargo, pequeñas cantidades de oxígeno son necesarias para el crecimiento de la levadura en la fase inicial de la fermentación, principalmente para la formación de la membrana (Ferreira, 2009).

Desde el punto de vista bioquímico, el metabolismo inicia en la misma ruta de degradación de la glucosa, siguiendo la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). El ácido pirúvico es sintetizado a partir de glucosa, en condiciones anaeróbica, produciendo etanol y dióxido de carbono y solo pequeñas cantidades

son transformados en acetil coenzima A, importante en el metabolismo celular que alimenta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Hough, 1994).

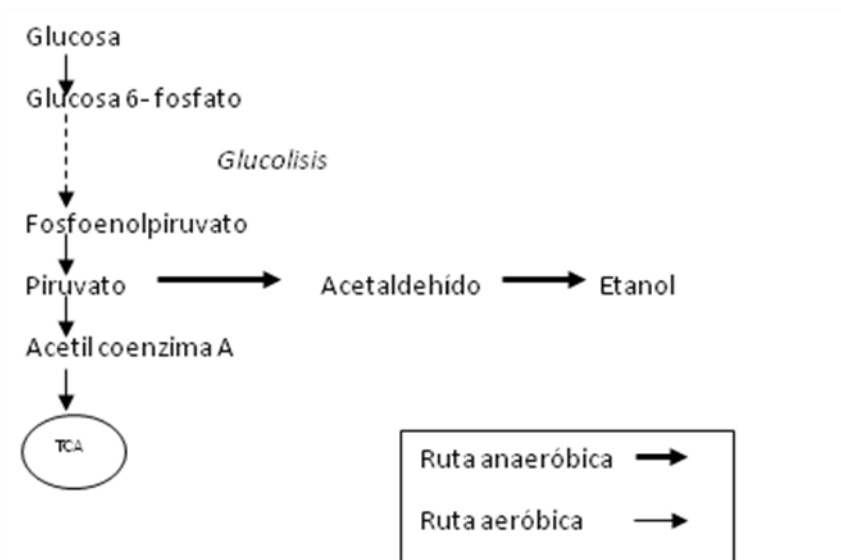


Figura 11. Conversión de la glucosa a etanol en la levadura. La ruta catabólica implica dos rutas importantes, la aeróbica que involucra el crecimiento celular y formación de estructuras importantes en la levadura y la anaeróbica donde involucra la producción principalmente de etanol y CO₂ en ausencia de oxígeno. (Tomada de Ferreira, 2009).

5.6.2. Metabolismo del nitrógeno.

Debido a que las levaduras cerveceras no pueden asimilar el nitrógeno elemental, ni los iones nitrato, la fuente principal para el desarrollo de constituyentes celulares esenciales es a partir de los aminoácidos, de los di y tripéptidos del mosto provenientes de la malta (Hornsey, 2003). La levadura metaboliza cada uno de los aminoácidos en diferentes rutas metabólicas, independientemente de las condiciones de fermentación (Fontana *et al.*, 2009). Los aminoácidos son captados y utilizados de acuerdo a la presencia de enzimas de transferencia en la membrana, principalmente transaminasas.

Un mosto de malta en su totalidad cuenta con 19 aminoácidos que pueden clasificarse en cuatro principales grupos de acuerdo a su velocidad de absorción por la levadura durante la fermentación.

- a) De absorción rápida: ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina, glutamina, serina, treonina, lisina, arginina.
- b) De absorción intermedia: valina, metionina, leucina, isoleucina, histidina.
- c) De absorción lenta: glicina, fenilalanina, tirosina, triptófano, alanina.
- d) De absorción nula o escasa: prolina (el aminoácido más abundante en el mosto).

Los aminoácidos de absorción rápida son asimilados en la primera etapa de la fermentación, aproximadamente las primeras 20 horas; los de absorción lenta son utilizados por la levadura después de haber sido consumidos los aminoácidos de absorción rápida. El orden de la asimilación de los aminoácidos no es afectado por la concentración de un aminoácido en específico, pero parece estar involucrada la naturaleza y características específicas de los aminoácidos involucrados. (Fontana *et al.*, 2009).

En la fermentación, el 50 % de los aminoácidos presentes en el mosto son consumidos directamente para formar parte de proteínas; de éstos, aproximadamente un tercio es excretado nuevamente en el caldo de fermentación.

La prolina por su parte es un aminoácido que no tiene un grupo amino libre y por lo tanto no toma parte directamente en la reacción de trasaminación que es causa de la formación de los compuestos de sabor en la cerveza.

5.6.3. Vitaminas

Las vitaminas presentes en el mosto (biotina, tiamina, ácido nicotínico, rivo flavina, pantotenato cálcico, inositol y piridoxina) desempeñan un papel estructural, al participar en la síntesis de la membrana (fosfolípidos); todas con excepción del inositol desempeñan una función catalítica como parte de alguna coenzima en el metabolismo (Hornsey, 2003).

5.6.4. Iones inorgánicos

Por otro lado los iones inorgánicos en mayor o menor medida son importantes en la fermentación, influyendo en el crecimiento de la levadura y de importante influencia en el metabolismo como co-factores de diferentes enzimas (Montanari *et al.*, 2009; Pohl, 2009).

Azufre: Los iones sulfato son captados vía un proceso activo y generalmente se realiza al comenzar la fermentación antes de que los aminoácidos azufrados alcancen una concentración suficiente. La metionina es la que se utiliza más fácilmente, se absorbe dentro de las primeras horas de fermentación. Para que la fermentación se lleve a cabo satisfactoriamente es importante que la concentración de azufre en forma orgánica sea de 40-50 mg/L. Dentro de las células de levaduras los compuestos con mayor cantidad de azufre son la coenzima A, el ácido lipóico, el pirofosfato de tiamina (PPT) y el glutatión.

Elementos metálicos: Juegan un papel importante durante la fermentación y se agrupan en 3 clases: *Macroelementos (0.1-1mM)*: K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Mn^{2+} , *Microelementos (0.1-100mM)*: Co^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Mo^{2+} , Ni^{2+} y V^{2+} e *Inhibidores (10-100mM)*: Ag^+ , As^{3+} , Hg^+ , Li^+ , Os^{2+} , Pd^{2+} , Se^{4+} y Te^{4+} .

Durante la fermentación las concentraciones más significativas son las de Mg^{2+} , Zn^{2+} , K^+ y Co^{2+} , la concentración óptima de estos elementos parcialmente depende de la concentración de otros iones. En el mosto se encuentran presentes en diversas formas la mayoría como iones catiónicos, pero sólo algunos se encuentran biodisponibles, lo cual depende del pH del mosto, disponibilidad de aniones y la presencia de agentes quelantes.

Magnesio: La levadura requiere cerca de 1,7 mM de magnesio, lo cual se satisface a través del contenido presente en la malta. A concentraciones superiores a 25 000 ppm (1mM) provoca inhibición (Montanari *et al.*, 2009). Es captado activamente por un sistema de transporte específico de alta afinidad y es requerido por varias enzimas como cinasas, fosfatasas y sintetasas. Regula el metabolismo glucolítico; regula la tolerancia al alcohol; tiene efecto protector durante estrés (temperatura y presión osmótica); está implicado en la estabilización de la membrana, ácido nucléicos, ribosomas, lípidos y polisacáridos; estimula la fermentación de mostos de alto peso específico; está implicado en la estructura del ribosoma y tiene efectos neutralizantes sobre las fuerzas electrostáticas presentes en polifosfatos, ADN, ARN y proteínas (Hornsey, 2003).

Calcio: Importante en la estructura de la membrana y función de la levadura, la necesidad mínima es de 10-20 ppm (0.25-0.5mM) y a concentraciones mayores de 1 000 ppm (25mM) actúa como inhibidor. Su presencia estimula el crecimiento del microorganismo. Casi todas las influencias del ión son extracelulares, fundamentalmente en el mantenimiento e integridad de la pared celular. Los niveles de calcio citoplásmico se mantienen a niveles residuales muy bajos, 4-8 ppm; se elimina por la célula frente a un gradiente de concentración a través de

la membrana. La presencia de este ión juega un papel importante en el proceso de floculación.

Zinc: Desempeña un papel crucial en el metabolismo de la levadura; para una adecuada actividad glucolítica es necesaria una concentración de 1-2 ppm; en los mostos esta concentración puede variar entre 0.1-5 ppm de acuerdo a su preparación; una parte se encuentra en forma de quelato. En determinadas concentraciones puede ser inhibidor de crecimiento que depende entre otros factores de la concentración de Mn^{2+} en el mosto, ya que a concentraciones superiores de 0.4 ppm, la levadura puede tolerar 30 veces más zinc. Estimula la captación de maltosa y maltotriosa, estimula la síntesis de riboflavina, tiene efecto estabilizador sobre el sistema membranosos de la levadura, activa la fosfatasa ácida y alcalina, y actúa como centro catalítico de varias enzimas importantes (aldolasa, acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa). Se almacena en la vacuola (Hornsey, 2003).

Sodio: No es acumulado intracelularmente; es continuamente evacuado del citosol, manteniendo niveles muy bajos. Si los niveles son muy altos debido a la concentración salina en el mosto se osmorregula produciendo solutos intracelulares compatibles como el glicerol o arabitol (Hornsey, 2003).

Potasio: Es particularmente necesario para el metabolismo de carbohidratos y participa en todas las reacciones enzimáticas donde está involucrado el ATP [35]. Es captado activamente y para esto es necesario que exista glucosa u otro azúcar fermentable. Su captación está estrechamente relacionada con el desprendimiento de H^+ hacia el exterior de la célula (Hornsey, 2003).

Durante la fermentación la levadura muestra distinta afinidad específica por la absorción de cationes divalentes, entre ellos: Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} y Sr^{2+} .

5.7 Cerveza de alta gravedad.

Tradicionalmente los mostos de 12 °Plato son fermentados para producir cervezas de alrededor de 5% de etanol (v/v). Sin embargo, pueden hacerse ahorros substanciales incrementando la densidad del mosto de 12 °P a 18 °P y diluyendo el 7.5 % (v/v) del contenido de etanol para obtener una cerveza con un contenido regular de 5% (Bliek, *et al.*, 2007). En cervezas elaboradas con mostos de alta densidad, después de la maduración la cerveza se diluye con agua carbonatada fría antes del filtrado (Dietvorst, 2006).

La elaboración de cervezas de alta gravedad es un desarrollo de la industria cervecera que se ha introducido en los últimos 35 años, principalmente debido a sus ventajas económicas (Dietvorst, 2006). La gravedad específica se refiere a la cantidad de azúcares disueltos en el mosto. En la elaboración de cerveza con mostos de alta gravedad específica, se utilizan mostos de al menos 16 - 18 °P y hasta 20 °P donde se esperan concentraciones altas de etanol al final de la fermentación.

Después de la fermentación y de la maduración de la cerveza, se diluye para obtener un producto con la concentración de alcohol deseada.

Al fabricante de cerveza le resulta muy rentable obtener mostos de densidad superior a la necesaria, fermentarlo y diluirlo al final del proceso. Por ejemplo, al aumentar 5 °C la temperatura de una tonelada de mosto requiere prácticamente el mismo consumo de energía si su densidad es 1.030 (7.56°P) que si es 1.050 (12.39°P) o 1.070 (17.06°P).

En la práctica, se utilizan dos métodos de elaboración de mostos de alta densidad, el primero consiste en la adición de jarabes para aumentar el extracto y, por lo tanto, la densidad en la caldera de cocción. El segundo supone reunir todos los mostos de densidad inferior a 1.010 (2.56°P) que se obtenga de las

calderas de extracción, cubas filtro y filtros de mosto, utilizar este mosto diluido para sustituir al agua en la extracción. Al no mezclar con el mosto denso los mostos diluidos y sustituir con estos el agua de extracción, se consigue aumentar considerablemente la concentración (Hough, 1994).

Se ha reportado que al añadir jarabes para obtener mostos de alta gravedad, la disponibilidad de oxígeno se ve reducida, así como insuficiente aireación del mosto que resulta en un crecimiento deficiente de la levadura durante la fermentación.

5.7.1 Ventajas y desventajas de la elaboración de cerveza de alta gravedad.

Como ventajas se puede observar mejora en la capacidad de fabricación de la cerveza, debido a la utilización máxima de los equipos, reduciendo los costos laborales, menor consumo de energía y aumento de los rendimientos de etanol por unidad de extracto fermentable (Dietvorst, 2006). Sin embargo se conocen mayores desventajas (Pratt *et al.*, 2002). Algunos autores mencionan que el mosto de alta densidad afecta la morfología celular de la levadura, descensos en el crecimiento, viabilidad y actividad metabólica; estrés, debido a la presión osmótica procedente de la concentración del extracto así como la inestabilidad de la espuma debida a la disminución de polipéptidos hidrofóbicos que son responsables de la estabilidad.

Sin embargo, otros autores describen una exitosa estrategia para obtener variantes de levaduras con mejoras relevantes durante la fermentación, bajo condiciones de alta gravedad, aislando variedades de levaduras lager de la industria. Se sometieron a una mutagénesis (UV-inducido), observando que dos variantes de levadura mostraban buenas características fermentativas en condiciones de alta gravedad (>22° Plato), así como mejoras en la viabilidad bajo concentraciones elevadas de etanol, mostrando las mismas ventajas a un nivel de escala piloto. (Blieck *et al.*, 2007)

5.8 Compuestos congenéricos.

El sabor y aroma de las bebidas alcohólicas está influenciado en gran parte por el contenido de etanol; sin embargo, una gran variedad de compuestos orgánicos que se encuentran en menor concentración contribuyen a las características distintivas entre diferentes bebidas alcohólicas. Estos compuestos son alcoholes superiores, carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres y compuestos azufrados, que en conjunto reciben el nombre de congenéricos (García *et al.*, 2003; Santillán *et al.*, 1998).

El origen de los compuestos congenéricos es diverso, así como el tipo y su concentración dependen de diversos parámetros; algunos autores consideran que los principales son: la cepa de la levadura, la composición de la materia prima, otros microorganismos presentes en la fermentación y otros factores ambientales como la temperatura de fermentación, la concentración de oxígeno en el medio y el pH del medio; éstos involucrados directamente en el metabolismo de la levadura para producir ciertos metabolitos (Santillán *et al.*, 1998; Saerens *et al.*, 2008). El perfil de sabor de la cerveza en el producto final también se ve afectado debido a operaciones en el proceso de elaboración y el tipo de tratamiento post fermentativo

5.8.1 Precursores de los compuestos congenéricos.

Los principales congenéricos se forman durante la fermentación, ya que son compuestos producto de transformaciones bioquímicas de los compuestos de la materia prima, mediados por el metabolismo de la levadura a ciertas condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la fermentación.

Existen evidencias que demuestran que los carbohidratos influyen en la formación de ciertos congenéricos como son los alcoholes superiores y ésteres (Kobayashi *et al.*, 2008; Santillán *et al.*, 1998).

Por otro lado, los aminoácidos presentes son precursores de distintos compuestos congenéricos, debido a que una de las fuentes de nitrógeno principales son aminoácido y pequeños péptidos, que son utilizados por la levadura para la síntesis de nuevas estructuras en particular como los aminoácidos: valina, leucina e isoleucina, que son destinados para la formación de alcoholes superiores y sus ésteres (Kobayashi *et al.*, 2008; Santillán *et al.*, 1998).

5.8.2. Clasificación de los compuestos congenéricos

De acuerdo a las características químicas de los compuestos congenéricos, se puede agrupar en tres importantes grupos representativos.

