

**EFFECTO DE LOS PARÁMETROS DE PROCESAMIENTO
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
VOLÁTILES DE LA CERVEZA: CARACTERIZACIÓN
MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA (SPME) Y CROMATOGRAFÍA DE GAS
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GS-MS)**

por

Gustavo Charry Parra

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
en
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Fernando Pérez Muñoz, PhD
Presidente, Comité graduado

Fecha

Maritza de Jesús Echevarría, M.S
Co-Presidente, Comité graduado

Fecha

José Dumas, PhD
Miembro, Comité graduado

Fecha

Javier Huertas Miranda, M.S
Miembro, Comité graduado

Fecha

José Colucci, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, PhD
Directora del Departamento

Fecha

Derechos de Autor Reservados ©

Gustavo Charry Parra

2009

ABSTRACT

We validated a technique for characterization of volatile compounds in beer using solid phase micro-extraction and gas chromatograph coupled to a mass spectrometer and a flame ionization detector. An exposure time of 45 minutes with PDMS fiber in the headspace of the sample reached the equilibrium of the phases. A desorption time of 15 minutes in the gas chromatograph injector was enough for the fiber desorbed the target compounds. The study's main objective was to assess how some operational and formulation parameters affect the formation of volatile compounds during beer fermentation on an industrial scale. For the fermentation conditions studied, we found that when you increase wort glucose content and a decrease in pitching rate in the fermentation lead to a significant reduction in the concentrations of higher alcohols ($P < 0.1$) compared to control. The sensory panel only found significant differences between the beers produced with lower pitching rate and control.

RESUMEN

Se validó una técnica para la identificación y cuantificación de compuestos volátiles en cerveza por micro-extracción en fase sólida (SPME) y un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masas y a un ionizador de llama. Se encontró que se alcanzó el equilibrio de las fases para un tiempo de exposición de 45 minutos con la fibra PDMS en el espacio gaseoso de la muestra. Un tiempo de desorción de 15 minutos en el inyector del cromatógrafo fue suficiente para que la fibra desorbiera la totalidad de los compuestos de interés. El objetivo principal de este estudio fue evaluar como algunos factores de operación y formulación afectan la formación de alcoholes superiores y ésteres durante la fermentación de cerveza a escala industrial. Para las condiciones de fermentación estudiadas, se encontró que cuando se cambió el perfil de azúcares del mosto (mayor cantidad de glucosa), o se disminuye la cantidad de levadura inicial en el fermentador, las concentración de alcoholes superiores se reduce significativamente ($P < 0.1$) respecto del control. El panel sensorial solo encontró diferencia significativa entre las cervezas producidas cuando se adicionó menor cantidad de levadura inicial y el control.

A mi familia que durante toda mi vida me han apoyado.

A mi esposa por los maravillosos momentos juntos, por su cariño y comprensión.

A mis amigos por su colaboración.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Dr. Fernando Pérez Muñoz por aceptar ser el presidente del comité graduado. Gracias por toda su asesoría y colaboración en la coordinación del proyecto y haber confiado en que podría realizar el proyecto. Gracias por toda su paciencia.

Muchas gracias a la profesora Maritza de Jesús-Echevarría por todo el tiempo invertido en el adiestramiento de los equipos y las técnicas analíticas para poder realizar los análisis de compuestos volátiles y permitirme utilizar las facilidades de su laboratorio. Su experiencia, dedicación y sabiduría han sido de gran ayuda durante estos años. Gracias por todos sus consejos y enseñanzas.

Dr. José Dumas por formar parte a mi comité, por permitirme utilizar las facilidades de su laboratorio y adiestrarme en el manejo de equipos para análisis.

Al Prof. Javier Huertas por formar parte de mi comité graduado y por sus consejos para la investigación a nivel industrial.

Quiero agradecer de forma especial a la Cervecería India Inc. por el financiamiento del proyecto. Muchas gracias a los maestros cerveceros de la Cervecería India Inc., el Sr. Carlos Agelvis, Sr. Henry Mora y Sr. Daniel Stammberger por darme la oportunidad de trabajar en sus facilidades en un proyecto innovador. Gracias por confiar en que sería capaz de realizar el proyecto y por servir de panelistas en las evaluaciones sensoriales. Gracias al Sr. Henry Mora por ayudar en mi formación como profesional y adiéstrame en todas las técnicas de análisis y funcionamiento de equipos. Muchas gracias a todos los analistas, operadores y supervisores por su colaboración durante la experimentación.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	III
RESUMEN	IV
AGRADECIMIENTOS	VI
TABLA DE CONTENIDO	VII
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE GRÁFICAS.....	XII
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 JUSTIFICACIÓN	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 <i>General</i>	3
1.2.2 <i>Específicos</i>	3
2 REVISIÓN LITERARIA	4
2.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA CERVEZA	4
2.2 FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LA CERVEZA	5
2.2.1 <i>Características de la levadura</i>	10
2.2.1.1 Cepa de levadura	10
2.2.1.2 Cantidad de levadura	10
2.2.1.3 Estado fisiológico de la levadura	11
2.2.2 <i>Composición del medio de fermentación</i>	12
2.2.2.1 Gravedad específica del mosto	12
2.2.2.2 Perfil de azúcar	13
2.2.2.3 Contenido de nitrógeno del mosto	13
2.2.2.4 Oxigenación del mosto	14
2.2.2.5 Contenido de lípidos.....	15
2.2.2.6 Zinc	15
2.2.3 <i>Condiciones de fermentación</i>	15
2.2.3.1 Agitación	15
2.2.3.2 Temperatura de fermentación	16
2.2.3.3 Diseño del fermentador	16
2.2.3.4 Presión del fermentador.....	17

2.3	ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR SPME/GC/MS/FID	19
2.3.1	<i>Extracción de compuestos volátiles de la cerveza por SPME/HS</i>	23
2.3.1.1	Agitación	24
2.3.1.2	Temperatura	24
2.3.1.3	Adición de sal.....	25
2.3.1.4	Fibra	25
2.3.1.5	Tiempo de extracción	26
2.3.1.6	Volumen de la muestra.....	27
2.3.2	<i>Instrumentación analítica en identificación de los compuestos volátiles</i>	27
3	MATERIALES Y METODOS	29
3.1	MATERIA PRIMA Y FERMENTADOR:.....	29
3.1.1	<i>Microorganismo</i>	29
3.1.2	<i>Mosto</i>	29
3.1.3	<i>Fermentador</i>	29
3.2	FACTORES QUE AFECTAN LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES	30
3.2.1	<i>Amino ácidos libres (FAN)</i>	30
3.2.2	<i>Perfil de azúcares fermentables</i>	30
3.2.3	<i>Oxígeno disuelto (DO) en el mosto</i>	33
3.2.4	<i>Cantidad de levadura adicionada</i>	34
3.2.5	<i>Cantidad de CO₂ disuelto en el medio</i>	35
3.2.6	<i>Análisis estadístico</i>	36
3.3	TÉCNICAS DE ANÁLISIS	37
3.3.1	<i>Viabilidad de la levadura o conteo de células muertas</i>	37
3.3.2	<i>pH, cantidad de extracto (°P) y contenido de etanol</i>	38
3.3.3	<i>Análisis de azúcares fermentables</i>	38
3.3.4	<i>Análisis de compuestos volátiles por SPME/GC-MS/FID</i>	40
3.3.4.1	Optimización de la extracción de los compuestos del espacio gaseoso por Micro-extracción en fase sólida (SPME).....	40
3.3.4.2	Análisis Cromatográfico GC-MS	44
3.3.4.3	Cuantificación de compuestos volátiles por SPME/GC/FID	46
3.3.5	<i>Evaluación Sensorial</i>	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1	ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES POR SPME/GC-MS/FID	53
4.1.1	<i>Optimización de parámetros de extracción por SPME</i>	53
4.1.1.1	Tipo de fibra.....	53
4.1.1.2	Tiempo de desorción	54

4.1.1.3	Tiempo de extracción	60
4.1.2	<i>Cuantificación de los compuestos volátiles por SPME/GC/FID</i>	63
4.2	EFEECTO DE LA ENZIMA GLUCOAMILASA EN EL PERFIL DE AZÚCARES FERMENTABLES	66
4.3	FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	71
4.3.1	<i>Cantidad de CO₂ disuelto en el medio</i>	71
4.3.2	<i>Amino ácidos libres (FAN)</i>	76
4.3.3	<i>Perfil de azúcares fermentables</i>	80
4.3.4	<i>Oxígeno disuelto en el mosto</i>	84
4.3.5	<i>Cantidad de levadura adicionada</i>	84
4.4	FORMACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.....	87
4.5	EVALUACIÓN SENSORIAL.....	92
5	CONCLUSIONES.....	97
6	FUTUROS TRABAJOS Y/O RECOMENDACIONES	102
7	REFERENCIAS	103
	APÉNDICES	108

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores afectan la formación de alcoholes superiores y ésteres durante la fermentación.	19
Tabla 2. Experimentos con glucoamilasa para producir mostos con alto contenido en glucosa	32
Tabla 3. Concentraciones de los azúcares fermentables de la solución primaria para la curva de calibración para HPLC.....	39
Tabla 4. Concentraciones de los estándares para las curva de calibración de los azúcares fermentables analizados.....	40
Tabla 5. Volumen adicionado de cada compuesto en la solución primaria para la optimización del método HS/SPME	41
Tabla 6. Concentraciones de los compuestos volátiles de interés en la solución estándar para la optimización de los parámetros de SPME	42
Tabla 7. Concentración de cada solución primaria para cada compuesto analizado para la cuantificación de compuestos volátiles por SPME/GC/FID.....	48
Tabla 8. Concentraciones de los compuestos volátiles de interés en la solución estándar para la cuantificación por GC/FID.....	48
Tabla 9. Concentraciones de los compuestos deseados en la solución estándar para determinar el % de recuperación de cada compuesto.	50
Tabla 10. Tiempos de retención para los compuestos volátiles de interés para las fibras PDMS y CAR/PDMS en GC/MS	55
Tabla 11. Tiempos de retención y factor de respuesta relativa para la cuantificación de los compuestos volátiles de interés por GC/FID	64
Tabla 12. % de recuperación para los compuestos volátiles de interés cuantificados por la metodología SPME/GC/FID.....	66
Tabla 13. Concentraciones promedio de alcoholes superiores y ésteres para los diferentes tratamientos.....	91
Tabla 14. Puntaje promedio para el análisis sensorial descriptivo	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de la elaboración de la cerveza	5
Figura 2. Rutas metabólicas para la síntesis de alcoholes superiores y ésteres	7
Figura 3. Cromatogramas total de iones (TIC) para las fibras escogidas el análisis de compuestos volátiles en cerveza.	54
Figura 4. Cromatograma de iones totales de la mezcla preparada con los estándares de los compuestos volátiles de interés para la fibra CAR/PDMS con un tiempo de desorción de 10 minutos.....	56
Figura 5. Cromatograma de iones totales para la fibra CAR/PDMS con diferentes tiempos de desorción para la extracción de los compuestos volátiles de interés en la cerveza	57
Figura 6. Cromatograma de iones totales de la mezcla preparada con los estándares de los compuestos volátiles de interés para la fibra PDMS con un tiempo de desorción de 5 minutos.....	58
Figura 7. Cromatograma de iones totales para la fibra PDMS con diferentes tiempos de desorción para la extracción de los compuestos volátiles de interés en la cerveza. 30 minutos de tiempo de exposición.....	59
Figura 8. Cromatograma de iones totales para la fibra PDMS con diferentes tiempos de desorción para la extracción de los compuestos volátiles de interés en la cerveza. 45 minutos de tiempo de exposición.....	60
Figura 9. Cromatograma del detector de ionización de llama para la mezcla preparada con los estándares de los compuestos volátiles de interés para la fibra PDMS con un tiempo de desorción de 15 minutos y un tiempo de exposición de 45 min.	65

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de equilibrio para los compuestos volátiles de interés presentes en cerveza con la fibra escogida (PDMS).....	61
Gráfica 2. Curva de equilibrio para el compuesto etil acetato con la fibra escogida (PDMS)	61
Gráfica 3. Curva de equilibrio el compuesto 2-fenil-etil acetato para la fibra PDMS.....	62
Gráfica 4. Tiempo de equilibrio entre el líquido y la fase gaseosa antes de ser expuesta la fibra a la muestra.....	63
Gráfica 5. Efecto en la concentración de azúcares fermentables en el mosto con la adición de glucosamilasa durante la maceración (30 min a 65°C).....	67
Gráfica 6. Efecto en la concentración de azúcares fermentables debido al aumento en el tiempo de maceración (60min a 65°C) y adición de glucoamilasa.....	68
Gráfica 7. Efecto en la concentración de azúcares fermentables debido al aumento en el tiempo de maceración (120min a 65°C) y adición de glucoamilasa.....	69
Gráfica 8. Efecto en la concentración de azúcares fermentables debido al aumento en el tiempo de maceración.	70
Gráfica 9. Efecto en la concentración de azúcares fermentables en el mosto debido a la adición de glucoamilasa con un descanso de 90min a 65°C al inicio de la ebullición. .	71
Gráfica 10. Formación de compuestos volátiles durante la fermentación de la cerveza. A partir de mosto con 13.5 °P, temperatura de fermentación 15°C, levadura inicial 21 millones de células/mlmosto.....	74
Gráfica 11. Formación de Isoamil acetato y su alcohol superior precursor (Isoamil alcohol) durante la fermentación de la cerveza.....	75
Gráfica 12. Contenido de amino nitrógeno libre "FAN", en los diferentes mostos producidos con los diferentes parámetros cambiados.	77
Gráfica 13. Color de los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado.....	78
Gráfica 14. Consumo de amino nitrógeno libre "FAN" de los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado	79
Gráfica 15. Concentraciones de los azúcares fermentables (%w/v) presentes en el mosto para los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado.....	81

Gráfica 16. Cantidad de extracto °P presente en el mosto para los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado.....	82
Gráfica 17. Porcentaje de alcohol al final de la fermentación para los diferentes mostos producidos.....	82
Gráfica 18. Oxígeno disuelto en el mosto para los diferentes tratamientos realizados	84
Gráfica 19. Cantidad inicial de levadura en las fermentaciones para los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado.....	85
Gráfica 20. Disminución de pH durante la fermentación para los diferentes tratamientos realizados.	86
Gráfica 21. Concentración de alcoholes superiores en las cervezas para los diferentes tratamientos realizados.....	91
Gráfica 22. Concentración de ésteres en las cervezas para los diferentes tratamientos realizados	92
Gráfica 23. Evaluación sensorial diferencial para las cervezas producidas para los diferentes tratamientos realizados.....	93
Gráfica 24. Evaluación sensorial descriptivo para los atributos sensoriales dados por los alcoholes superiores para las cervezas producidas para los diferentes tratamientos realizados	95
Gráfica 25. Evaluación sensorial descriptivo para los atributos sensoriales dados por los ésteres para las cervezas producidas para los diferentes tratamientos realizados.....	95

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

Uno de los procesos más importantes durante la producción de la cerveza es la fermentación alcohólica. Durante ésta, los azúcares fermentables en el mosto son transformados a etanol, dióxido de carbono y otros compuestos que aportan aroma y sabor al producto final (Trelea et al., 2004). Compuestos volátiles como alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, entre otros son excretados por la levadura como subproductos de su crecimiento y metabolismo (Smart 2003). La gran mayoría de estos están en concentraciones cerca del umbral de detección. Por lo tanto, pequeños cambios en su concentración podrían tener efectos en el sabor de la cerveza (Verstrepen et al., 2003).