- **Alcoholes Superiores.** También llamados aceites de fusel. Hace referencia a todos aquellos alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono, un peso molecular y punto de ebullición superior al etanol. Los precursores de los alcoholes superiores son los aminoácidos (ver Tabla 5), que para su formación, ocurre primero una desaminación que da origen a un α -cetoácido, que posteriormente es descarboxilado y convertido en un n-aldehído que a través de una reducción produce el alcohol. La desaminación correspondiente para la formación de alcoholes, se lleva a cabo mediante una enzima

específica (leucindesaminasa, isoleucindesaminasa, valindesaminasa) (Kobayashi *et al.*, 2008). La formación de n-propanol, a diferencia de los anteriores, se forma a partir de un aminoácido polar no cargado: la treonina, donde primero ocurre un desaminación y deshidratación simultánea catalizada por treonina deshidrogenasa, formándose el α -cetoácido y después sigue la ruta de los anteriores mencionados (Santillán *et al.*, 1998). (Ver Figura 8).

Tabla 5. Principales Alcoholes Superiores presentes en la cerveza y sus precursores

Alcohol superior	Aminoácido	Sabor en cerveza
Propanol	Treonina	Alcohol
isobutanol	Valina	Alcohol
Alcohol amílico activo	Isoleucina	Alcohol
Alcohol isoamílico	Leucina	Dulce / plátano
2-fenil etanol	Fenilalanina	Floral / rosas

(Tomada de Kobayashi *et al.*, 2008 y Santillán *et al.*, 1998)

Brown y colaboradores, indican que altas temperaturas durante la fermentación es un factor importante para la formación de los alcoholes superiores, particularmente como sucede con la formación del feniletanol, que es indeseable en la cerveza por estar relacionado con aromas florales y perjudica el sabor. La concentración de oxígeno está muy relacionada con la concentración de ciertos alcoholes superiores ya que favorece algunas rutas metabólicas donde puede generar mayor concentración de algún aminoácido precursor en específico y por tanto, aumenta la concentración del alcohol correspondiente (García *et al.*, 1994). Por otro lado, la concentración de los azúcares también favorece su concentración: el enriquecimiento con glucosa

- **Ésteres.**

Los ésteres forman parte de los compuestos más numerosos en la cerveza, son producidos intracelularmente como resultado de la condensación de la Coenzima A (Co A) de ácidos grasos con un alcohol, posteriormente, estos difunden de la célula al caldo de fermentación. La reacción es catalizada por la enzima alcohol aciltransferasa (Steward, 2009).

La acetil CoA es el centro de muchos aspectos del metabolismo de la levadura y junto con otros ésteres de CoA de ácidos grasos, es un intermediario clave en la biosíntesis de lípidos. Así algunos factores que gobiernan la producción y consumo de lípidos tienen un efecto en la síntesis de ésteres.

En el inicio de la fermentación, cuando la síntesis de lípidos es requerida para el crecimiento celular, la velocidad de síntesis de ésteres es relativamente baja, pero cuando el crecimiento de la levadura está restringido por una baja reserva de esteroides y ácidos grasos insaturados, la concentración de acetil-CoA aumenta y la velocidad de síntesis de ésteres aumenta. Este incremento en la síntesis de ésteres es relativamente corta y pronto declina

Existen muchas variables que afectan la producción de ésteres: la levadura utilizada en la fermentación, la composición del mosto y las condiciones de fermentación (Steward, 2009) Otros factores reportados son: el uso de mostos de alta gravedad específica, oxigenación excesiva del mosto, y los niveles de ácidos grasos insaturados; por ejemplo, el aumento de la gravedad de los mostos involucra un aumento en la formación de los ésteres de acetato (Santillán *et al.*, 1998).

El perfil de esteroides y sus concentraciones dependen de la cepa de levadura empleada. En las cervezas se encuentra a una concentración entre 25- 27 ppm en cervezas lager y entre 80- 82 ppm en cervezas ale; el éster reportado como abundante es el acetato de etilo, seguido de formiato de etilo y acetato

de isoamilo. El acetato de etilo y acetato de isoamilo están relacionados con sabores frutales (Santillán *et al.*,1998).

Diferentes temperaturas de fermentación generan diferencias importantes en el perfil de sabor, influenciado por la formación de acetato de etilo y 2-fenil-etil acetato a temperaturas altas. El aumento de alcoholes superiores contribuye a la formación de acetato de isoamilo debida a la alta concentración de alcohol isoamílico.

En mostos donde la glucosa es la única fuente de carbono, se genera mayor concentración de ésteres de acetato, debido a una actividad muy alta de alcohol acetil transferasa, en cambio, donde hay mayor concentración de maltosa se suprime la actividad de la enzima alcohol acetil transferasa y se acumulan ácidos grasos insaturados. Por otra parte, cuando se utiliza fructosa la formación de ésteres es reducida por decremento en la actividad de la enzima, pero aumenta la formación de alcoholes superiores (Santillán *et al.*, 1998)

- **Carbonilos (aldehídos y cetonas)**

Entre los compuestos carbonilos más importantes en la cerveza se encuentran el acetaldehído y dicetonas vecinales.

Acetaldehído. Está presente en no más de 10 ppm, se produce durante la fermentación primaria (Kobayashi *et al.*, 2008) y se forma en el penúltimo paso de la vía glucolítica, donde la levadura convierte el azúcar a etanol; durante la maduración de la cerveza, disminuye su concentración. Altas concentraciones de acetaldehído son indeseables en la cerveza debido a que imparte sabor graso y con notas a manzana (Santillán *et al.*, 1998).

Dicetonas vecinales. Son sustancias fuertemente aromáticas, como: 2,3 butanodiona (diacetilo) y 2,3 pentanodiona; las dicetona vecinales se forman por descarboxilación oxidativa de acetohidroxiácidos que son excretados por la levadura. Son productos del metabolismo de los aminoácidos. El diacetilo, el

más importante, se forma indirectamente como un subproducto; producido a partir de α acetolactato, intermediario de la biosíntesis de valina y leucina, mientras que la 2,3-pentanodiona es producida de α -acetohidroxitirato, un intermediario en la biosíntesis de la leucina.

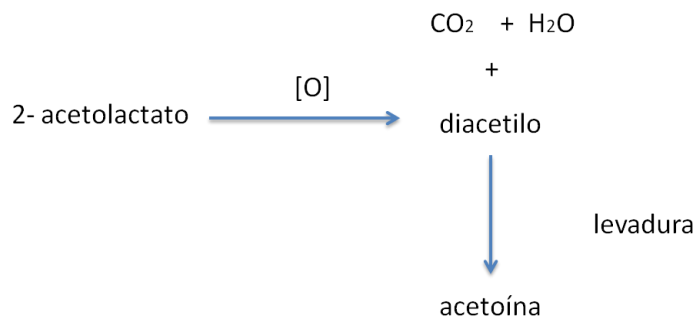


Figura 13. Esquema de producción y degradación del diacetilo.

(Tomada de García *et al.*, 2003)

El paso de 2-acetolactato a diacetilo se ve influenciado por el potencial redox del mosto es decir, condiciones oxidantes (lo cual incluye la presencia de O₂). La propia levadura es capaz de degradar el diacetilo convirtiéndolo en acetoína, lo cual hace mediante la enzima diacetil reductasa y en menor grado la alcohol deshidrogenasa, por lo tanto, un contacto prolongado de la levadura con el mosto fermentado una vez que prácticamente ha terminado la fermentación, es conveniente para eliminar este compuesto. Por otra parte, altas temperaturas de fermentación, favorecen la formación de 2-acetolactato y por el otro aceleran la reacción del diacetilo (García *et al.*, 2003)

- **Ácidos Orgánicos.**

Durante la fermentación se produce una amplia variedad de ácidos orgánicos, existiendo dos principales grupos: a) ácidos orgánicos volátiles, donde se encuentran principalmente ácido acético, propiónico y butírico. El primero se produce por la hidrólisis de la Acetil CoA. b) Ácidos orgánicos no volátiles, que incluyen oxoácidos como ácido pirúvico y productos del ciclo de Krebs, tales como ácido succínico y que están estrechamente relacionados con la composición de los aminoácidos del mosto (Hornsey, 2003).

Tabla 6. Clasificación de los principales compuestos congenéricos.

Tipo de compuesto		Compuestos
Alcoholes pesados	C3	n-propanol
(aceite de fusel)	C4	butanol, iso-butanol, sec-butanol
	C5	amílico, isoamílico, amílico activo
Otros alcoholes		Glicerol, 2-feniletanol
Carbonilos (aldehídos y cetonas)		Acetaldehído, acetona, 2,3 pentanodiona.
Ácidos orgánicos		Fórmico, acético, propiónico, láctico, butírico
Ésteres		Acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de metilo.

(Tomada de : García *et al.*, 2003).

5.9 Microextracción en fase sólida (MEFS)

En general un método analítico involucra procesos como son muestreo, preparación de la muestra, detección y análisis, donde más del 80% del tiempo de análisis es utilizado para la preparación de la muestra como es extracción, concentración y aislamiento del analito (Kataoka *et al.*, 2000).

La técnica de microextracción en fase sólida (MEFS) fue desarrollado en 1990 por Pawliszyn (Lord & Pawliszyn, 2000), su aplicación tuvo un crecimiento enorme especialmente en el uso con equipos de cromatografía y grandes ventajas en el análisis de alimentos que involucran compuestos volátiles y semivolátiles como es el caso de la cerveza.

El método se basa en la extracción de los analitos de una matriz de una muestra, que puede ser líquida, sólida o gaseosa (Mester *et al.*, 2001) donde no ocurre como tal una extracción, sino un equilibrio entre la matriz de la muestra y la fase extractora. Se emplea un dispositivo implementado con una fibra de sílice fundida que se encuentra recubierta de un material adsorbente generalmente de origen polimérico (fase extractora) (Kataoka *et al.*, 2000; Pawliszyn, 1999). Este método no utiliza solventes y presenta alta sensibilidad y reproducibilidad.

5.9.1 Dispositivo para microextracción en fase sólida.

El dispositivo consiste en un soporte llamado cuerpo central que simula ser una jeringa modificada que guarda en su interior una fibra de sílice fundida recubierta soportada en una aguja que puede ser retraída mediante un sistema de muelle tensor que deja al descubierto la fase extractora (ver Figura 10). La fibra de sílice fundida, que es químicamente inerte (Pawliszyn, 1999), se recubre con una capa relativamente delgada de la fase estacionaria, ésta actúa como una “esponja” con la matriz de la muestra.

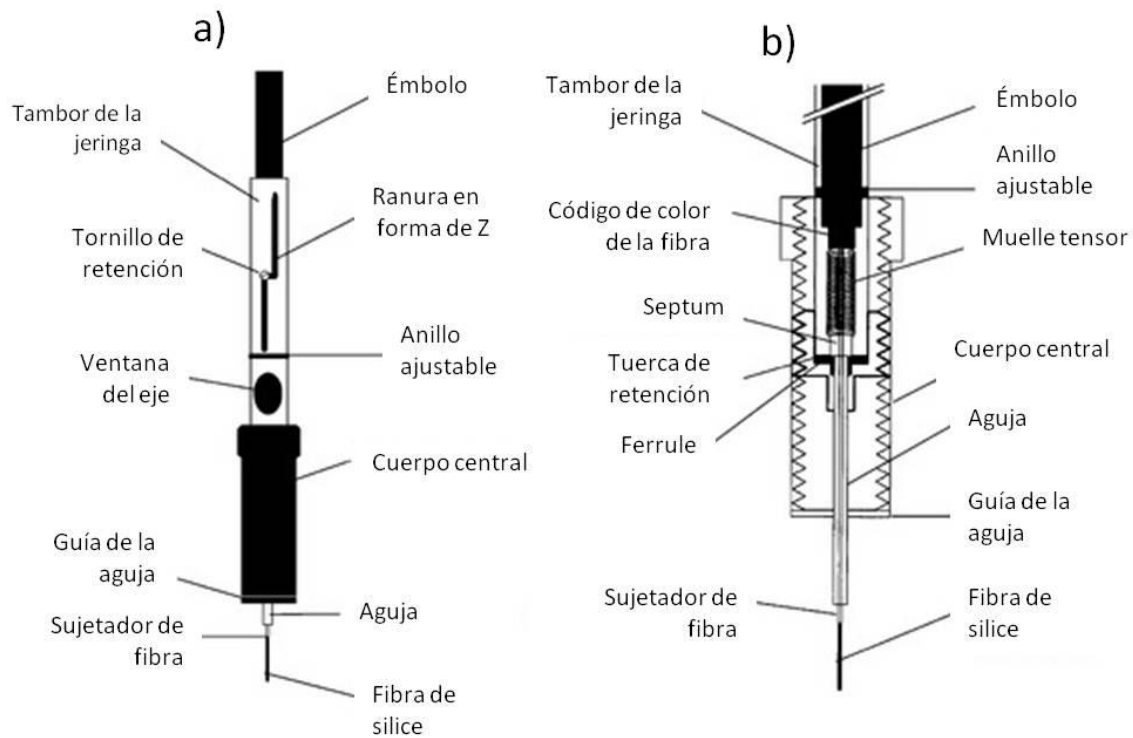


Figura 14. Dispositivo comercial para MEFS hecho por Supelco [Supelco datasheet]. a) Jeringa sujetadora de la fibra para MEFS. b) Ensamblaje de la fibra en el cuerpo central de la jeringa sujetadora.

5.9.2. Fibras para la extracción en MEFS.

La eficiencia de la extracción en el método depende de la constante de distribución K_{fs} , este parámetro característico que describe las propiedades del recubrimiento y su selectividad hacia el analito con otros componentes de la matriz de la muestra. Es necesario que la fibra empleada sea la óptima para la extracción del analito, para lo cual es necesario tomar una decisión de acuerdo a la polaridad, el tamaño de partícula, etc. (Pawliszyn, 1999).

5.9.2.1 Elección de la fibra.

Se debe considerar el rango del peso molecular del analito. Componentes de alto peso molecular desorben fácilmente de la superficie de recubrimientos de 7 μm o 30 μm y moléculas pequeñas son retenidas en los poros de las fibras que contienen adsorbentes en la cubierta, por ejemplo, partículas como: carboxeno o divinilbenceno DVB. Además para perfeccionar la elección se debe considerar la polaridad relativa del analito.

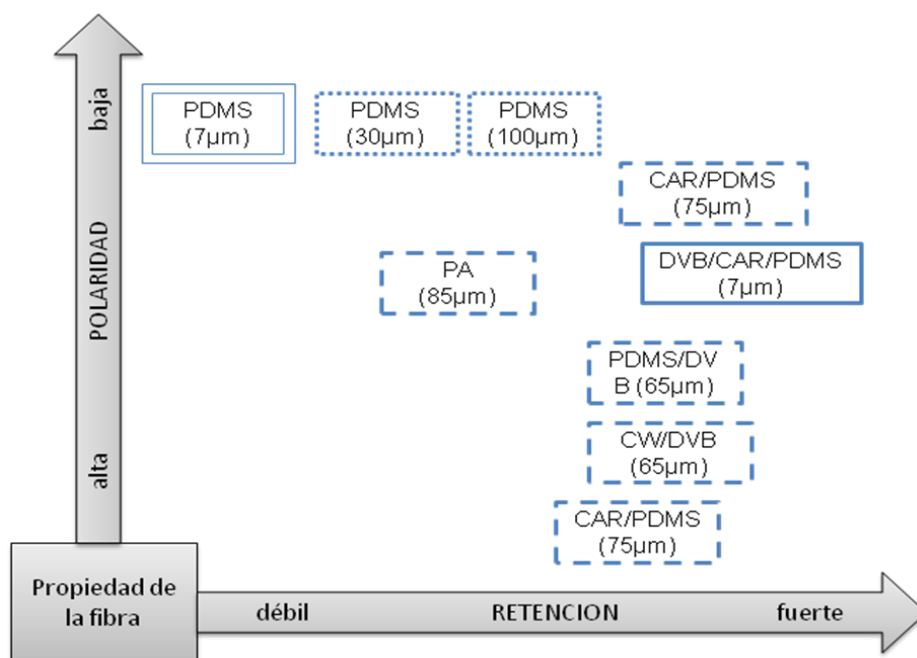


Figura 15. Propiedades de fibras comerciales para MEFS. Fibras [recuadro sólido] aglutinadas, [recuadro punteado] no aglutinadas, [recuadro punteado] parcialmente entrecruzada, [recuadro sólido] muy entrecruzada. (Kataoka *et al.*, 2000).