Los factores que influyen la producción de estos compuestos volátiles se pueden clasificar en tres grupos: características de la levadura, composición del mosto y condiciones de operación (Smart 2003). Algunos de estos factores a escala industrial son determinados experimentalmente, haciendo que cada producto y proceso sea único y muchas veces confidencial (Trelea et al., 2004). Además, la variación de ellos a nivel industrial, está determinada por las limitaciones técnicas y económicas del proceso. Se ha sugerido que para predecir su efecto a escala industrial, los mostos utilizados se deben producir a una escala de por lo menos 100hl (Meilgaard, 2000). Por lo tanto, los niveles de algunos factores que afectan la formación de compuestos volátiles durante la fermentación, evaluados a escala de laboratorio, no siempre influenciarán en igual medida a escala industrial.

La hipótesis es que al entender el efecto de estos factores sobre la producción de alcoholes superiores, ésteres y aldehídos durante la fermentación a escala industrial, podemos controlar la calidad del producto final. Se utilizarán métodos de análisis químicos y organolépticos para determinar su efecto.

1.2 Objetivos

1.2.1 General

Evaluar la influencia de algunos factores de operación y formulación en la formación de alcoholes superiores y ésteres durante la fermentación de cerveza a escala industrial. Los factores a evaluar incluyen: contenido de amino nitrógeno libre en el mosto, perfil de azúcares en el medio de fermentación, cantidad inicial de oxígeno disuelto en el mosto, cantidad inicial de levadura adicionada y remoción de CO₂ del medio de fermentación.

1.2.2 Específicos

- Validar una metodología SPME/GC/MS/FID para la identificación y cuantificación de algunos alcoholes superiores, ésteres y aldehídos presentes en la cerveza durante su procesamiento
- Determinar las condiciones adecuadas para la enzima glucoamilasa con el fin de modificar el perfil de azúcares del mosto.
- Determinar si aumentar la aeración del mosto aumenta la cantidad de oxígeno disuelto del mosto.
- Describir como ocurre la razón de formación de alcoholes superiores y ésteres por la levadura durante la fermentación.

2 Revisión literaria

2.1 Proceso de producción de la cerveza

Como se observa en la figura 1, el proceso de elaboración de la cerveza comienza con el molido de la materia prima: cebada malteada y otros cereales (que comúnmente se les conoce como adjuntos). Es necesario reducir el tamaño del grano para optimizar las transformaciones de estos en las próximas etapas y mejorar la solubilidad del material extraíble. Luego, la materia prima entra a la primera etapa de la producción del mosto, la maceración. Durante la maceración se produce y se extrae la mayor cantidad de azúcares fermentables y aminoácidos a partir de la cebada malteada y de los adjuntos. En esta etapa se mezcla la harina de los granos con agua y se calienta para permitir la degradación enzimática de los polisacáridos y las proteínas. Luego de la maceración, el líquido que sale de este (comúnmente llamado mosto) es filtrado con un filtro prensa. Se adiciona agua para poder remover la mayor cantidad de azúcar del sólido que permanece en el filtro; resultando en la dilución del mosto (Lea y Piggott, 2003).

Posteriormente el mosto entra a la etapa de ebullición, donde es calentado cerca de los 100°C por un periodo de tiempo determinado. Durante esta etapa se inactivan enzimas, se concentra el mosto y se precipitan coágulos de proteína insoluble. También durante esta operación se adiciona el lúpulo, el cual le imparte el carácter amargo al producto final. El mosto caliente es clarificado para remover todo el sólido que no se disolvió durante la ebullición y el mosto es enfriado, aireado e inoculado con levadura antes de entrar al fermentador (Lea y Piggott, 2003).

Durante la fermentación, los azúcares fermentables son consumidos por la levadura para producir etanol, dióxido de carbono y otros subproductos de su metabolismo y crecimiento como los alcoholes superiores y ésteres. Estos últimos grupos de compuestos aportan al sabor y aroma del producto final. Luego de la fermentación, la levadura floculada se retira y la cerveza se enfría para entrar a la etapa de maduración. En la maduración algunos compuestos

indeseables de aroma son reducidos y se termina de flocular la levadura que aún permanece en solución. La cerveza que sale del tanque es filtrada y diluida a la cantidad de etanol deseado en el producto final. Finalmente, la cerveza es pasteurizada y embotellada para su distribución al consumidor final (Lea y Piggott, 2003).

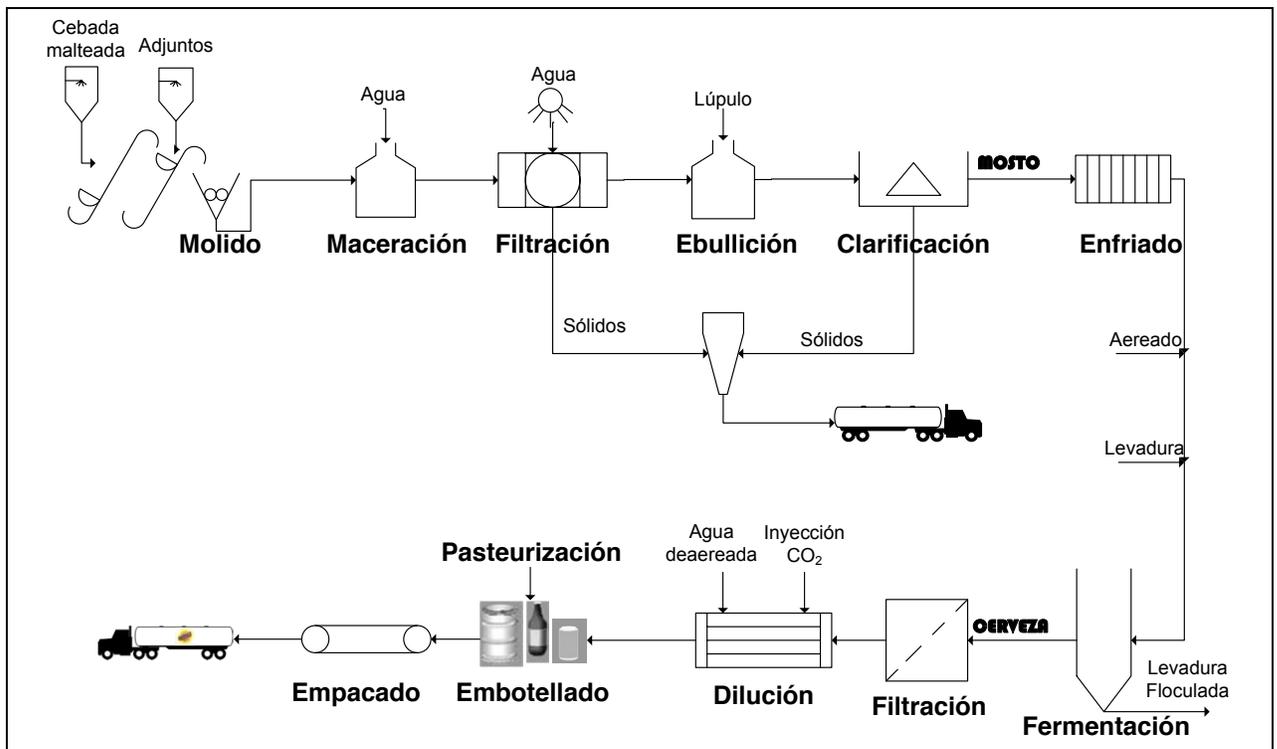


Figura 1. Proceso de la elaboración de la cerveza

2.2 Formación de compuestos volátiles durante la fermentación de la cerveza

Los alcoholes superiores pueden ser formados como subproductos de las rutas metabólicas de biosíntesis y destrucción de aminoácidos (Shen et al., 2004; Willaert et al., 2006). La ruta catabólica (también llamada ruta Ehrlich) es predominante, hasta el momento que no existan más aminoácidos en el medio de fermentación (Shen et al., 2004; Inoue et al., 1995). El consumo de aminoácidos por la levadura se realiza para el crecimiento celular durante la etapa inicial de la fermentación, produciéndose variedades de compuestos volátiles como alcoholes superiores y aldehídos (Inoue et al., 1995). Luego del agotamiento de los

aminoácidos, la formación de alcoholes superiores puede surgir a través de la biosíntesis de aminoácidos; la cual ocurre a partir del metabolismo de los azúcares fermentables. Por tanto, la concentración final de alcoholes superiores es determinada por la eficiencia de consumo de sus correspondientes aminoácidos y la utilización de los azúcares fermentables (Shen et al., 2004). Al final del crecimiento celular, la producción de alcoholes superiores cesa y la concentración de algunos de estos compuestos decrece, por consiguiente, el crecimiento celular es mejor indicador del sabor de la cerveza que el consumo de azúcares fermentables del medio de fermentación (Inoue et al., 1995).