Como se observa en la Figura 11, las fibras con fases estacionarias aglutinadas tienen la característica de ser utilizados con analitos de baja polaridad y presentan una menor retención; por otro lado las fibras parcialmente entrecruzadas suelen utilizarse para compuestos de alta polaridad y presentar mayor retención. Los dos polímeros utilizados con frecuencia son polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA), donde el primero se comporta como un líquido lo que hace que tenga una

adsorción más rápida comparada con la de poliacrilato que es un sólido (Pawliszyn, 1999)

La temperatura de uso varía de acuerdo a cada fibra, por lo que con el rango de temperaturas recomendado se puede armar una rampa de temperatura para el análisis del analito en cuestión.

Tabla 7. Fibras comerciales para su uso en MEFS.

Fase estacionaria	Temperatura Máxima	Temperatura recomendada de operación	Polaridad
PDMS	280	200-280	No polar
PDMS/DVB	270	200-270	Bipolar
PA	320	220-310	Polar
CAR/PDMS	320	250-310	Bipolar
CW/DVB	260	200-250	Polar
DVB/CAR/PDMS	270	230-270	Bipolar

Fuente: manual de fibras (*Supelco datasheet*)

5.9.3 Mecanismo del proceso de MEFS.

El proceso de microextracción en fase sólida se lleva a cabo colocando la muestra en un vial perfectamente sellado mediante un séptum; la fibra ha de limpiarse antes de efectuar cualquier análisis. La fibra es expuesta en la matriz de la muestra, donde el analito es transferido de la matriz a la cubierta de polímero de la fibra; la extracción es considerada completa cuando el analito ha alcanzado un equilibrio entre la matriz y la fibra (Lord & Pawliszyn, 2000).

Las condiciones del equilibrio se describe como:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f V_s} \quad (1)$$

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (2)$$

Donde n es la cantidad extraída por el recubrimiento de la fibra, K_{fs} es el coeficiente de distribución entre el recubrimiento y la matriz de la muestra, V_f es el volumen del recubrimiento de la fibra, V_s el volumen de la muestra y C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra. En la ecuación 1 se puede ver que existe un relación proporcional entre la concentración del analito en la muestra y la cantidad extraída por el recubrimiento de la fibra. Si el volumen de la muestra es muy grande comparado con el volumen del recubrimiento entonces la cantidad del analito extraído en la fibra es una proporción insignificante presente en la muestra por lo que se puede resumir a la ecuación 2, donde la cantidad del analito extraído es independiente del volumen de la muestra. Por lo tanto no es necesario coleccionar una cantidad definida de la muestra previa al análisis (Pawliszyn, 1997).

La MEFS consta de dos etapas básicas: extracción y desorción.

En la etapa de absorción la MEFS puede ser llevada a cabo por dos modos que son extracción directa MEFS-ID y por espacio de cabeza MEFS-EC. En la extracción directa la fibra es sumergida en la muestra normalmente líquida, y en el análisis por espacio de cabeza la fibra no tiene un contacto directo; los analitos han de ser transportados desde la muestra al espacio de cabeza antes de ser extraídos; es extraído el vapor sobre la mayor parte de la muestra en el vial donde está contenida, para este modo de extracción es adecuado para compuestos volátiles y semivolátiles (con baja solubilidad en la muestra); sin embargo, también es usado en muestras semisólida. El modo MEFS-EC permite adicionalmente proteger la fibra de componentes dañinos contenidos en la matriz

de la muestra, de condiciones muy ácidas o muy básicas y compuestos de elevado peso molecular u otras interferencias no volátiles.

Resulta eficaz para la extracción del analito usar un agitador de tal manera que facilite llegar al equilibrio entre fibra y muestra, esto disminuyendo el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así también para compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas (Pawliszyn, 1997).

En la fase de desorción, los analitos son transferidos al equipo de medición; puede llevarse a cabo térmicamente (Figura 12 b) utilizando un cromatógrafo de gases en donde se introduce la fibra por un tiempo en el inyector del sistema a elevada temperatura, o bien mediante la utilización de un disolvente orgánico cuando en la técnica se hace uso del equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC (Kataoka *et al.*, 2000).

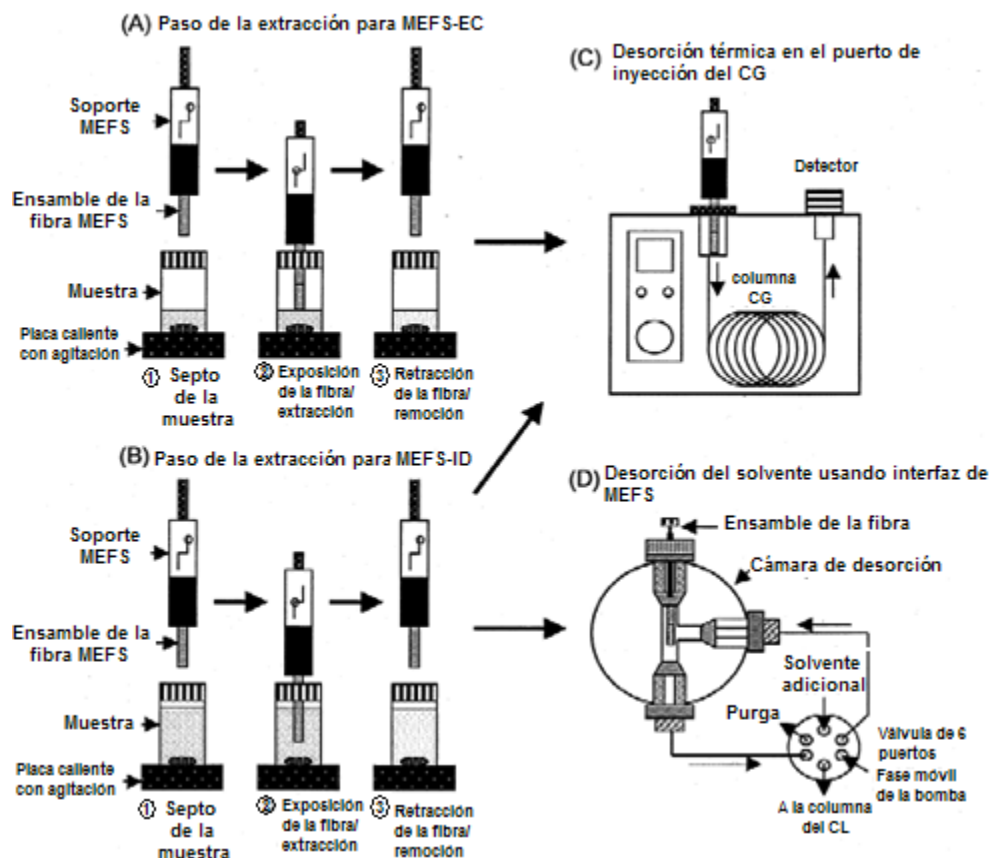


Figura 16. Proceso de extracción y desorción. A) Extracción por espacio de cabeza, B) Extracción directa C) Desorción en el puerto de CG D) Desorción del solvente en HPLC. (Tomada de Kataoka *et al.*, 2000)

5.9.4 Parámetros experimentales que afectan la eficiencia de la extracción.

Existen numerosos factores que pueden influir en la eficiencia de la extracción y que deben tenerse en cuenta en el diseño del método de análisis.

El parámetro más importante es quizá el **recubrimiento de la fibra**. Sus propiedades físicas y químicas son cruciales para el proceso de extracción. La naturaleza del analito determina el tipo de fase que debe utilizarse (ver sección 3.9.2.1).

El **volumen del recubrimiento** afecta la capacidad de la fibra y al volumen del analito que es capaz de extraer. Por lo tanto un incremento en el volumen de la fase podría aumentar la sensibilidad del método, aunque la cinética de extracción es también más lenta, lo que es traducido como un aumento en el tiempo de análisis (Mester *et al.*, 2001)

La temperatura de extracción afecta tanto a la cinética de extracción como a la termodinámica y selectividad del proceso. En lo que respecta al análisis de compuestos volátiles, un aumento de la temperatura conlleva a un coeficiente de reparto K_{fs} mayor en el equilibrio matriz/espacio de cabeza, favoreciendo de esta forma el proceso de extracción. No obstante, temperaturas elevadas pueden afectar el coeficiente de reparto del sucesivo equilibrio entre el espacio de cabeza y la superficie de la fibra; con base en esto, se habla de un óptimo de temperatura, dependiente de las interacciones entre los analitos, fibra y matriz (Pawliszyn, 1999).

El tiempo de extracción es un parámetro que afecta de manera importante a la sensibilidad del análisis. Se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, este tiempo es característico de cada sistema analito-fibra hasta conseguir una eficacia máxima ya que a partir de ese punto no se puede extraer más cantidad del analito (Pawliszyn, 1999).

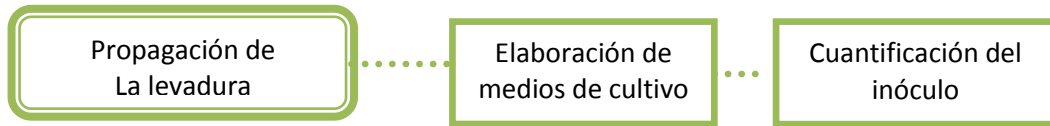
El **volumen de la muestra** está directamente relacionado con la sensibilidad del método ya que a mayor cantidad de muestra mayor cantidad de analito extraíble. En MEFS-EC el volumen del espacio de cabeza también afecta a la eficiencia de la extracción (Lord & Pawliszyn, 2000).

La fuerza iónica de la muestra, especialmente en muestras acuosas, influye en la eficacia de la MEFS. En general, un incremento de este parámetro, mediante la adición de sales como NaCl, KCl o NaSO₄, puede aumentar la cantidad de analito extraída, ya que disminuye su solubilidad en la muestra. Un aumento excesivo de la concentración de estas sales puede llevar a interacciones con la forma iónica de la sal, aumentando su solubilidad en la muestra y disminuyendo la eficacia de la extracción, esto principalmente con analitos polares (Pawliszyn, 1999).

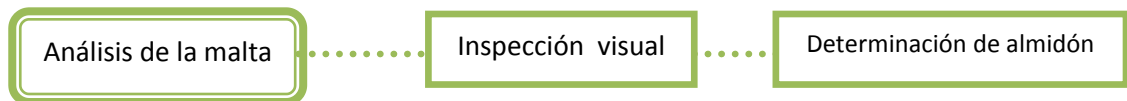
VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología general se plantea en el siguiente esquema. Los procedimientos de cada paso se explican con detalle posteriormente.

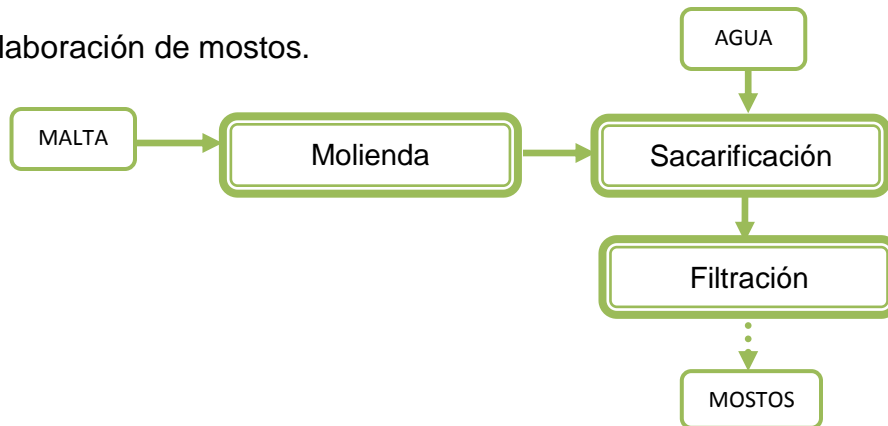
a) Levadura.



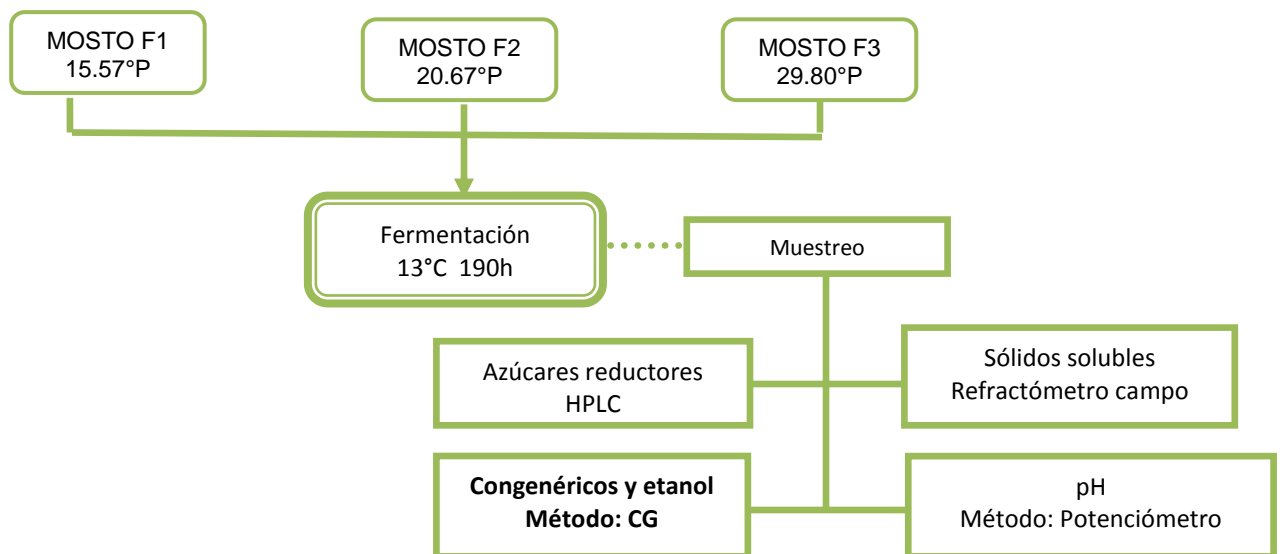
b) Malta.



c) Elaboración de mostos.



d) Fermentación y muestreo.



6.1 Aislamiento y propagación de *Saccharomyces pastorianus*

La cepa utilizada fue obtenida de la industria cervecera; levadura para cerveza lager (*Saccharomyces pastorianus*). Su aislamiento se llevó a cabo en un medio sólido YPD con 1.5% de agar bacteriológico; incubando a 32°C por 48 horas; se eligió una colonia representativa; y verificó observando las células al microscopio. Posteriormente la propagación se realizó en un medio YPD a una temperatura de 32°C y una agitación de 120rpm por un periodo de 48 horas.

Para preparar el inóculo, se resembró en cajas YPD + agar, se tomó una colonia representativa, fue transferida en 20 ml del mosto ajustado a 14 °Brix, incubando a 32°C por 48 horas para obtener un precultivo.

6.2 Cuantificación de almidón en la malta.

La malta utilizada fue una malta nacional de 6 carreras (Homebrewing México), la cual fue sometida a una molienda gruesa, siendo necesaria que permaneciera la cascarilla tan entera como fuera posible. Se tomó 0.1g de harina, se aforó a 10 ml con agua destilada. Se tomó una alícuota de 2 ml de la solución en un tubo de ensayo y se adicionó 3ml del reactivo I/KI, se midió la intensidad del color producido en un espectrofotómetro (UV-Visible GBC 911A V2257) a 600nm frente a un blanco de reactivos. Para la cuantificación del almidón, se utilizó una curva patrón de 0.02 a 0.2g de almidón soluble/ml con el mismo tratamiento que la muestra.

6.3 Preparación de mostos

Se realizó la maceración por el método de decocción, siguiendo la curva de sacarificación como se observa en la figura 13. Se prepararon tres mostos a diferentes concentraciones de sólidos solubles 14 °Brix, 20 °Brix y 30 °Brix. Se nombraron F1, F2, F3 respectivamente y su equivalencia en grados plato se puede ver en la Tabla 8 Los mostos obtenidos no fueron lupulados con la finalidad de obtener productos únicamente de la fermentación de los azúcares, mediado por la levadura.

El sistema consistió en extraer la papilla a una temperatura inicial alrededor de 40°C, se retiró un tercio de la papilla y se llevó a ebullición en una olla. La parte sometida a ebullición se mezcló con el resto de la papilla, lo que provocó un incremento gradual de la temperatura, hasta 54°C, y se repitió hasta elevar la temperatura a 65°C. Una cocción final permitió a la masa alcanzar una temperatura de 75°C

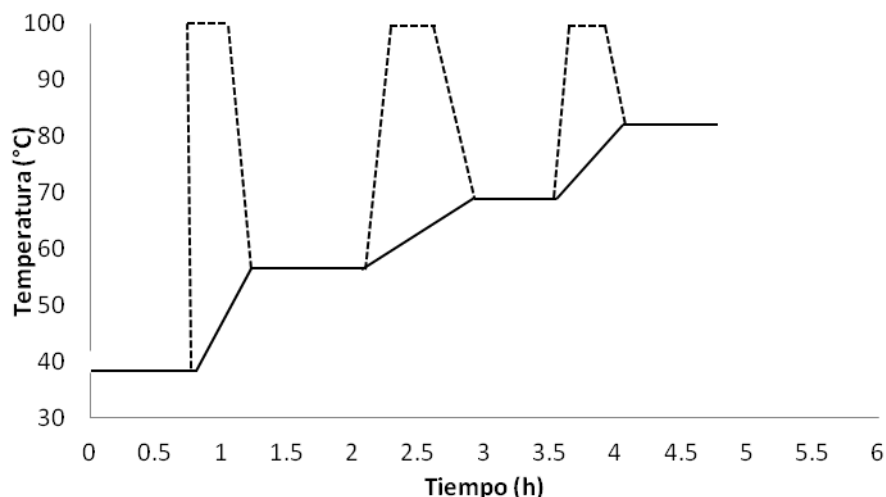


Figura 17. Cambios térmicos durante la extracción mediante un proceso de decocción. La línea discontinua representa un tercio de la masa o papilla elevada a temperatura de ebullición.

Tabla 8 Equivalencia entre °Brix , gravedad específica y °P

Mosto	°Brix	Gravedad específica	°Plato
F1	14	1.064	15.67
F2	20	1.0	20.67
F3	30	1.130	29.80

6.4 Fermentación.

Se inocularon tres tubos de fermentación con 10 ml del precultivo con una densidad aproximada de 10^8 células/mL que contenían 500 mL de mosto **F1 a 15.67 °P**, **F2 a 20.67°P** y **F3 a 29.8°P**. Los tubos de fermentación se mantuvieron en una incubadora de enfriamiento (Precision) a una temperatura de 14°C sin agitación durante 7 días.

Durante el periodo de fermentación se tomaron muestras cada 24 horas de cada fermentación proveniente de los mostos **F1, F2 y F3**. Se monitorearon los siguientes parámetros: pH del medio, sólidos solubles, contenido de carbohidratos. Al final de la fermentación se monitoreó: porcentaje de etanol y compuestos congenéricos.

6.5. Determinación de pH

El pH de cada muestra se determinó a lo largo de la fermentación, utilizando un potenciómetro (Oakon pH/mV/°C pH 510) previamente calibrado para cada una de las fermentaciones provenientes de los mostos: F1, F2, F3.

6.6 Determinación de Sólidos Solubles (°Brix)

Los sólidos solubles se determinaron tomando una gota de cada fermentación a 20°C, se colocó en un refractómetro de campo (Atago HSR-500) y se hizo la lectura correspondiente.

6.7 Determinación de azúcares: glucosa y maltosa.

Para determinar el consumo de glucosa y maltosa durante la fermentación se tomaron alícuotas de 1 ml a las 0, 24, 72, 144, 216 horas de la fermentación para cada fermentación (**F1**, **F2** y **F3**). Las muestras se filtraron a través de filtros de 0.45 µm de diámetro (Millipore).

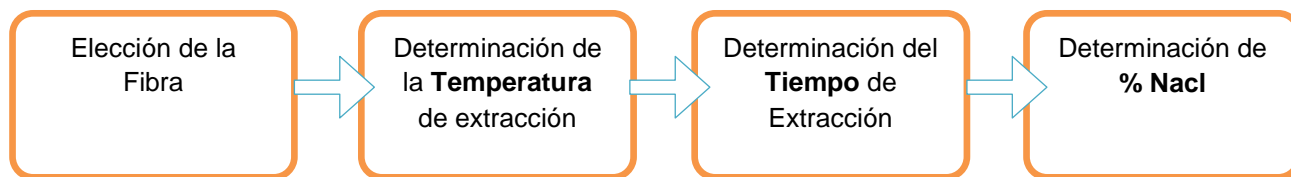
Se utilizó un cromatógrafo de líquidos HPLC (Waters 525); equipado con un detector de índice de refracción Serie 200 (Perkin Elmer) y una columna Sugar Pack. El volumen de inyección fue de 10µl y la fase móvil H₂O con EDTA 0.05g/L a un flujo de 0.5ml/min y a una temperatura de 70°C. La temperatura de la columna se mantuvo a 75°C. Las concentraciones de los azúcares se determinaron por medio del método estándar externo a partir de curvas de calibración para cada uno de ellos.

6.8 Determinación de proteínas solubles.

La cantidad de proteína soluble se determinó al inicio y al final de la fermentación, por el método espectrofotométrico de Biuret. Se tomaron alícuotas de 1 mL de muestra y se hicieron reaccionar con 4 ml del reactivo de Biuret a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro (UV-Visible GBC 911A V2257). La concentración se determinó mediante una curva de calibración con albúmina sérica bovina como referencia.

6.9. Metodología de elección de las condiciones de extracción

Al realizar la metodología para la elección de las condiciones de microextracción se consideraron el tipo de fibra, temperatura de extracción, tiempo de extracción y porcentaje de salado (NaCl).



6.10 Cuantificación de etanol y compuestos congénéricos.

Las determinaciones fueron realizadas utilizando un CG (Agilent 6890N) equipado con detector FID y una columna Carbowax/BTR (Quadrex) empacada con un tamaño de partícula de 1µm y unas dimensiones de 60m x 0.25mm. Las condiciones cromatográficas: tras un periodo inicial isoterma de 5 minutos a 40 °C, se estableció un gradiente de 5 °C/min hasta alcanzar 140 °C y posteriormente se volvió incrementar a 10 °C/ min hasta 240 °C , permaneciendo así la temperatura durante un periodo de 5 min. La temperatura del inyector y detector fue de 250 °C. Se usó una relación de *split* 1:5 y se utilizó como gas portador hidrógeno a un flujo de 40 mL/min, el aire a 400 mL/min y el nitrógeno a 30 mL/min.

La técnica de extracción se llevó a cabo por el método de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (MEFS-EC), utilizando una fibra de PDMS/DVB (Supelco) utilizando 1.4 ml de volumen de muestra, a una saturación de 80% de NaCl, por un tiempo de 7 min, y en un baño a temperatura de 60°C con una agitación a 1 400 rpm.

Se prepararon los estándares de congénéricos en soluciones a 10 000 ppm de los congénéricos de estudio (acetaldehído, acetato de etilo, metanol, etanol, 2-butanol, 1-propanol, isobutanol, 2-pentanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico, lactato de etilo, ácido acético, furfural, diacetilo y 2 fenil etanol). La detección de los compuestos congénéricos y etanol se llevo a cabo con un detector FID, la cuantificación mediante el método estándar interno (2-pentanol). También se preparó un símil de cerveza (ver apéndice a) como vehículo en la preparación de las respectivas curvas de calibración de congénéricos y etanol.

La curva de calibración de los congénéricos se realizó haciendo mezclas de los 14 congénéricos a diferentes concentraciones 500, 250, 50, 25, 5 y 1 ppm; se agregó el estándar interno a 20 ppm y se aforó a 10 mL con el símil de cerveza. Se realizó la extracción a las condiciones indicadas anteriormente y se expuso 20 minutos a

las condiciones del cromatógrafo antes mencionadas. El tiempo de corrida fue de 40 minutos.

Para la curva de calibración del etanol, se prepararon muestras de etanol al 20, 10, 5 y 1%, adicionando el estándar interno a 20 ppm usando como vehículo el símil de cerveza. Se realizó la extracción y determinación cromatográfica a las mismas condiciones que en el caso de la curva de congénicos.

Para el análisis de las muestras de cerveza, se prepararon con 20 ppm de estándar interno, y se extrajo por MEFS-EC a las condiciones cromatográficas ya mencionadas. Se tomaron muestras de referencia de mostos a las diferentes fermentaciones trabajadas (16.67°P, 20.67°P y 29.9°P).

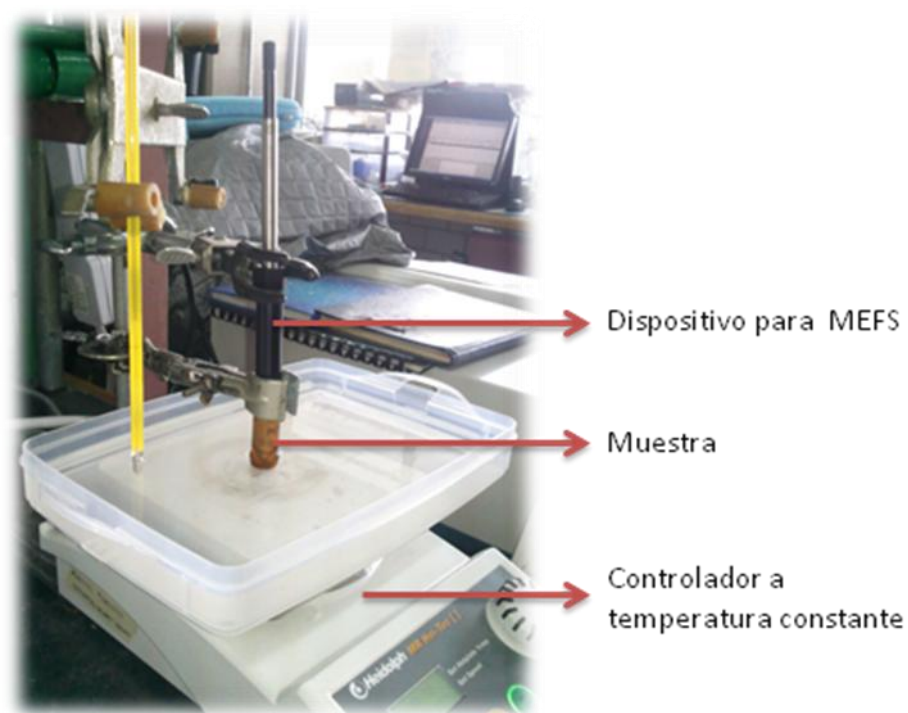


Figura 18. Montaje del dispositivo para MEFS-EC.

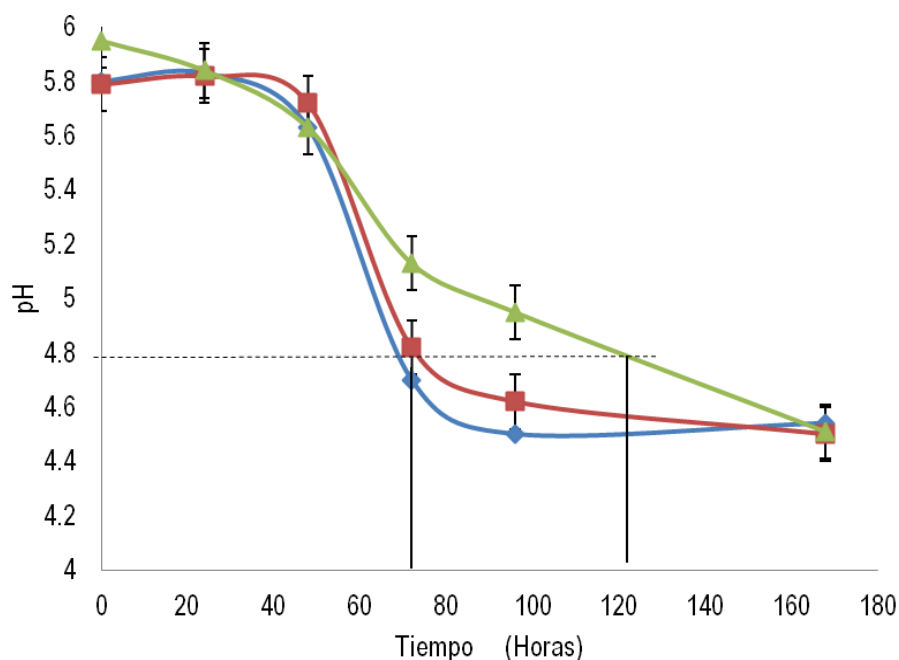
VIII. RESULTADOS.

7.1 Malta

La malta de seis hileras utilizada como materia prima para la elaboración de las cervezas, contenía 0.391g/ml de almidón soluble.

7.2 pH

Se observó en todas las fermentaciones que el pH tuvo un decremento considerable desde 5.8 hasta 4.5. En la Gráfica 1 se observa este comportamiento para las tres fermentaciones F1, F2 y F3.

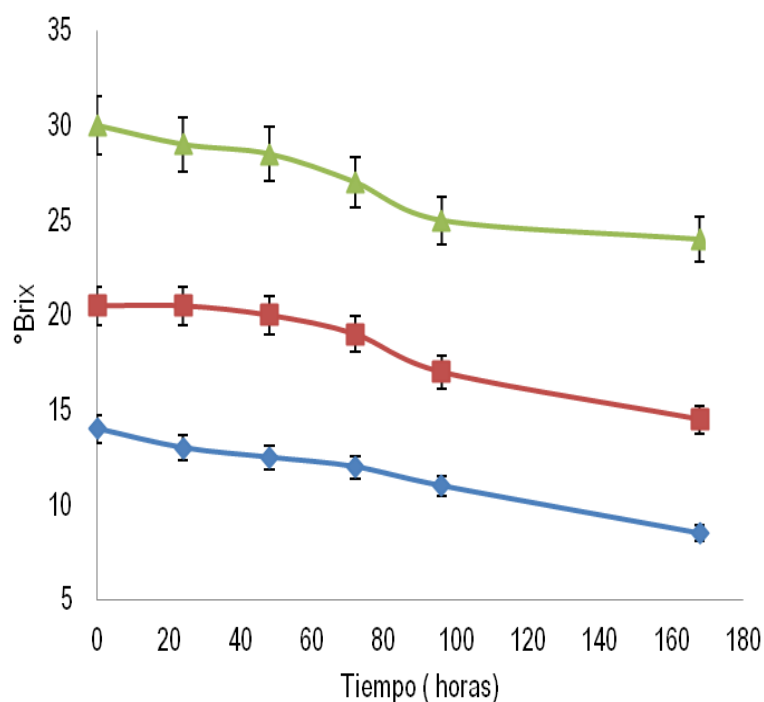


Gráfica 1. Variación de los pH a lo largo de las fermentaciones.

◆ F1 (15.67°P) ■ F20 (20.67°P) ▲ F30 (29.8°P) La temperatura de fermentación fue entre 13-14°C. La línea punteada representa el valor de pH óptimo de crecimiento de *Saccharomyces pastorianus*.

7.3 Sólidos solubles

La determinación de los sólidos solubles constituye una estimación del consumo de azúcares presentes en el mosto, observando que el consumo total de azúcares fue de 40%, 27.5% y 20%, para las fermentaciones F1, F2 y F3 respectivamente. En la Gráfica 2 se puede observar el consumo de azúcares a lo largo de las fermentaciones.