Los alcoholes superiores son una parte importante de los subproductos formados durante la fermentación del mosto ya que aportan al sabor final de la cerveza. Por el contrario, el etanol, siendo el mayor producto de la fermentación, tiene un pequeño impacto en el sabor final de la cerveza (Šmogroviová y Dömény, 1999). Los alcoholes superiores producidos por la levadura se pueden clasificar en: alifáticos, como n-propanol, 2-metil butanol o isobutanol; y aromáticos, como 2-fenil etanol (Willaert et al., 2006). Estos compuestos pueden tener efectos positivos o negativos en el aroma y sabor del producto. Concentraciones excesivas de alcoholes superiores en la cerveza (mayores a 300 ppm) pueden resultar en un sabor fuerte y picante, mientras que los niveles óptimos le pueden dar un carácter frutal (Rodrigues et al., 2008).

Por otro lado, los ésteres volátiles se producen intracelularmente, por la reacción entre el acetil coenzima A (Acetil CoA) y un alcohol superior, catalizados por la enzima alcohol acetil transferasa (AA transferasa). La concentración de los sustratos y la actividad de la enzima, son factores importantes a considerar para la formación de ésteres (Verstrepen et al., 2003). Por ejemplo, la enzima alcohol acetil transferasa es fuertemente inhibida por la presencia de ácidos grasos insaturados y la excesiva oxigenación del mosto (Kumara et al., 1995). También, el acetil CoA se usa en numerosas reacciones dentro de la célula, incluyendo la biosíntesis de lípidos y aminoácidos (Smart, 2003). Parece que la formación de ésteres no está relacionada con el crecimiento celular (García et al., 1994).

Los ésteres activos más importantes que aportan sabor a la cerveza son: etil acetato, isoamil acetato, etil caproato, 2-fenil etil acetato. El isoamil acetato es considerado el mayor contribuidor al sabor afrutado de la cerveza, debido a que se encuentra en concentraciones por encima del límite de detección humano (Smart, 2003).

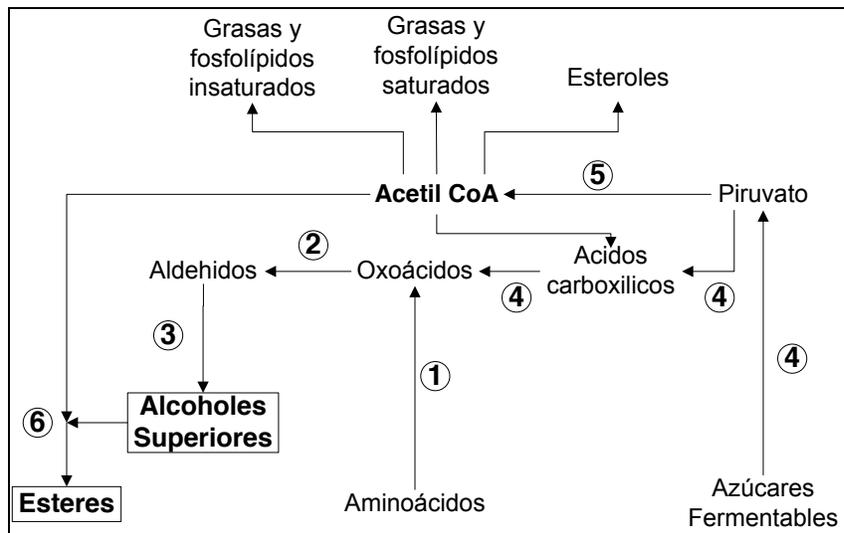


Figura 2. Rutas metabólicas para la síntesis de alcoholes superiores y ésteres

En la figura 2, se encuentran las rutas metabólicas que ocurren dentro de la célula para la formación de alcoholes superiores y ésteres. La formación de alcoholes superiores por la ruta de “Ehrlich”, comienza con una (1) reacción de transaminación de los aminoácidos, resultando en un “pool” de oxoácidos. Luego, estos últimos son (2) decarboxilados a aldehídos y finalmente (3) reducidos a sus correspondientes alcoholes superiores (Smart, 2003). Como se indicó con anterioridad, esta ruta catabólica es predominante cuando la fuente externa de aminoácidos es suficiente. La formación de alcoholes superiores por la (4) síntesis de aminoácidos se diferencia de la anterior, en que los oxoácidos son derivados del metabolismo de los azúcares fermentables (Shen et al., 2004).

La síntesis de ésteres por la levadura durante la fermentación, ocurre por la (6) reacción entre un alcohol superior y acetil CoA, catalizada por la enzima alcohol acetil transferasa. La mayor cantidad de (5) acetil CoA surge de la decarboxilación del piruvato produciéndose acetaldehído, que luego se transforma a acetato gracias a la enzima acetaldehído

deshidrogenasa y finalmente es activado con ATP formando acetil CoA (Smart, 2003). El acetil CoA también se usa en numerosas reacciones dentro de la célula, incluyendo la biosíntesis de lípidos y aminoácidos. Por lo tanto, su disponibilidad afectará la formación de ésteres por la levadura. Por ejemplo, si al medio de fermentación se añaden ácidos grasos saturados de cadena larga, estos son transportados al interior de la levadura e incorporados a la membrana celular, reduciendo el uso del acetil CoA celular para la síntesis de ácidos grasos y dejándolo disponible para la formación de ésteres. Por el contrario, un crecimiento celular excesivo conllevará a utilizar el acetil CoA celular en la formación de nueva biomasa; dejándolo poco disponible para la formación de ésteres (Smart, 2003). Por otro lado, la enzima alcohol acetil transferasa es fuertemente inhibida por la presencia de ácidos grasos insaturados en el medio de fermentación, por lo tanto, mostos no clarificados tienen alto contenido de lípidos, afectando la producción de ésteres por la levadura durante la fermentación (Kumara et al., 1995; Verstrepen et al., 2003)

Pueden existir otros tipos de reacciones fuera de la célula para la formación de ésteres a partir de alcohol y acetil CoA, pero estas son 1000 veces más lentas que las reacciones intracelulares para la formación de ésteres, por lo cual no son consideradas (García et al., 1994).

A diferencia de los alcoholes superiores, los ésteres son producidos durante la etapa de crecimiento (60%) y la fase estacionaria (40%) de la levadura (Willaert et al., 2006). Al comienzo de la fermentación, la formación de ésteres ocurre muy lentamente. Esto se debe a la baja disponibilidad del acetil CoA, ya que es usado por completo para el crecimiento de la levadura. Además, la baja actividad de la enzima AA transferasa y la cantidad insuficiente de alcoholes de cadena larga también contribuyen a la poca formación de ésteres. Se ha evidenciado que la rápida formación de ésteres de acetato al modificar las condiciones de fermentación, como la gravedad del mosto, muestra que los niveles de acetil CoA en la célula no cambian considerablemente, por lo cual parece que éste no es un factor determinante (Yoshioka y Hashimoto, 1983b).