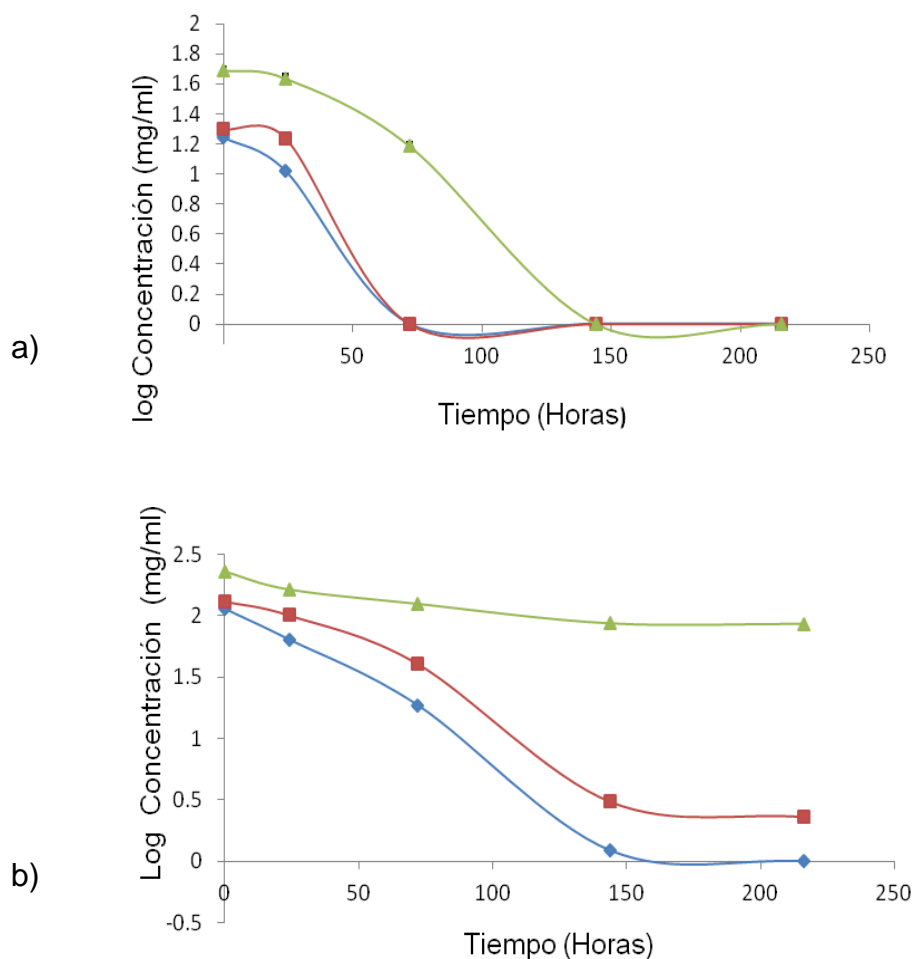


Gráfica 2. Determinación del porcentaje en peso de los sólidos solubles.

Medición en refractómetro a 20°C a lo largo de la fermentación. ♦ F1 (15.67°P), ■ F2 (20.67°P) y ▲ F30 (29.8°P)

7.4 Consumo de azúcares.

Al monitorear los principales azúcares presentes en el mosto, glucosa y maltosa, se observó que el monosacárido se consumió en las primeras 24 horas de las fermentaciones F1 y F2, y a las 72 horas en F3 (Ver Gráfica 3). Con respecto a la maltosa, en todos los casos quedó un remanente; el de mayor cantidad fue en F3, con 35.32 % de maltosa en referencia al mosto inicial.



Gráfica 3. Consumo de azúcares a lo largo de la fermentación

a) consumo de glucosa b) consumo de maltosa. ◆ F1 (15.67°P), ■ F2 (20.67°P) y ▲ F30 (29.8°P)

En la tabla 9 se muestra el consumo de azúcares en porcentaje de acuerdo a la cantidad de azúcares presentes en los mostos iniciales.

Tabla 9. Porcentajes de consumo de glucosa y maltosa en las fermentaciones.

Tiempo (Hora)	Glucosa			Maltosa		
	% Consumo			%Consumo		
	F1 (15.67°P)	F2 (20.67°P)	F3 (29.80°P)	F1 (15.67°P)	F2 (20.67°P)	F3 (29.80°P)
0	0	0	0	0	0	0
24	39.97	12.41	11.76	43.72	23.07	6.46
72	100	100	68.58	83.59	59.07	32.89
144	-	100	100	98.93	97.68	48.75
216	-	-	100	99.12	98.25	64.38
%Remanente	0.00	0.00	0.00	0.88	1.75	35.62

7.5 Porcentaje de etanol y densidad específica.

El porcentaje de etanol fue 3.8%, 7.81% y 5.94% v/v para las fermentaciones F1 preparada con mosto de 15.67°P, F2 preparado con mosto de 20.67°P y F3 preparado con un mosto de 29.80°P respectivamente. En la Tabla 9 se muestra la densidad específica para cada mosto y su respectiva fermentación en el tiempo final.

Tabla 10. Densidad específica, extracto y porcentaje de etanol.

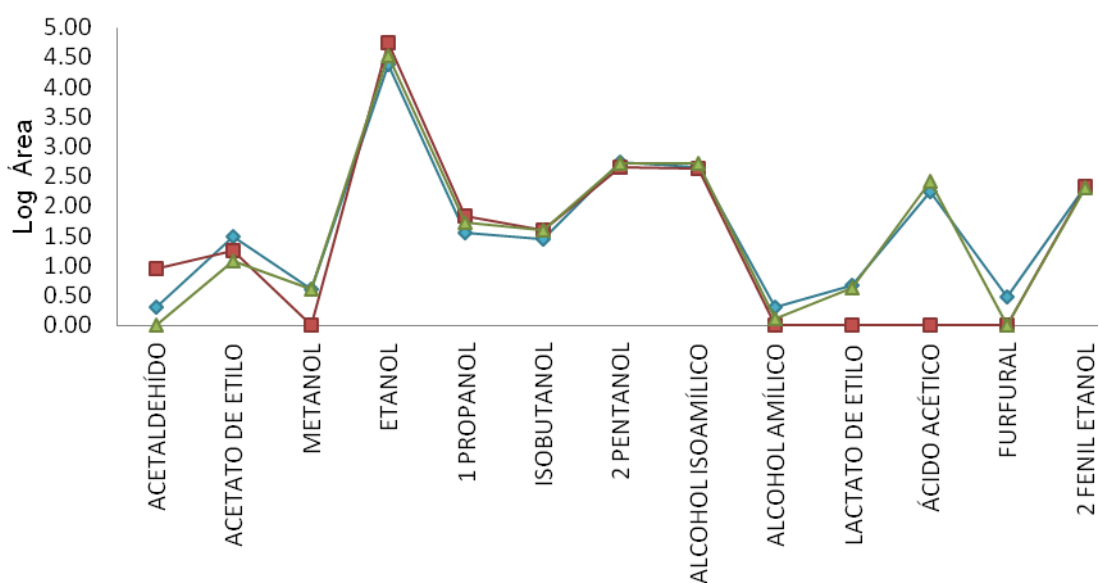
	Sólidos solubles (°Brix)	Densidad Específica	Extracto (g/100g)	%Etanol
Mosto F1	14	1.05667	14.55	0
C1*	8.5	1.0334	8.50	3.8
Mosto F2	20	1.08287	21.36	0
C2*	14.5	1.05847	15.07	7.81
Mosto F3	30	1.11855	30.86	0
C3*	24	1.10092	26.10	5.94

*C1, C2, C3: producto de la fermentación de cada mosto: F1,F2 y F3 respectivamente.

7.6 Condiciones de extracción

7.6.1 Elección de la fibra.

De acuerdo a la Gráfica 4, se observó que la fibra PDMS/DVB presentó señal para todos los compuestos congenéricos en estudio, sin embargo, para PA y CW/DVB no se observó señal en alcohol amílico, acetato de etilo, ácido acético y furfural.



Gráfica 4. Comparación de señales entre fibras para MEFS-EC.

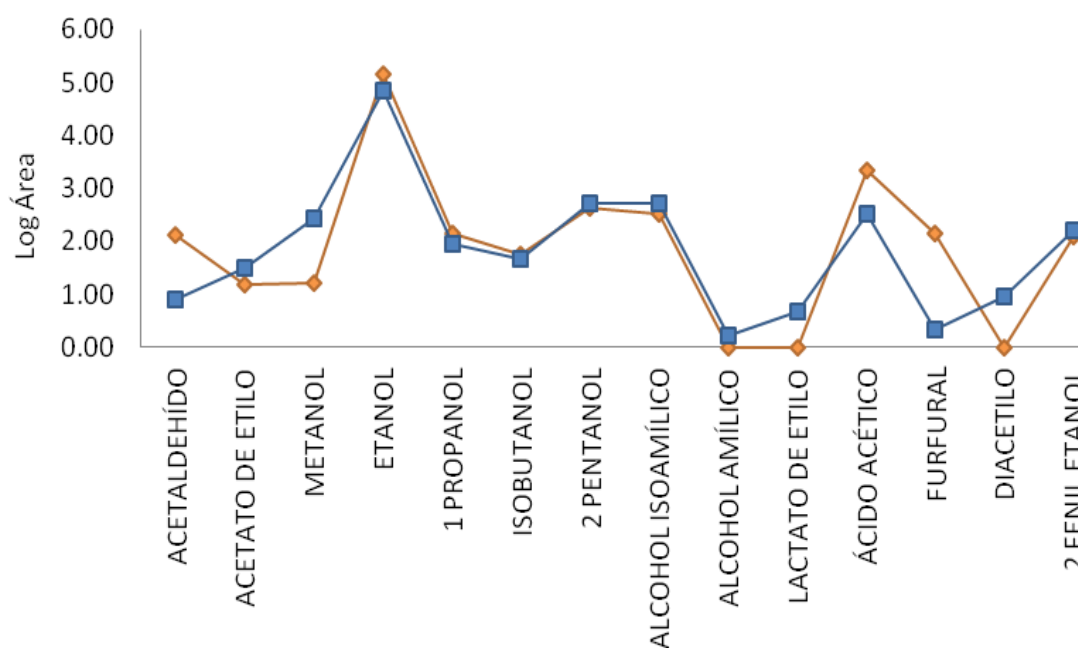
◆ PDMS/DVB, ■ CW/DVB, ▲ PA. Señales obtenidas utilizando CG, detector FID y columna Carbowax/BTR 1µmX 60m x 0.25mm.

Para determinar estadísticamente si existió diferencia significativa entre fibras para cada uno de los compuestos congenéricos se realizó un análisis de varianza con las señales obtenidas a un nivel de significancia de 5% (Ver Anexo d).

De este análisis se concluyó que no existió diferencia significativa entre fibras para todos los congénicos.

7.6.2 Comparación entre inyección directa y MEFS-EC utilizando fibra PDMS/DVB.

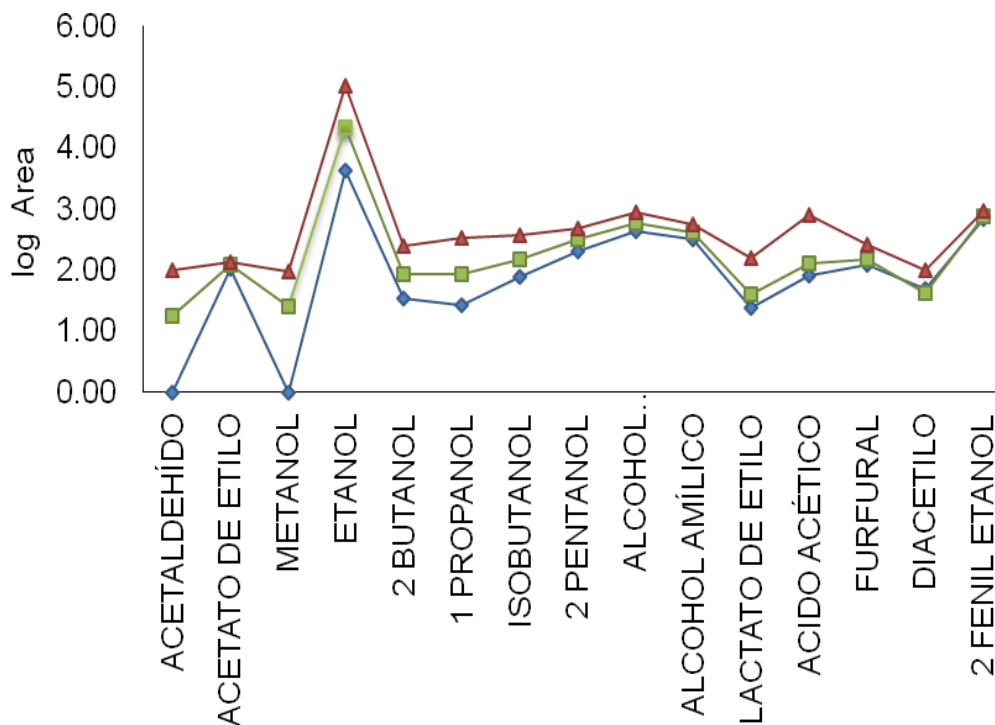
De acuerdo a las señales obtenidas se observó que para algunos compuestos congénicos como acetaldehído, ácido acético y furfural se vio aumentada la señal realizando inyección directa de la muestra; sin embargo, en otros como alcohol amílico, acetato de etilo y diacetilo no se apreció señal. Por otro lado utilizando el método MEFS-EC se obtuvo señal para todos los congénicos.



Gráfica 5. Comparación entre Inyección directa y MEFS-EC utilizando fibra PDMS/DVB. La extracción en esta determinación se realizó a un volumen de muestra de 1.4ml a 45°C, 7 minutos de extracción. ♦ Inyección Directa, ■ PDMS/DVB. Señales obtenidas utilizando CG, detector FID y columna Carbowax/BTR 1µmX 60m x 0.25mm.

7.6.3 Efecto de la temperatura en la MEFS-EC.

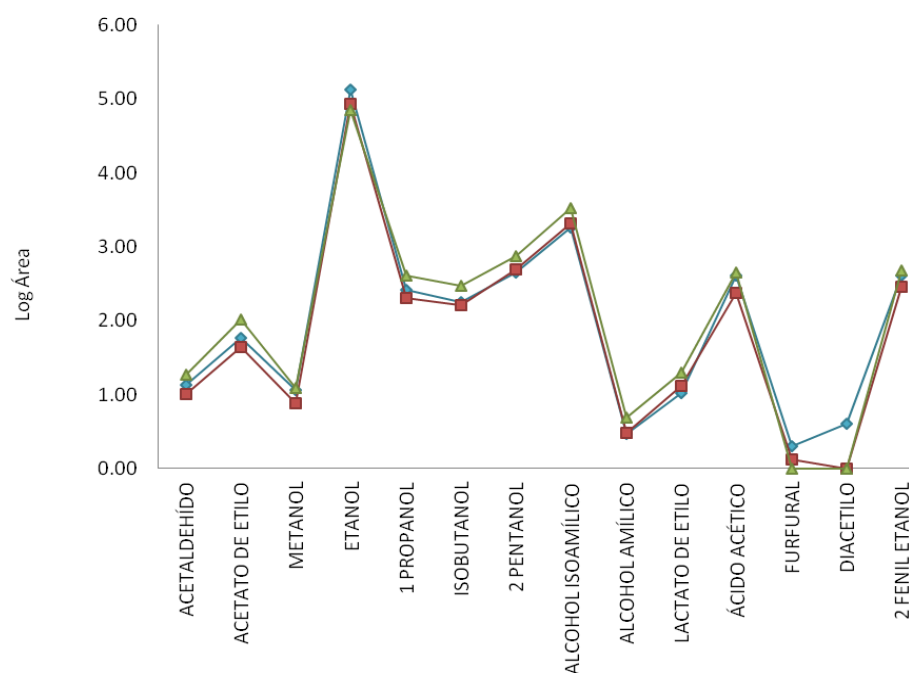
En la Gráfica 6 se observa el aumento de la señal al incrementar la temperatura de extracción; a la temperatura de 60°C la extracción de los analitos fue mayor.



Gráfica 6. Comparación de temperaturas de extracción. MEFS-EC utilizando 1.4 ml de muestra, 7 minutos de extracción. ◆ 30°C, ■ 45°C, ▲ 60°C. . Señales obtenidas utilizando CG, detector FID y columna Carbowax/BTR 1µmX 60m x 0.25mm.

7.6.4 Efecto del tiempo de extracción.

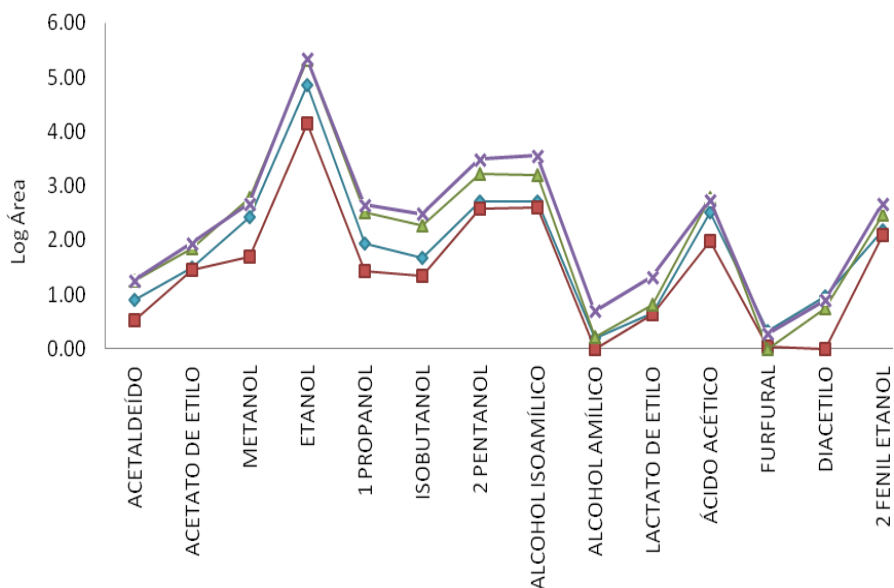
El perfil de extracción para tres diferentes tiempos fue similar para todos los compuestos congénéricos.



Gráfica 7. Comparación de tiempos de extracción. MEFS-EC utilizando 1.4 ml de muestra, 60°C. ♦ 7 min, ■ 15 min, ▲ 30 min. Señales obtenidas utilizando CG, detector FID y columna Carbowax/BTR 1µmX 60m x 0.25mm

7.6.5 Efecto de la concentración de sal.

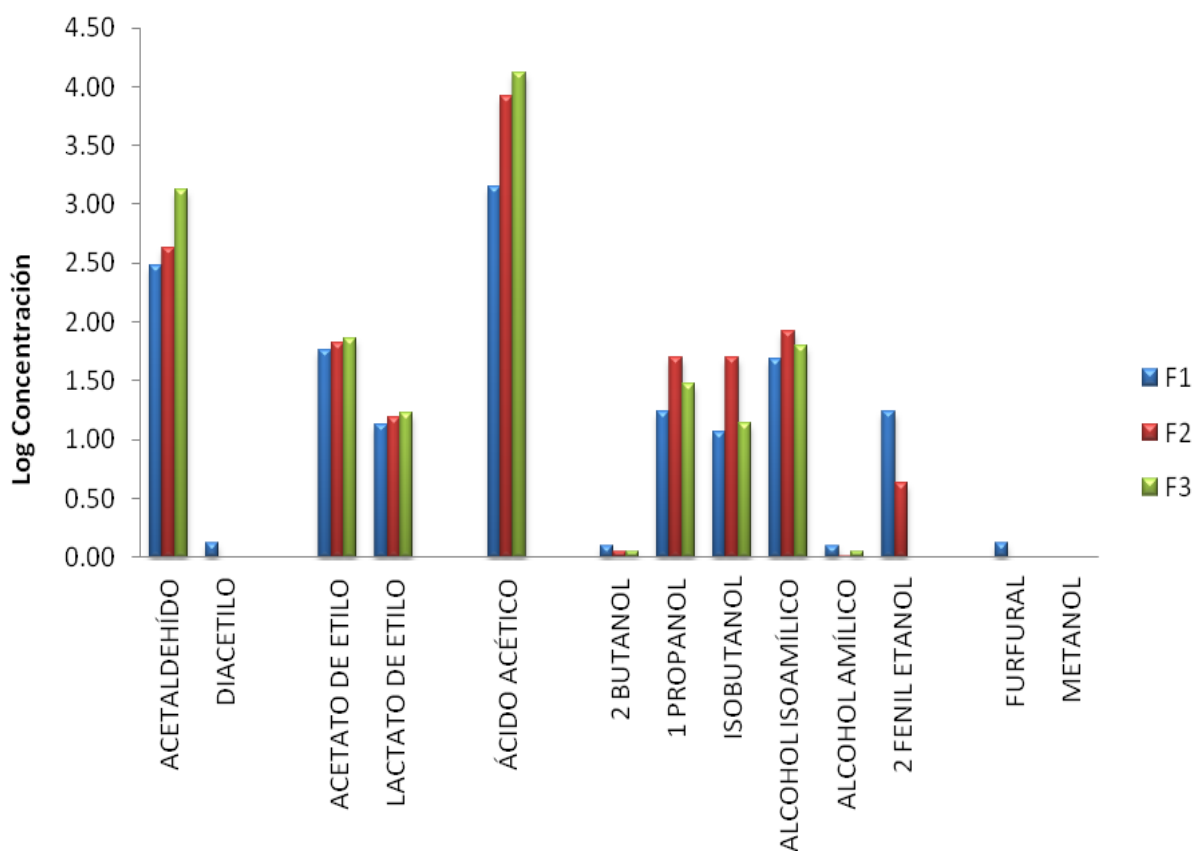
La concentración de sal en la extracción fue más eficiente a 80% de NaCl.



Gráfica 8. Comparación de la eficiencia de extracción a diferentes concentraciones de NaCl. ♦ Sin NaCl, ■ 5% NaCl, ▲ 40% NaCl, X 80% NaCl. Señales obtenidas utilizando CG, detector FID y columna Carbowax/BTR 1µmX 60m x 0.25mm.

7.6 Congenéricos.

En la Gráfica 9 se puede observar las concentraciones de los compuestos congénicos al inicio y final de la fermentación; se observó en las fermentaciones donde se utilizaron los mostos F2 y F3, la presencia de compuestos carbonílicos y ácido acético, y al final aumentaron el acetaldehído, acetato de etilo, ácido acético isobutanol y alcohol isoamílico.



Gráfica 9. Concentraciones de los compuestos congénicos en las fermentaciones utilizando mostos F1 (15.67°P), F2(20.67°P) y F3 (29.8°P). MEFS-EC, fibra PDMS/DVB, 60°C, 7min, 80% NaCl. utilizando CG, detector FID y columna Carbowax/BTR 1µm x 60m x 0.25mm.

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De las tres concentraciones iniciales de mostos preparadas a 15.67°P, 20.67°P y 29.8°P, elaborados y ajustados con malta como única fuente de carbono y sin añadir lúpulo con el propósito de no agregar más compuestos volátiles diferentes a los producidos por el proceso de fermentación de la levadura. Se monitoreo el consumo de azúcares y la producción de los compuestos congénicos. Se tomó como referencia el mosto de 15.67° P, los mostos de 20.67°P y 29.8°P se consideran de alta gravedad específica.

Se agregó como inóculo para la fermentación una densidad de 10^8 células/ml, dado que es la cantidad de células agregadas para mostos de alta gravedad específica sugeridos por varios autores (Blieck *et al.*, 2007; Pidocke *et al.*, 2009).

Durante el proceso de fermentación, el principal producto fue el etanol y en menor cantidad los compuestos congénicos, donde se mostraron cambios en la producción principalmente, ácidos orgánicos y ésteres.

Consumo de azúcares.

De acuerdo a la determinación de azúcares fermentables, glucosa y maltosa, principales sustratos provenientes del mosto, utilizados para la formación de diferentes metabolitos durante la fermentación. En la Grafica 3 se observa el consumo de éstos azúcares a lo largo del proceso fermentativo. En el mosto la maltosa se encontró en mayor proporción que la glucosa, sin embargo, en las tres fermentaciones la glucosa se consume por completo por ser un azúcar simple, fácil de ser utilizado por el metabolismo de la levadura. Se puede explicar este comportamiento debido a que la levadura regula su metabolismo, en presencia de glucosa, reprime la función de las proteínas transportadoras de maltosa (permeasas), a medida que se va agotando este sustrato, comienza el consumo de maltosa, activando las proteínas transportadoras para maltosa.

En las fermentaciones de alta gravedad, se pudo observar un remanente de maltosa, para la fermentación del mosto F2 fue de 1.75% y para la fermentación

del mosto F3 de 35.62% a el tiempo determinado de fermentación. Por lo cual se pudo observar que en un mosto de muy alta gravedad como lo fue el mosto a 29.8°P al tiempo establecido de fermentación a 216 horas y a una temperatura de 13°C hay un menor aprovechamiento de los azúcares fermentables.

Porcentaje de etanol y densidad específica.

El uso de mostos con alta concentración de azúcares resultó en un mayor contenido de etanol. En la reacción de fermentación, la relación que existe entre el sustrato y etanol involucra la formación de dos moléculas de etanol por cada glucosa. Los porcentajes de etanol obtenidos para cada fermentación fueron: 3.8%, 7.81% y 5.94% para las fermentaciones provenientes de los mostos F1, F2, F3 respectivamente. Sin embargo se puede observar que en la fermentación a partir del mosto F3 (29.8°P), la levadura utilizada ya no fue capaz de producir más etanol, sugiriendo que los azúcares solubles en el medio pudieran afectar el crecimiento y por ende producción de etanol a condiciones de alta osmolaridad. Por otro lado la producción de etanol como principal metabolito, inhibe la fermentación alcohólica, ya que puede existir una acumulación del etanol intracelularmente reflejando una disminución del contenido de etanol y el uso deficiente de los azúcares reductores disponibles.

Optimización de las condiciones de MEFC-EC.

A pesar de que actualmente existen diferentes métodos de análisis que permiten identificar y determinar diferentes compuestos en muestras acuosas, como en este caso en particular los congenéricos en la cerveza, fue importante tomar en cuenta la composición de la muestra, ya que como matriz compleja existen interacciones entre algunos componentes de la misma y los metabolitos a analizar. Con la utilización del método de MEFS-EC se logró determinar los compuestos congenéricos en cerveza sin necesidad de tener un método de separación previo.

Para la selección de la Fibra, se realizó un análisis de varianza a un nivel de significancia del 5% en el cual se concluyó que no existe diferencia significativa entre fibras para cada uno de los compuestos congénicos evaluados, indicando que las fibras utilizadas son capaces de absorber los analitos en cuestión. Sin embargo, se observa que hay una mayor adsorción de los compuestos deseados en las fibras PDMS/DVB y PA obteniendo perfiles de adsorción muy similares. Considerando lo anterior, se eligió PDMS/DVB para las posteriores determinaciones.

La siguiente variable a elegir fue la temperatura de extracción, donde se puede observar en la Gráfica 5, que la temperatura a la que se observó mayor señal cromatográfica fue a 60°C. Así mismo el tiempo de extracción elegido fue 7 minutos ya que se presenta un comportamiento similar entre tiempos lo que da a entender que 7 minutos es suficiente para llegar al equilibrio entre el espacio de cabeza formado y la exposición de la fibra.

Por otro lado, la concentración de sal utilizada fue a un 80% p/v de NaCl, donde se observó mayor capacidad de extracción a las temperaturas y tiempos ya establecidos anteriormente. La sal favoreció la extracción de los compuestos congénicos aumentando las señales cromatográficas.

Producción de compuestos congénicos.

El origen de los compuestos congénicos se debe a diversas razones: algunos autores afirman que el tipo y concentración de cada uno es debido a parámetros como la cepa de levadura por las vías metabólicas y precursores disponibles, la composición de la materia prima, así como las condiciones de fermentación como puede ser temperatura, concentración de oxígeno disuelto y las operaciones posteriores a la fermentación (Santillán *et al.*, 1998).

En los datos recopilados en la determinación de congénicos, se observó en el inicio de la fermentación la presencia de algunos compuestos congénicos, debido a la adición del precultivo que se encontraba en proceso de fermentación

donde es evidente un alto contenido de acetaldehído (Tian, 2010), que durante la fermentación actúa como un intermediario en la ruta metabólica de producción de etanol. Algunos autores afirman que el acetaldehído, puede ser reducido a etanol u oxidado a ácido (Castañe, 2000). Así mismo se ve incrementado el ácido acético, siendo el éster un intermediario metabólico la transformación de acetil Co A a acetaldehído (Tian, 2010).

Los compuestos congénicos que aumentaron al final de la fermentación fueron ácido acético, acetato de etilo y en alcoholes superiores como isobutanol, alcohol isoamílico, 1-propanol y 2-fenil etanol.

En las fermentaciones de alta gravedad, algunos autores señalan que es común observar aumento evidente en la concentración de ésteres y ácido acético [48], se confirma en las fermentaciones provenientes de los mostos F2 y F3 ya que el acetato de etilo aumentó en comparación en la fermentación donde se utilizó el mosto F1, que se consideró la fermentación referencia.

Con respecto a los ésteres, el de mayor producción en mostos con alta gravedad, fue el acetato de etilo. En general la formación de ésteres está relacionada con el consumo de azúcares, ya que en mostos donde hubo mayor cantidad de glucosa, se generó mayor cantidad de ésteres de acetato, debido a la alta actividad de la enzima alcohol acetiltransferasa; sin embargo, a medida que se fue hidrolizando la maltosa vuelve a incrementar la formación de ésteres. Algunos estudios muestran que una razón por la cual los ésteres aumentan se debe al incremento de alcoholes superiores, que al condensarse con ésteres de coenzima A de ácidos grasos, difunden al caldo de fermentación (Santillán *et al.*, 1998), observando así un aumento en el éster correspondiente, como fue el caso de las fermentaciones a partir de mostos F2 y F3, donde se incrementó un 16% y 26% respectivamente con relación a F1.

En términos de eficiencia, la fermentación a partir de F2 mostró mejor aprovechamiento de azúcares con menor aumento de ésteres al tiempo de fermentación establecido.

La formación de alcoholes superiores, se sabe que provienen principalmente de la presencia de aminoácidos en mosto (Santillán *et al.*, 1998), sin embargo, también interviene el tipo de fuente de carbono disponible; la presencia de glucosa, favoreció la formación de isobutanol y alcohol isoamílico, debido a que se encuentra en menor proporción en los mostos.

El diacetilo, indeseable en la cerveza por sus notas de sabor a mantequilla, y el metanol, como compuesto potencialmente tóxico, no fueron detectados en las cervezas de alta gravedad.

X. CONCLUSIONES.

- Se determinó que las cervezas elaboradas con mostos concentrados o de alta gravedad, generan durante la fermentación un aumento en la concentración de los compuestos congénicos, específicamente los del grupo de ésteres como acetato de etilo.
- El aumento de alcoholes superiores como: 1- propanol, isobutanol alcohol isoamílico y 2-fenil etanol se ve favorecido en la fermentación elaborada a partir del mosto a 20.67 °P.
- La elaboración de cerveza con mostos de alta gravedad generó un aumento en el contenido etanólico, comparado con el mosto de referencia, sin embargo, en los mostos de muy alta gravedad (29.8 °P) la producción de etanol se ve disminuida, debido a la presión osmótica elevada.
- Los azúcares determinados en los mostos fueron glucosa y maltosa, la utilización de éstos durante la fermentación por la levadura siguió el orden: glucosa, maltosa, donde se observó que la glucosa pudo actuar como represor del transportador de maltosa provocando el consumo total de la glucosa, y posteriormente activarse los transportadores de maltosa.
- La cerveza elaborada a partir del mosto a 20.67 °P muestra una mayor producción de etanol, un mayor consumo de azúcares y mayor cantidad de compuestos congénicos deseables en la cerveza, en un tiempo de fermentación de 8 días comparado con el mosto a mayor alta gravedad (29.8°P).