Se cree que durante la etapa aeróbica de la fermentación del mosto el ciclo de ácido tricarbónico es operado en la célula y el acetil CoA es metabolizado por este ciclo, mientras que durante la etapa anaerobia de la fermentación el acetil CoA puede formar ésteres con los alcoholes superiores. Por lo tanto, el periodo de formación y concentración de ésteres corresponde a la cantidad de tiempo y la concentración de azúcares fermentables remanentes al final del consumo de oxígeno. Es decir, la formación variará dependiendo de las variaciones en el tiempo en el cual cesa el consumo de oxígeno que determina la medida de crecimiento de la levadura (Inoue et al., 1995).

Es probable que exista un solapamiento de los factores que afectan el crecimiento de la levadura. Por ejemplo, condiciones reducidas de crecimiento de la levadura (cantidad limitada de oxígeno, baja cantidad de amino nitrógeno libre y bajo niveles de zinc) harán que la actividad de la enzima AA transferasa sea probablemente el factor determinante para la formación de ésteres. Por el contrario, bajo condiciones de crecimiento excesivo de la levadura, los niveles de acetil CoA serán usados para apoyar el crecimiento, resultando en una deficiencia para la síntesis de ésteres. Entre estos dos puntos existirá un máximo para la síntesis de ésteres (Smart, 2003).

Generalmente, el pH inicial del mosto es alrededor de 5.0. Al final de la primera fermentación es 4.0 y el pH final es cerca de 3.6, cuando la fermentación se lleva a cabo a 12 °C. Por lo tanto, el crecimiento celular al pH final es muy difícil, por lo que la producción de volátiles no ocurre (García et al., 1994).

Según lo anterior, las condiciones en las cuales se promueve el crecimiento celular, tal como: alto nivel de nutrientes (aminoácidos, oxígeno, lípidos, zinc), aumento de temperatura y agitación, debe estimular la producción de alcoholes superiores. Sin embargo, las condiciones excesivas de crecimiento no siempre incrementarán la síntesis de ésteres, ya que el acetil CoA es utilizado para otras reacciones necesarias para el crecimiento celular y no para la producción de ésteres (Willaert et al., 2006)

Los factores que afectan la producción de compuestos volátiles se pueden clasificar en tres categorías:

- Características de la levadura
- Composición del medio de fermentación
- Condiciones de fermentación

2.2.1 Características de la levadura

2.2.1.1 Cepa de levadura

La levadura usada para la fermentación en la elaboración de cerveza pertenece al género *Saccharomyces*. Usualmente se diferencian unas cepas de otras, según como éstas realicen la fermentación. Levaduras tipo “ale” (como *S. cerevisiae*) fermentan y al final se mantienen en la superficie. Levaduras tipo “lager” (como *S. carlsbergensis* y *S. uvarum*) quedan en el fondo al final de la fermentación (Lea y Piggott, 2003).

El tipo de levadura usada es uno de los criterios más importantes en el control de niveles de ésteres en la cerveza. La producción individual de cada éster difiere significativamente de una cepa a otra. Además, algunos parámetros de la fermentación como oxígeno y temperatura son altamente dependientes en los antecedentes de la levadura. Este factor es considerado generalmente cuando se quiere desarrollar una nueva cerveza, ya que es bastante difícil controlar la producción de ésteres con diferentes cepas. Se ha observado que usando condiciones idénticas de fermentación, las levaduras tipo “ale” tienden a producir menos niveles de compuestos de aroma (Smart, 2003; Verstrepen et al., 2003).

2.2.1.2 Cantidad de levadura

La influencia de este factor en la síntesis de ésteres no está del todo clara, ya que los estudios son bastante contradictorios (Smart, 2003). Se ha observado que, incrementos moderados en la cantidad de levadura, muestran poca diferencia en la producción de alcoholes y ésteres (Verstrepen et al., 2003; Kaneda et al., 1992). Se cree, que existe una cantidad de levadura óptima según las características de la levadura, la composición del medio y de las

condiciones de operación, a las cuales se lleve a cabo la fermentación. Por ejemplo, se ha sugerido que para fermentaciones de mostos con alta gravedad específica, la cantidad óptima levadura sea 35×10^6 células/ml, comparada con fermentaciones de mostos con gravedad específica normal (15×10^6 células/ml) (Verstrepen et al., 2003; Smart, 2003).

2.2.1.3 Estado fisiológico de la levadura

Las propiedades de la levadura como la eficiencia de la fermentación y la producción de compuestos volátiles, pueden cambiar de una fermentación a otra (Smart, 2003). En la industria cervecera no se descarta la levadura utilizada, en vez se mantiene y es reusada un número de veces, un proceso conocido como readiciones seriadas. Usualmente se usan entre 7 y 20 fermentaciones (Powell et al., 2003).

La calidad de la levadura es usualmente descrita en términos de viabilidad y vitalidad. La viabilidad de la levadura es una expresión usada para describir la habilidad de la célula para crecer, reproducirse e interactuar con su medio. Mientras que la vitalidad ha sido descrita como el rendimiento de fermentación o la capacidad de superar y recuperarse de un estrés fisiológico. Por lo tanto, la capacidad fermentativa no es debida al crecimiento celular o a la multiplicación sino a la intensidad de la actividad metabólica, es decir, la vitalidad (Guido et al., 2003).

Se ha observado que levaduras de alta vitalidad tienden a producir menor cantidad de alcoholes superiores. Esto se debe a la alta actividad inicial fermentativa, produciendo pocos subproductos metabólicos de la síntesis de amino ácidos. Sin embargo, levaduras de alta vitalidad no han mostrado cambios considerables en la producción de ésteres. Esto confirma que la vitalidad de la levadura puede jugar un rol importante en las primeras horas de fermentación (Guido et al., 2003).

Se ha encontrado que al inicio de la fermentación, las células de levadura vírgenes (es decir, no usadas) son más lentas para comenzar a consumir los azúcares del mosto, en comparación con una cantidad de células de levadura de diferentes edades. Esto es indicativo de la

extensión de la fase “lag” antes de la máxima velocidad de utilización del azúcar (Powell et al., 2003).

Por lo tanto, las células de levadura deben cumplir ciertos requerimientos antes estar en la etapa de inicio del ciclo de la célula, uno de estos es lograr un tamaño crítico. Las células vírgenes no cumplen estos requerimientos iniciales. Con el fin de obtener un tamaño específico, ellas deben asimilar nutrientes y convertirlos en biomasa; lo cual consume tiempo y alarga esta fase del proceso. En contraste las células no vírgenes satisfacen los requerimientos, por lo tanto son capaces de dividirse rápidamente; reduciendo así el tiempo “lag” de la fermentación. Además, las células de levadura vírgenes fermentan a una velocidad más lenta en las etapas medias de la fermentación comparada con las células de levadura no vírgenes (Powell et al., 2003).

A pesar de la variación en la velocidad de consumo de azúcar, la gravedad específica final de la cerveza producida con células de diferente edad no se afecta significativamente. Esto indica que, sin importar la edad de la levadura, esta es capaz de utilizar los azúcares fermentables del mosto. Por lo tanto, la variación en la velocidad de consumo es debido a la edad de la célula en lugar de la vitalidad (Powell et al., 2003).

2.2.2 Composición del medio de fermentación

2.2.2.1 Gravedad específica del mosto

La gravedad específica refleja la cantidad de azúcares fermentables presentes en el mosto. Generalmente se utiliza la unidad °P (grados plato), que se define como la cantidad de sólidos en 100 g de mosto (densidad del mosto o cerveza en términos del porcentaje de extracto por peso). Se conoce muy bien que cervezas elaboradas con mostos de gravedad específica alta tienen una gran cantidad de ésteres. Esto resulta en una cerveza más afrutada y con aroma “a solvente” (Yoshioka y Hashimoto, 1983b).

Se ha observado que, la producción de ésteres se cuadruplica si la gravedad específica se aumenta de 10.5 °P a 20 °P. Aún luego de la dilución del producto al nivel de etanol deseado (5% v/v), las cervezas producidas con mostos de alta densidad tienen dos veces más ésteres, que las cervezas producidas con mostos estándar (Verstrepen et al., 2003).

Para evitar esta sobreproducción de ésteres en mostos de alta gravedad específica, se proporcionan niveles menores de aminoácidos libres, combinado con la elección adecuada de la levadura (Meilgaard, 2000).

2.2.2.2 Perfil de azúcar

Las cantidades relativas de los diferentes azúcares fermentables en el mosto tienen una influencia en la producción de ésteres (Verstrepen et al., 2003). Se ha evidenciado que mostos con alto contenido en glucosa conllevan una mayor producción de ésteres como el isoamil acetato y etil acetato, además, una mayor actividad de la enzima AA transferasa (Yoshioka y Hashimoto, 1984).

Por el contrario, se ha observado que mostos con alto contenido en maltosa reducen la producción de ésteres. Se cree que durante la fermentación de la maltosa, existe una inhibición de la actividad enzimática de AA transferasa por los ácidos grasos insaturados acumulados en la membrana celular, algo que no ocurre durante la fermentación de la glucosa (Yoshioka y Hashimoto, 1984).

En cuanto a la formación de alcoholes superiores, no se han encontrado diferencias considerables entre la fermentación de mostos altos en glucosa o mostos altos en maltosa (Verstrepen et al., 2003).

2.2.2.3 Contenido de nitrógeno del mosto

El contenido de aminoácidos en el mosto determina la producción de alcoholes superiores, ya que la gran mayoría de los últimos, son sintetizados a partir del catabolismo de los primeros.

Se ha demostrado que la adición de aminoácidos precursores de alcoholes superiores como valina, leucina e isoleucina; incrementa fuertemente la producción de estos (Inoue et al., 1995). La adición de aminoácidos incrementa la velocidad de producción de alcoholes superiores, permaneciendo en mayor cantidad hasta el final de la fermentación (Sablayrolles y Ball, 1995). Estos altos niveles de alcoholes superiores podrían conducir a un aumento en la producción de ésteres (Verstrepen et al., 2003). La razón entre el consumo de amino ácidos y el crecimiento celular es constante, por lo cual es independiente de las condiciones de la fermentación (Inoue et al., 1995).

2.2.2.4 Oxigenación del mosto

La aeración u oxigenación del mosto ha sido un factor bien reconocido para el control de producción de ésteres durante la fermentación de cerveza (Verstrepen et al., 2003). La adición de oxígeno al medio favorece el crecimiento celular, incrementando la producción de alcoholes superiores (Sablayrolles y Ball, 1995). Por el contrario, la formación de ésteres volátiles es suprimida por la disolución excesiva de oxígeno en el medio de fermentación. Se ha demostrado que el efecto negativo es debido a la supresión de expresión genética de la enzima AA transferasa (Smart, 2003; Verstrepen et al., 2003).

Sin embargo, cuando el contenido de oxígeno en el mosto es extremadamente bajo la concentración de ésteres decrece; debido al pobre crecimiento de la levadura. Por lo tanto, existe un nivel óptimo de oxígeno para la producción de ésteres (Verstrepen et al., 2003). Por ejemplo, Calderbank y Hammond (1994) encontraron que, para ciertas condiciones de fermentación, una concentración de 0.75 mg/L de oxígeno disuelto en el mosto resultó en una fermentación incompleta y con un crecimiento de la levadura bastante retardado. En contraste, una concentración de 5.4 mg/L de oxígeno disuelto produjo la máxima cantidad de isoamil acetato. A concentraciones de oxígeno disuelto mayores a ésta, se observó una disminución en la formación de ésteres.

2.2.2.5 Contenido de lípidos

Incrementar la cantidad de lípidos en el mosto decrece la producción de ésteres. Se ha observado que solo los ácidos grasos insaturados libres (por ejemplo, ácido oleico y linolénico) son los que afectan la síntesis de ésteres. Los ácidos grasos insaturados esterificados (triglicéridos o fosfolípidos) y los ácidos grasos saturados no tienen ningún efecto (Smart, 2003).

Muchos han sido los factores implicados para explicar la reducción de ésteres en presencia de ácidos grasos insaturados, como: la modificación de la permeabilidad de la membrana celular y la reducción del acetyl CoA disponible para la síntesis de ésteres (Smart, 2003). Estudios más recientes demuestran que estos reprimen directamente el gen de transcripción para la producción de la enzima AA transferasa (Verstrepen et al., 2003). De hecho, la represión de la expresión del gen ATF1 (gen codificador de la enzima AA transferasa) al adicionar diferentes ácidos grasos insaturados (18:1, 18:2, 18:3), es similar a la causada por la aeración u oxigenación del mosto (Fujii et al., 1997).

2.2.2.6 Zinc

Este es un nutriente mineral importante para la levadura, porque tiene funciones catalíticas y estructurales. Cuando se adiciona zinc al medio de fermentación, la producción de ésteres se incrementa, debido a que fomenta la formación de alcoholes superiores. Se ha mostrado que la razón principal de esto es que el zinc estimula el rompimiento de los α -ceto-ácidos en sus correspondientes alcoholes superiores (Smart, 2003; Verstrepen et al., 2003).

2.2.3 Condiciones de fermentación

2.2.3.1 Agitación

La agitación estimula el crecimiento de la levadura debido a que incrementa el acceso de los nutrientes y disminuye la sobresaturación del dióxido de carbono en el medio de fermentación. Debido a que estimula el crecimiento de la levadura, aumenta la síntesis de

alcoholes superiores, mientras que se observa lo opuesto para la síntesis de ésteres (Smart, 2003).

2.2.3.2 Temperatura de fermentación

Aumentar la temperatura de fermentación incrementa la velocidad de metabolismo de la levadura y la influencia será diferente para cada reacción bioquímica, cambiando el balance de los compuestos de aroma (Šmogroviová y Dömény, 1999).

Generalmente, cuando se incrementa la temperatura de fermentación en un rango entre 10-25°C, se aumenta la producción de ésteres y alcoholes superiores (Šmogroviová y Dömény, 1999). Sin embargo, se ha observado que diferentes ésteres muestran temperaturas óptimas de producción. Por ejemplo, para isoamil acetato, el pico de producción ocurre a 15°C, mientras que para etil acetato es a 20°C (Verstrepen et al., 2003).

Modificando la temperatura al final de la fermentación, puede esperarse que la cerveza tenga más contenido de ésteres ya que una parte de estos son formados durante esta etapa. (Smart, 2003). Se ha evidenciado que la concentración final de alcoholes superiores en una fermentación no isotérmica está entre las concentraciones obtenidas en las fermentaciones isotérmicas de la temperatura más alta y más baja. Sin embargo, los niveles altos de producción de ésteres fueron obtenidos cuando la temperatura fue reducida durante la fermentación, mientras que la menor cantidad de ésteres fue observada cuando la temperatura fue incrementada durante la fermentación (Sablayrolles y Ball, 1995).

2.2.3.3 Diseño del fermentador

La forma y el tamaño de los fermentadores tienen un gran impacto sobre la síntesis de alcoholes superiores y ésteres. Tanques cilíndrico-cónicos pueden alcanzar 25m de altura, comparados con los tanques tradicionales de fermentación que tienen menos de 3m (Smart, 2003). Estos fermentadores altos (capacidades entre 10,000 y 12,000 hl) conllevan un crecimiento pobre de la levadura y una producción pobre de alcoholes superiores y ésteres (Verstrepen et al., 2003). De hecho, se ha encontrado que la concentración de isoamil

acetato en el fermentador disminuye de 4ppm a 1 m de profundidad, a 0.3 ppm a 18m de profundidad (Meilgaard, 2000). Este efecto se atribuye al incremento de dióxido de carbono disuelto, debido a la alta presión hidrostática, esto generalmente conduce a la inhibición del metabolismo y del crecimiento de la levadura, disminuyendo la formación de alcoholes superiores y de acetil CoA, los cuales son sustratos para la producción de ésteres (Verstrepen et al., 2003).