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida R., Almeida e Silva J. B., Almeida Lima U., Silva, D.P. Evaluation of fermentation parameters during high-gravity beer production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* (2001); 18:459-465.
2. Badui Dergal Salvador. *Química de los alimentos*, México, Addison Wesley y Longman, (1999).
3. Baxter E. Dense, Hughes Paul S. *Cerveza calidad, higiene y características nutricionales*, Zaragoza, España, Acribia, (2004).
4. Blicck Lies, Toye Geert, Dumortier Françoise, Verstrepen Kevin J., Delvaux Freddy R., Thevelein Johan M., Van Dijck Patrick. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Applied and environmental microbiology*. (2007); 73: 815-824.
5. Brown A. K., Hammond J.R. Flavour control in small-scale beer fermentations. *Institution of Chemical Engienners*. (2003); 81: 40-49.
6. Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y de la Malta. "La industria cervecera Mexicana". (Noviembre 2011). < <http://www.canicerm.org.mx/>>.
7. Castañe F.X. Los tanques cilindro-cónicos y el tiempo de guarda de la cerveza. *Alimentación equipo y tecnología*. (2000): 75 -84.
8. Da Silva Gilmare Antônia, Augusto Fabio, Poppi Ronei Jesus. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-CG. *Food Chemistry* (2008); 111: 1057-1063

9. De Silva Gilmare Antonia, Augusto Fabio, Proppi Ronei Jesus. Exploratory analysis of the profile of beers by HS-SPME-CG. *Food Chemistry* (2008); 111:1057-1063.
10. Dietvorst, Judith. Maltotriose utilization of lager yeast strains in high-gravity brewing. Doctoral thesis. Molecular & Developmental Genetics Section. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Leiden University. (2006).
11. Dragone Giuliano, Mussatto Solange I., B. João, Silva Almeida. High gravity brewing by continous process using immobilised yeast: Effect of wort original gravity on fermentation performance. *Institute of Brewing &Distilling*. (2007); 113: 391-398.
12. Dragone Giuliano, Silva Daniel P., de Almeida e Silva João B. Factors influencing etanol production rates at high-gravity brewing. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* (2004); 37:797-802.
13. FEMSA cerveza, “Inversión en cerveza” (Septiembre 2010), <http://www.femsa.com/es/business/cerveza/>
14. Ferreira Isabel. Beer Carbohydrates. *Beer in Health and Disease Prevention*. (2009): 291-298.
15. Flint Olga, *Microscopia de los alimentos, manual de métodos prácticos utilizando la microscopia óptica*. Zaragoza. Acribia. 1996, pp 41-45
16. Fontana Marta, Buiatti Stefano. Amino Acids in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. (2009): 273-284.
17. García Ana I., García Luis A., Díaz, Mario Fusel Alcohols Production in Beer Fermentation Processes. *Process Biochemistry*. 1994; 29:303-309.

18. García Garibay Mariano, López Munguía Agustín, Rodolfo Quintero Ramírez. *Biotecnología Alimentaria*. México, Limusa, 2003, pp. 274
19. Goldammer Ted, *The Brewer's Handbook the complete book to brewing beer*. Virginia USA. Apex Publishers. 2008.
20. Grupo Modelo: <http://www.gmodelo.com/> (Noviembre 2011).
21. Hellborg Linda, Piškur Jure. Yeast diversity in the brewing industry. *Beer in Health and Disease Prevention*. (2009): 77-88.
22. Hernández Alicia. *Microbiología Industrial*. Costa Rica. EUNED. 2003. pp.113-127.
23. Hornsey, Ian Spencer. *Elaboración de cerveza Microbiología, Bioquímica y Tecnología*, Zaragoza, España, Acribia, 2003.
24. Hough, JS. *Biotecnología de la cerveza y la malta*. Zaragoza, España, Acribia, 1994.
25. Hrivňák Ján, Šmogrovičova Daniela, Nádasky Pavol, Lakatošová Jana. Determination of beer aroma compounds using headspace solid-phase microcolumn extraction. *Talanta* (2010); 83:294-294.
26. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. : <http://www.inegi.org.mx> (Noviembre 2011)
27. Kataoka Hiroyuki, Lord Heather L., Pawliszyn –janusz. Application of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*. (2000); 880; 35-62

28. Kobayashi Michiko, Shimizu Hiroshi, Shioya Suteaki. Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation Journal of Bioscience and Bioengineering. (2008); 106:317-323.
29. Lord Hearther, Pawliszyn Janusz. Evolution of solid-phase microextraction technology. Journal of chromatography A. (2000); 153-193.
30. Marsili Ray. Techniques for Analyzing Food Aroma. Marcel Dekker Inc. New York 1997.
31. Mester Zoltan, Sturgeon Ralph, Pawliszyn Janusz. Solid phase microextraction as a tool for trace element apectiation. Spectrochimica Acta Part B (2001); 56:233-260.
32. Mizuno Akihiro, Tabei Hideaki and Iwahuti Masahumi. Characterization of Low-Acetic-Acid-Producing Yeast Isolated from 2-Deoxyglucose-Resistant Mutants and Its Application to High-Gravity Brewing. Journal of Biocience and Bioengineering. (2006); 101: 31-37.
33. Mochizuki Naoki, Kitabatake Katsuaki Analysis of 1-(2-furyl)propane-1,2-diol a Furfural Metabolite in Beer. Journal of Fermentation and Bioengineering (1997); 83: 401-403.
34. Molina Cano José Luis. La cebada. Madrid, Mundi-Prensa. 1989.
35. Montanari Luigi, Mayer Heidi, Marconi Ombretta, Fantozzi Paolo. Minerals in Beer. Beer in Health and Disease Prevention. (2009): 359-365.
36. Pavsler Andrea, Buiatti Stefano, Lager Beer. Beer in Health and Disease Prevention. (2009): 31 – 43.

37. Pavsler Andrea, Buiatti Stefano. Non-Lager Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. (2009): 17- 30.
38. Pawliszyn Janusz, Pawliszyn Barbara, Pawliszyn Michael. Solid phase Microextraction (SPME) *The Chemical Educator* (1997); 4: 1-7
39. Pawliszyn Janusz. Applications of solid phase microextraction. Royal Society of Chemistry 1999.
40. Perpète Philippe, Collin Sonia. Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. *Food Chemistry* (2000); 71:379-385.
41. Piddocke Maya P., Kreis Stefan, Heldt-Hansen Hans Peter, Nielsen Kristian Fog and Olsson Lisbeth. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2009); 84: 453-464.
42. Pohl Pawel, Metals in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. (2009): 349-358.
43. Pratt Marshall P., Brey Se, De Costa S.D., Bryce J.H., Stewart G.G. Fabricación de cerveza de alta densidad. Un inductor de estrés en la levadura. *Brewers Guardian*. (2002); 131: 22-25.
44. Saerens S. M. G., Delvaux, F, Verstrepen K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Delvaux, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. (2008); 74: 454-461.

45. Santillán Valverde, María del Carmen, García Garibay M. Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas Revista Latinoamericana de Microbiología. (1998); 40:109-119.
46. Stewart Graham G. The Horace Brown Medal Lecture: Forty Year of Brewing Research. The Institute of Brewing & Distilling. (2009); 115: 3-29.
47. Supelco Data Sheet No. T713019A, Instructions for the Supelco solid phase microextraction fiber holder for manual use.
48. Tian Jiyuan. Application of static headspace gas chromatography for determination of acetaldehyde in beer. Journal of Food Composition and Analysis. (2010); 23: 475-479.
49. Togores José Hidalgo. Tratado de Enología Volumen 1, Madrid España, Mundi Prensa libros. 2003, pp 490-492.
50. Tornai-Lehoczki J, Dlačny D., Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques . International Journal of Food Microbiology (2000); 62: 37-45.
51. Verstrepen Kevin J., Derdelinckx Guy, Dufour Jean-Pierre, Winderickx Joris, Thevelein Johan M., Pretorius Isak S., Delvaux Freddy R. Flavor-active Esters: Adding Fruitiness to Beer. Journal of Bioscience and Bioengineering. (2003); 96:110-118.
52. Vidgren Virve, Multanen Jyri-Pekka, Ruohonen Laura & Londenboroug John. The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeas. Fems Yeast Research, (2010); 10:402-411.

53. Wardencki Waldemar, Sowinski Piotr, Curylo Janusz. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A* (2003); 984: 89-96

XII. APÉNDICE

A) Composición del símil de cerveza.

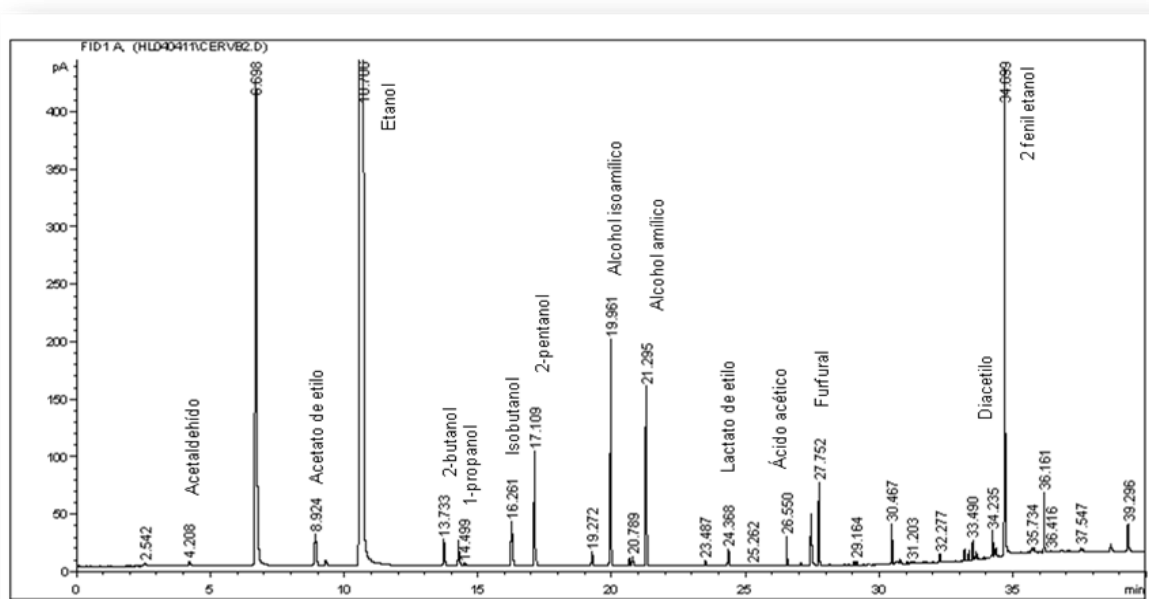
Para preparar 100 ml de símil de cerveza.

Cloruro de potasio (KCl)	0,45g
Maltosa	2.90g
Albúmina	0.25g

B) Tiempos de retención de los compuestos congénicos

Compuesto y grado de pureza		Tr. (min)
ACETALDEHÍDO (>99.5%)	SIGMA	4.21
ACETATO DE ETILO (99%)	ALDRICH	8.92
METANOL (99.98%)	J. T. BAKER	9.31
ETANOL (99.9%)	J.T. BAKER	10.71
2 BUTANOL (99%)	MERCK	13.73
1 PROPANOL (99.8%)	SIGMA	14.28
ISOBUTANOL (99.90%)	J. T. BAKER	16.26
2 PENTANOL (98%)	SIGMA	17.11
ALCOHOL ISOAMÍLICO	J. T. BAKER	19.96
ALCOHOL AMÍLICO (>99%)	SIGMA	21.29
LACTATO DE ETILO (>98%)	FLUKA	24.37
ACIDO ACÉTICO (>99%)	SIGMA	27.44
FURFURAL (99%)	SIGMA	27.75
DIACETILO (97%)	ALDRICH	34.23
2 FENIL ETANOL (98.7%)	CHEM SERVICE	34.70

Cromatograma que representa los tiempos de retención de los compuestos congénicos a una concentración de 10 000 ppm.



Cromatograma MEFS-EC de los compuestos congénicos a 1000 ppm. Fibra PDMS/DVB 65µm. Extracción: 7 minutos, 60°C, agitación 1400rpm . Desorción: 5 minutos a 40 °C, se estableció un gradiente de 5 °C/min hasta alcanzar 140 °C y posteriormente se volvió incrementar a 10 °C/ min hasta 240 °C y permaneciendo así la temperatura durante un periodo de 5 min. La temperatura del inyector de 250 °C, relación de *split* 1:5 , gas portador Hidrógeno a un flujo de 40 mL/min, el aire a 400 mL/min y el Nitrógeno a 30 mL/min; detector FID y una columna Carbowax/BTR (Quadrex) empacada con un tamaño de partícula de 1µm 60m x 0.25mm

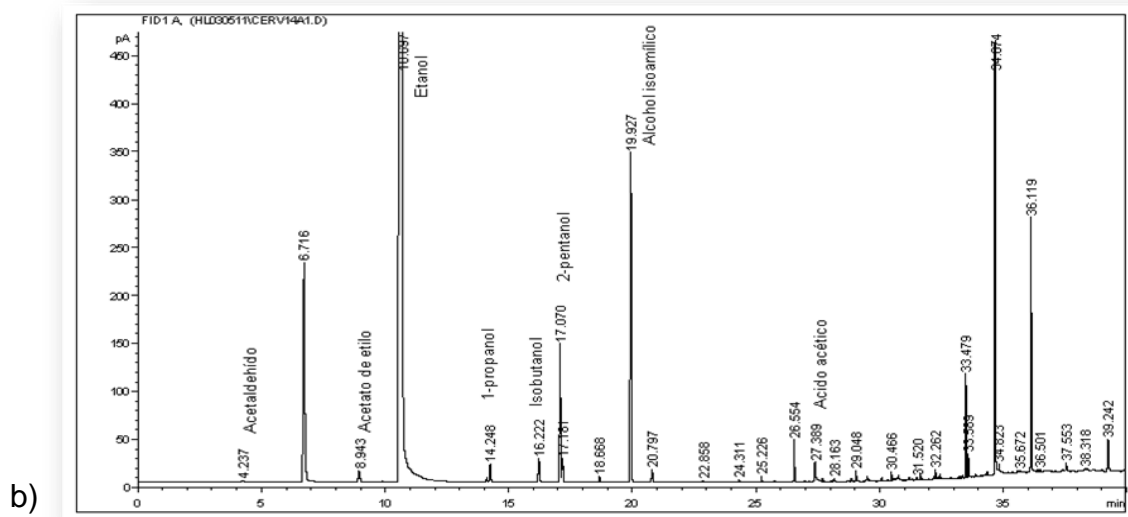
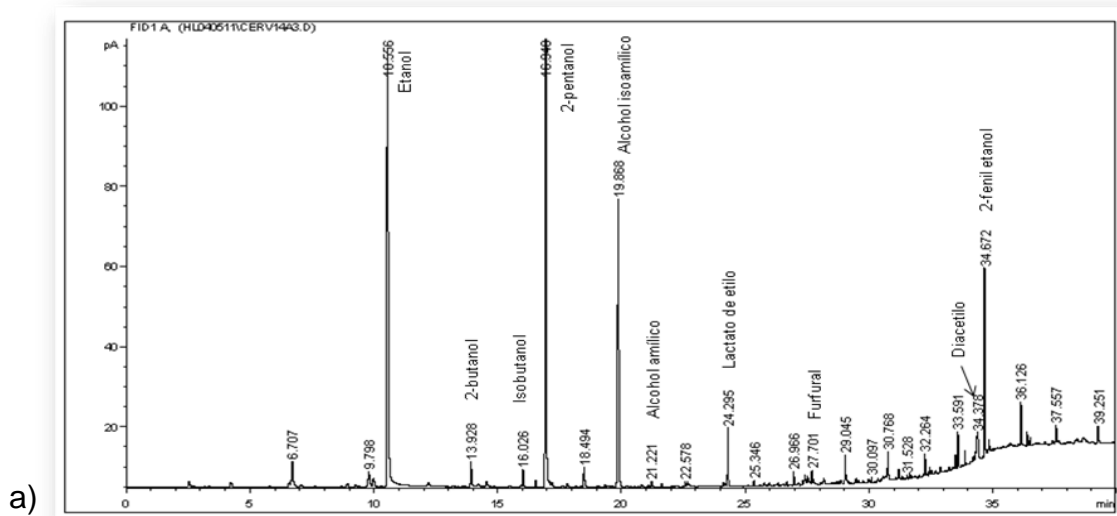
C) Concentración de los compuestos congénéricos en ppm