Además, la duración y el método de llenado de este tipo de fermentadores influyen en la velocidad de fermentación y en la síntesis de compuestos volátiles. Por ejemplo, la adición sucesiva de mosto durante la fermentación, puede tener un efecto positivo en formación de ésteres, esto extiende la duración del crecimiento de la levadura y contribuye a una mayor actividad de la AA transferasa (Verstrepen et al., 2003).

2.2.3.4 Presión del fermentador

La evolución del CO₂ disuelto durante la fermentación es afectada por el tamaño y la geometría de los fermentadores, la presencia de partículas sólidas, pH y temperatura. Por ejemplo, fermentadores largos conllevan una alta presión hidrostática, lo que resulta en un incremento en la concentración del CO₂ disuelto y un decremento en la formación de alcoholes y ésteres (Shen et al., 2004). Los fermentadores a presión también aumentan la cantidad de dióxido de carbono disuelto, reduciendo considerablemente la producción de ésteres y alcoholes superiores (Verstrepen et al., 2003). El dióxido de carbono disuelto inhibe la enzima de decarboxilación del piruvato (precursor del Acetil CoA) y disminuye el pH en el interior celular (Smart, 2003). También altas concentraciones de CO₂ en el mosto suprime el crecimiento de la levadura. Esto se debe a que el acetil CoA es también un intermediario para la síntesis de ácidos grasos necesarios para la proliferación celular (Kumara et al., 1995).

Para disminuir el dióxido de carbono disuelto se ha burbujado el medio de fermentación con nitrógeno, aumentando considerablemente la formación de ésteres. Se ha observado una reducción mayor del 50% del dióxido de carbono disuelto en el medio de fermentación cuando se purga con nitrógeno, aumentando de 16 a 26 ppm la concentración de etil acetato

Sin embargo, disminuir el contenido de dióxido de carbono por debajo de los niveles normales no conlleva a un incremento significativo en la producción de compuestos volátiles (Hodgson et al., 1995).

Incrementar la presión de dióxido de carbono en la etapa inicial de la fase estacionaria de crecimiento inhibe la formación de ésteres, pero afecta muy poco la producción de alcoholes superiores, ya que la gran mayoría de los últimos son producidos durante la fase exponencial de crecimiento. Por ejemplo, se ha observado que para una presión de 1 bar al inicio de la fase estacionaria de crecimiento ocurrió una disminución de la mitad de la cantidad de ésteres de acetato, mientras una ligera disminución para los alcoholes superiores (Smart, 2003).

El CO₂ tiene alta solubilidad en soluciones acuosas, este reacciona con el agua para producir gas carbónico, el cual se disocia parcialmente en iones bicarbonato y protones. En un medio con baja capacidad del agente amortiguador, estas reacciones resultan en una severa caída de pH, que afecta al metabolismo de la célula. El CO₂ puede penetrar libremente la membrana plasmática, disolviéndose en el citoplasma y liberando iones bicarbonato y protones. Con el fin de mantener el pH interno, los protones son transportados al medio externo por un sistema activo de transporte asociado al ATP, que eventualmente es energía necesaria para las actividades de biosíntesis crecimiento y otras actividades celulares. Se sugiere que el CO₂ cambia las propiedades de la membrana, conllevando a un efecto negativo en la transportación de solutos. También fue indicado que el CO₂ puede reaccionar con aminoácidos y unidades pequeñas de proteínas, que podría eventualmente resultar en un cambio en la estructura de las proteínas y su actividad. Se ha reportado que el CO₂ ejerce cierta influencia en las actividades enzimáticas, particularmente aquellas envueltas en las reacciones de carboxilación/decarboxilación. (Shen et al., 2004).

El medio debe tener una buena capacidad del agente amortiguador si se quiere burbujear con CO₂ para que el cambio en pH no sea muy drástico. El burbujeo con CO₂ mostró un efecto negativo en el crecimiento celular. También se encontró que el CO₂ no afecta la composición de los ácidos grasos de la membrana celular (Shen et al., 2004).

Posiblemente debido a la inhibición del crecimiento celular o los efectos directos en las reacciones de decarboxilación, el CO₂ disuelto podría conllevar a una reducción de los sustratos disponibles como alcoholes superiores y acetil CoA para la producción de ésteres (Shen et al., 2004).

La tabla 1 resume algunos factores importantes y como estos afectan en la formación de compuestos volátiles.

Tabla 1. Factores afectan la formación de alcoholes superiores y ésteres durante la fermentación.

	FACTOR	ALCOHOLES S.	ÉSTERES
Levadura	Cantidad: Cambios moderados	Poca Influencia	Poca influencia
	Estado fisiológico: Vitalidad alta	Disminuye	Poca influencia
Mosto	Gravedad específica: Aumenta	Aumenta	Aumenta
	Perfil de azúcar: Alto contenido en Glucosa	No afecta	Aumenta
	Contenido de nitrógeno: Aumenta	Aumenta	Aumenta
	Oxigenación: Aumenta	Aumenta	Disminuye
	Contenido de lípidos: Aumenta	No afecta	Disminuye
	Zinc: Aumenta	Aumenta	Aumenta
Condiciones de fermentación	Agitación: Aumenta	Aumenta	Disminuye
	Temperatura: Aumenta	Aumenta	Aumenta
	Presión: Aumenta	Disminuye	Disminuye

2.3 Análisis de compuestos volátiles por SPME/GC/MS/FID

El análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas generalmente requiere alguna forma de extracción antes del análisis instrumental. Cuando se realiza la inyección directa de la muestra se presenta una alta contaminación de la camisilla de vidrio por los compuestos no

volátiles. Por lo tanto se requiere un mantenimiento frecuente del equipo para obtener resultados confiables (Ng, 2001).

Algunas técnicas han sido establecidas para la extracción y concentración de los compuestos volátiles de la cerveza como: extracción con solventes usando cloruro de metileno (Constant y Collier, 1997); concentración mediante destilación al vapor para luego ser inyectado en la columna del cromatógrafo de gas, GC (Lochow et al., 2005); extracción dinámica del espacio gaseoso o “HS” (técnica llamada purga y trampa) (Constant y Collier, 1997; Lochow et al., 2005). La mayoría de estas técnicas tienen grandes desventajas como: requerimiento de equipos costosos; cantidades significativas de solventes costosos y no amigables con el medio ambiente; múltiples pasos de manejo de la muestra que incrementan el error; y la necesidad de concentrar los analitos de interés hasta alcanzar los niveles detectables (Rodrigues et al., 2008).

La extracción de los compuestos volátiles del espacio gaseoso o “HS” se prefiere (Ng, 2001), ya que la cerveza contiene una gran cantidad de compuestos no volátiles, como carbohidratos no fermentables y proteínas. Estos dificultan la extracción líquido-líquido de los compuestos volátiles debido a la formación de emulsiones. Además, los compuestos altamente volátiles, como el acetaldehído, no son fáciles de detectar en la muestra líquida (Murakami, et al., 2003).

El análisis del espacio gaseoso o “HS” se define como la extracción de fase gaseosa o vapor, en la cual existe una partición de los analitos entre la fase líquida no volátil y la fase gaseosa encima de ésta. (Snow y Slack, 2002). Es de esperarse que la fase gaseosa tenga menos componentes que los que usualmente se encuentran en la fase líquida, por lo tanto, durante el muestreo del espacio gaseoso la complejidad de la matriz de la muestra puede ser simplificada o eliminada (Zhu y Chai, 2005).