Concentraciones iniciales (ppm)			
	F1	F2	F3
Compuestos carbonílicos			
Acetaldehído	0.000	315.524	1025.844
Diacetilo	1.366	0.000	0.000
Furfural	0.652	0.533	0.000
Ésteres			
Acetato de etilo	24.311	25.563	27.330
Lactato de etilo	15.385	16.074	17.320
Ácido Orgánico			
Acido acético	78.825	195.724	198.981
Alcoholes superiores			
2-butanol	1.670	2.512	1.974
1-propanol	1.4087	1.4171	3.662
Isobutanol	4.589	4.924	5.537
Alcohol isoamílico	4.897	8.389	12.702
Alcohol amílico	0.814	0.825	0.847
2-fenil etanol	0.000	0.000	0.000

Concentración final (ppm)			
	F1	F2	F3
Compuestos carbonílicos			
Acetaldehído	301.876	429.030	1335.31975
Diacetilo	1.319	0.000	0.00000
Furfural	0.985	0.113	0.00000
Ésteres			
Acetato de etilo	56.900	66.578	72.29220
Lactato de etilo	13.299	15.507	16.86798
Ácidos Orgánicos			
Acido acético	1423.057	8241.463	13098.65536
Alcoholes superiores			
2-butanol	0.507	0.507	0.50725
1-propanol	17.297	49.874	29.861
Isobutanol	11.641	18.816	13.85202
Alcohol isoamílico	48.063	82.416	63.34393
Alcohol amílico	0.770	0.813	0.87878
2-fenil etanol	17.090	4.302	0.00000

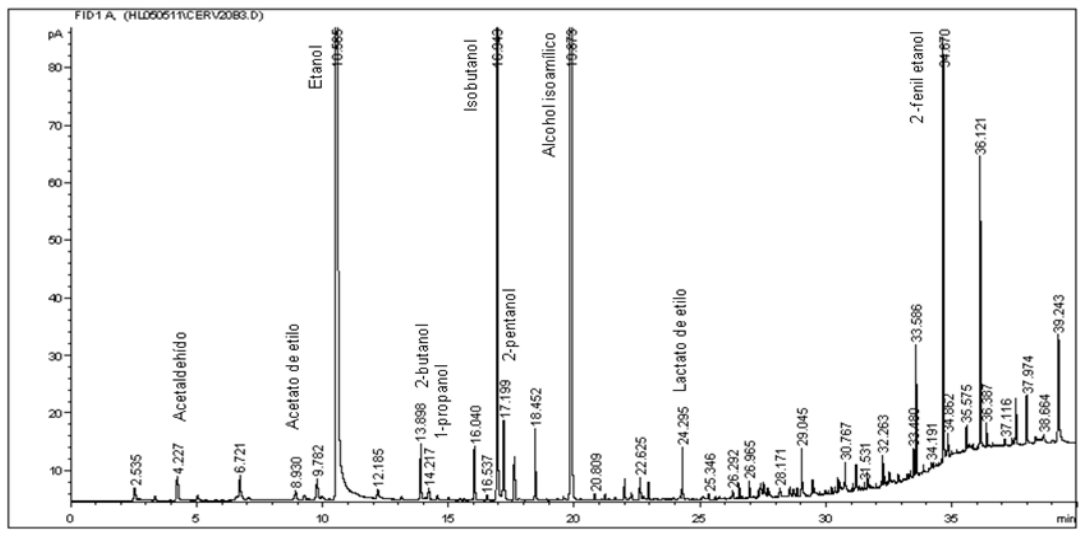
D) Cromatogramas.

Cromatogramas. Fermentación a partir de F1 (15.67°P)

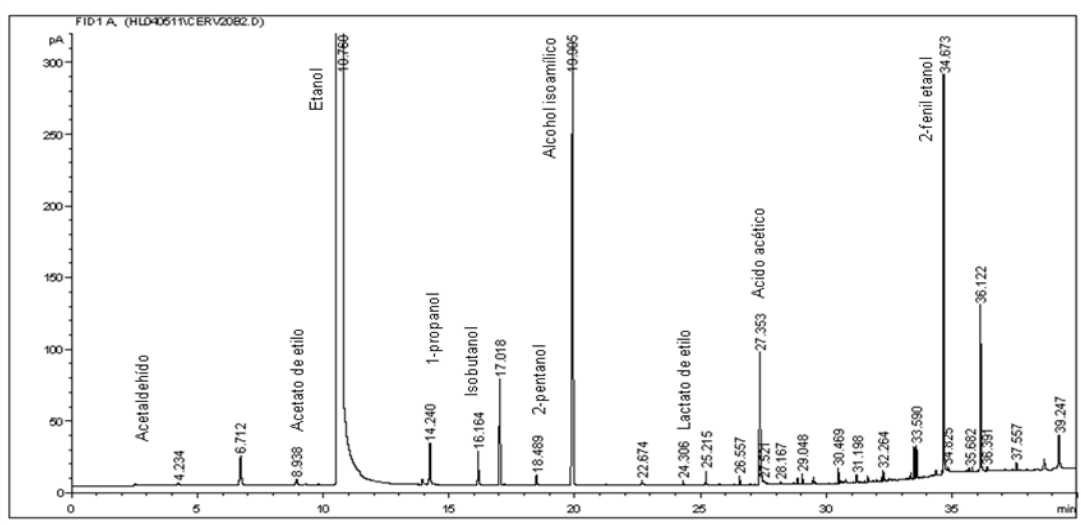


Cromatogramas a) fermentación F1 al inicio de la fermentación b) fermentación F1 al final de la fermentación. MEFS-EC. Fibra PDMS/DVB 65µm. Extracción: 7 minutos, 60°C, 80% NaCl, agitación 1400rpm . Desorción: 5 minutos a 40 °C, se estableció un gradiente de 5 °C/min hasta alcanzar 140 °C y posteriormente se volvió incrementar a 10 °C/ min hasta 240 °C y permaneciendo así la temperatura durante un periodo de 5 min. La temperatura del inyector de 250 °C, relación de *split* 1:5 , gas portador Hidrógeno a un flujo de 40 mL/min, el aire a 400 mL/min y el Nitrógeno a 30 mL/min; detector FID y una columna Carbowax/BTR (Quadrex) empacada con un tamaño de partícula de 1µm 60m x 0.25mm.

Cromatogramas. Fermentación a partir de F2 (20.67°P)



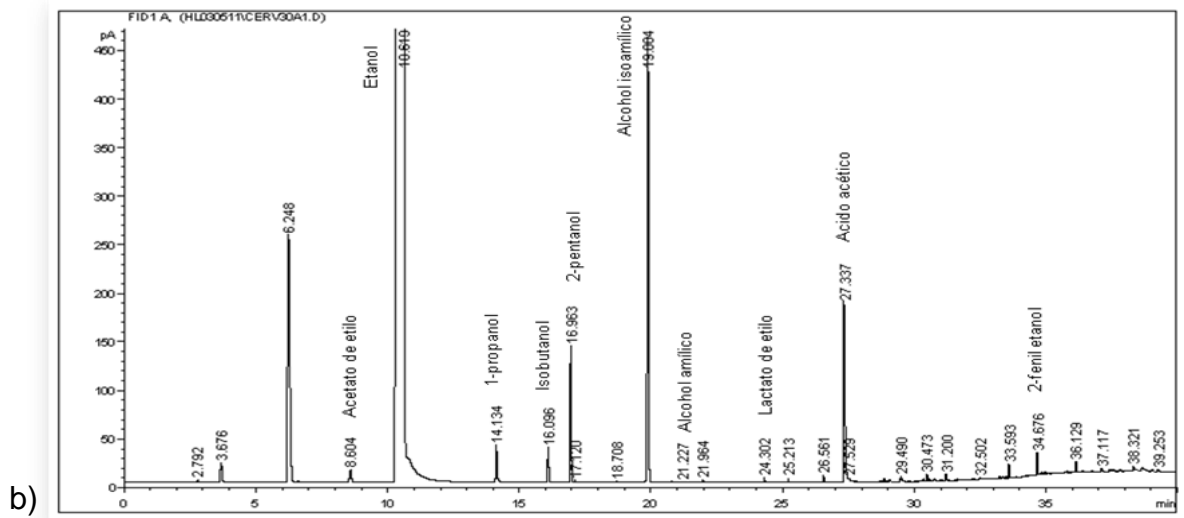
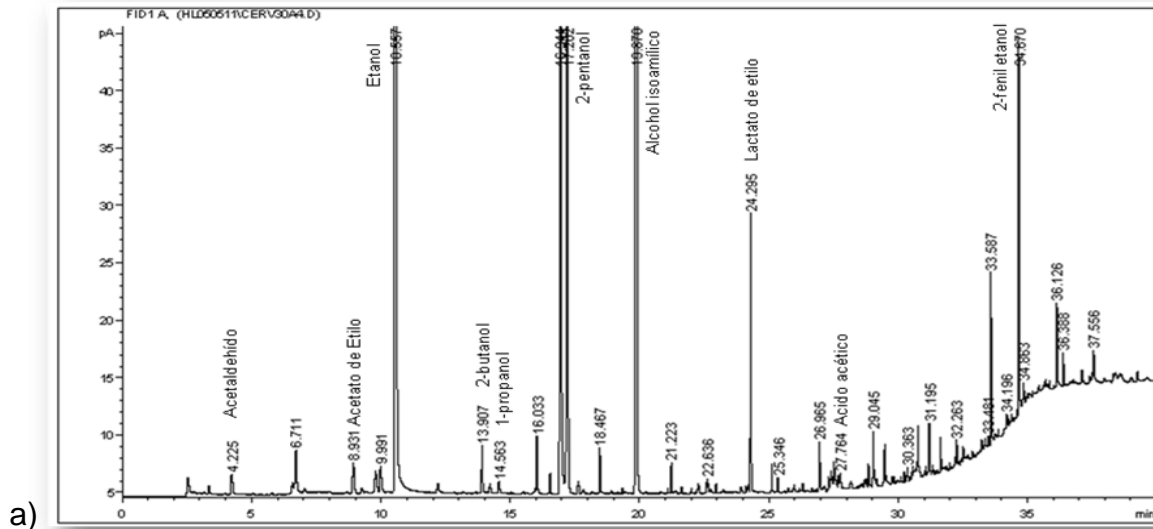
a)



b)

Cromatogramas a) fermentación F2 al inicio de la fermentación b) fermentación F2 al final de la fermentación MEFS-EC. Fibra PDMS/DVB 65µm. Extracción: 7 minutos, 60°C, 80% NaCl, agitación 1400rpm . Desorción: 5 minutos a 40 °C, se estableció un gradiente de 5 °C/min hasta alcanzar 140 °C y posteriormente se volvió incrementar a 10 °C/ min hasta 240 °C y permaneciendo así la temperatura durante un periodo de 5 min. La temperatura del inyector de 250 °C, relación de *split* 1:5 , gas portador Hidrógeno a un flujo de 40 mL/min, el aire a 400 mL/min y el Nitrógeno a 30 mL/min; detector FID y una columna Carbowax/BTR (Quadrex) empacada con un tamaño de partícula de 1µm 60m x 0.25mm

Cromatogramas. Fermentación a partir de F3 (29.8°P)



Cromatogramas: a) fermentación F3 al inicio de la fermentación b) fermentación F3 al final de la fermentación MEFS-EC. Fibra PDMS/DVB 65µm. Extracción: 7 minutos, 60°C, 80% NaCl, agitación 1400rpm . Desorción: 5 minutos a 40 °C, se estableció un gradiente de 5 °C/min hasta alcanzar 140 °C y posteriormente se volvió incrementar a 10 °C/ min hasta 240 °C y permaneciendo así la temperatura durante un periodo de 5 min. La temperatura del inyector de 250 °C, relación de *split* 1:5 , gas portador Hidrógeno a un flujo de 40 mL/min, el aire a 400 mL/min y el Nitrógeno a 30 mL/min; detector FID y una columna Carbowax/BTR (Quadrex) empacada con un tamaño de partícula de 1µm 60m x 0.25mm.

E) Análisis de varianza de la comparación entre distintas fibras para MEFS-EC.

Alcoholes Superiores.

Sea F1: Fibra PDMS/DVB

F2: Fibra CW/DVB

F3: Fibra Poliacrilato

Ho: F1=F2=F3

Hi: Al menos una sea Diferente

2- butanol

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio MC	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	7851.10	2.00	3364.76	6.35	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	2473.16	4.00	618.29				
Total	10324.25	6.00					

1-propanol

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio MC	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	471.94	2.00	235.97	2.75	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	343.25	4.00	85.81				
Total	815.18	6.00					

isobutanol

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio MC	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	61.86	2.00	30.93	2.07	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	59.88	4.00	14.97				
Total	121.75	6.00					

Alcohol isoamílico

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio MC	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	2576.80	2.00	1288.40	1.57	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	3283.25	4.00	820.81				
Total	5860.05	6.00					

Alcohol amílico

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio MC	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	4.71	2.00	2.36	2.59	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	3.64	4.00	0.91				
Total	8.35	6.00					

2-fenil etanol

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio MC	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	243.35	2.00	121.68	1.70	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	286.13	4.00	71.53				
Total	529.48	6.00					

Carbonilos.

Sea F1: Fibra PDMS/DVB

F2: Fibra CW/DVB

F3: Fibra Poliacrilato

Ho: F1=F2=F3

Hi: Al menos una sea Diferente

Acetaldehído

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio CM	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	18.54	2.00	9.27	1.00	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	37.09	4.00	9.27				
Total	55.63	6.00					

Diacetilo

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio CM	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	1882.47	2.00	941.23	1.00	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	3764.93	4.00	941.23				
Total	55.63	6.00					

Furfural

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio CM	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	0.11	2.00	0.06	1.00	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	0.11	4.00	0.06				
Total	0.34	6.00					

Ésteres y ácidos orgánicos

Sea F1: Fibra PDMS/DVB

F2: Fibra CW/DVB

F3: Fibra Poliacrilato

Ho: F1=F2=F3

Hi: Al menos una sea Diferente

Acetato de etilo

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio CM	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	203.30	2.00	101.65	0.86	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	472.51	4.00	118.13				
Total	675.81	6.00					

Lactato de etilo

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio CM	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	19.76	2.00	9.88	3.98	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	9.99	4.00	2.50				
Total	29.75	6.00					

Acido Acético

	Suma de Cuadrados SC	Grados de libertad gl	Cuadrados medio CM	FC	Ft	Crit	Decisión
Fibra	29713.46	2.00	14856.73	0.41	6.94	Fc<Ft	Ho Acepta
Error	144481.38	4.00	36120.34				
Total	174194.84	6.00					

“Sin lugar a duda el mejor invento en la historia de la humanidad es la cerveza.

Bueno reconozco que la rueda es un buen invento pero no va bien con la pizza”

(Dave Barry)