Las técnicas comúnmente usadas para la extracción del espacio gaseoso de compuestos volátiles en matrices acuosas son: extracción estática, extracción dinámica y microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) (Snow y Slack, 2002; Pinho et al., 2006).

La extracción estática es una de las técnicas más automatizadas y validadas a pesar del crecimiento de las otras técnicas de extracción del “HS”. Durante ésta, la muestra es contenida en un envase cerrado y calentada por un tiempo definido (dependiendo de la matriz y de las características del analito), con el fin de alcanzar el equilibrio entre el líquido y la fase vapor. Luego de esto el vapor es muestreado, usualmente con una jeringa de gas e inyectado en el cromatógrafo de gas (Lanças, 2003; Snow y Slack, 2002). La limitación de esta técnica es su limitada sensibilidad, comparada con la extracción dinámica y SPME. (Snow y Slack, 2002).

Por otro lado, durante la extracción dinámica (conocida también como purga y trampa), la muestra es burbujeadada constantemente con un gas inerte como nitrógeno o helio. En consecuencia, los analitos son removidos del líquido por la corriente de gas, luego son concentrados en una trampa que contiene un agente absorbente químico y finalmente desorbidos térmicamente dentro del inyector del GC (Lanças, 2003; Snow y Slack, 2002). Esta técnica es usada para análisis de concentraciones extremadamente bajas, (ppb o ppt) o cuando un alto grado de concentración de los analitos es necesario (Snow y Slack, 2002).

Finalmente, en la microextracción en fase sólida (SPME) utiliza una fibra fundida recubierta de sílica, la cual concentra los analitos presentes en el “HS” (Snow y Slack, 2002). Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME: Inmersión directa y extracción en el espacio gaseoso o “HS”. En el primer modo, se introduce la fibra directamente en la muestra ocurriendo una relación entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. En el segundo modo los analitos son extraídos de la fase de gaseosa equilibrada en la muestra. Éstos necesitan ser transportados a la fracción volátil antes de ser absorbidos por la fibra. Este modo de extracción permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular y modificar la

matriz de la muestra, por ejemplo variando el pH, sin dañar la fibra. Además, es útil para el análisis de muestras donde la interferencia de la matriz es importante. (Pawliszyn, 1997). Durante la extracción, la concentración del analito resulta por el equilibrio entre las concentraciones de la fase líquida, gaseosa y la fibra. Mientras más compuestos deseados son extraídos de la fase de gaseosa por la fibra, consistentemente más compuestos volátiles son liberados de la fase líquida a la fase de gas (Lochow et al., 2005).

La técnica SPME elimina el uso de solventes orgánicos que pueden ser tóxicos, permite la cuantificación de una gran cantidad de moléculas con límites bajos de detección (ppb y ppm), buena linealidad, la extracción y la concentración de los analitos ocurre en un solo paso, requiere un mínimo de preparación de la muestra, un tiempo de análisis relativamente más corto y más económico comparado con las otras dos técnicas (Rodrigues et al., 2008; Pinho et al., 2006; Lanças, 2003). Además, la alta sensibilidad, permite pequeños volúmenes de muestra y la columna de separación está protegida ya que no se introducen al inyector grandes cantidades de agua ni solventes (Lochow et al., 2005).

Algunos estudios han indicado problemas con la reproducibilidad de la extracción, debido a las limitaciones de la instrumentación como dificultad en la automatización, agitación de la muestra, control de temperatura y envejecimiento de la fibra (Snow y Slack, 2002). También se ha reportado sensibilidad contra solventes orgánicos y el limitado rango de fases estacionarias disponibles (Rodrigues et al., 2008).

Se ha comparado el uso de SPME para la extracción de compuestos volátiles en cerveza con las técnicas tradicionales. Los límites de detección para la mayoría de los compuestos fueron mucho menores para SPME que para la extracción estática (entre 2 y 5 veces más bajo), ambos mostrando una buena linealidad. La diferencia en resultados entre estas dos técnicas es que la fibra puede comportarse diferente según la matriz de extracción, ya que las curvas de calibración son imposibles de generar en una matriz idéntica a la cerveza sin alcoholes y sin ésteres (Jelen et al., 1998). Hasta el presente no existe ningún estudio o investigación que

haya validado la técnica de SPME para el análisis (identificación y cuantificación) de compuestos volátiles en cerveza.

2.3.1 Extracción de compuestos volátiles de la cerveza por SPME/HS

Una vez el equilibrio es alcanzado durante la extracción de compuestos volátiles por SPME, la cantidad extraída es constante dentro de los límites experimentales de error y es independiente del tiempo de extracción. Por lo tanto, para obtener datos reproducibles las condiciones y el tiempo de extracción deben ser constantes (Pawliszyn, 1997).

Además, la cantidad de analito extraído es independiente de la localización de la fibra en el sistema, es decir, no importa si se muestrea el espacio gaseoso o directamente en la muestra siempre y cuando el volumen de adsorción/absorción de la fibra, el espacio gaseoso y la muestra permanezcan constantes (Pawliszyn, 1997).

Los compuestos volátiles son extraídos más rápido que los compuestos semivolátiles, ya que están en concentraciones más altas en el “HS”; lo que contribuye a un transporte de masa más rápido a través de la fase gaseosa. Por el contrario, la concentración de los compuestos semivolátiles en la fase gaseosa a temperatura ambiente es pequeña, por lo que la transferencia de masa es menor; alargando el tiempo de extracción. Esto se puede mejorar con la agitación de la muestra, adición de sal o incrementando la temperatura de extracción (Pawliszyn, 1997).

La concentración de la muestra no tiene impacto sobre el tiempo de equilibrio. Es decir, si la extracción es optimizada para una concentración dada, el tiempo de equilibrio será el mismo para otras concentraciones. Esta condición es válida siempre y cuando las condiciones de extracción en el sistema SPME/muestra se mantengan constantes (Pawliszyn, 1997).

Se ha encontrado que incrementando algunos factores durante la extracción con SPME resulta en un incremento de la señal analítica como el tipo de fibra, la temperatura y el

tiempo de extracción. Estos influyen el equilibrio de los compuestos volátiles entre el líquido y el “HS”. La agitación de la muestra y la fortaleza iónica son otros factores que causan e incrementan la sensibilidad del método (Rodrigues et al., 2008).

2.3.1.1 Agitación

La agitación facilita el transporte de masa entre la fase líquida, fase gaseosa y la fibra. Esta determina la velocidad de extracción y el tiempo de equilibrio para la extracción de muestras acuosas. A medida que la velocidad rotacional aplicada aumenta, el tiempo de equilibrio decrece. Específicamente, en extracción de “HS”, la agitación permite la extracción más rápida de las especies menos volátiles. Cuando se usa un agitador magnético, se debe garantizar que las revoluciones por minuto (rpm) de la barra magnética sean constantes y que la base del plato este térmicamente aislada del envase que contiene la mezcla durante el análisis (Pawliszyn, 1997).

2.3.1.2 Temperatura

Un incremento en la temperatura de extracción, aumenta la concentración del analito en el “HS” y ayuda a una extracción más rápida (Pawliszyn, 1997). Sin embargo los compuestos más volátiles no son tan fuertemente influenciados como los menos volátiles (Constant y Collier, 1997). La concentración de los compuestos más volátiles tiende a disminuir cuando se aumenta la temperatura, mientras que se observa lo opuesto con los menos volátiles (Saison et al., 2008). Este fenómeno ocurre porque los compuestos más volátiles alcanzan su equilibrio relativamente rápido, por lo que presentan bajos coeficientes de partición entre el espacio gaseoso y la fibra cuando se aumenta la temperatura y esto produce una disminución de la cantidad máxima extraída. Por el contrario, los compuestos menos volátiles incrementan su presión de vapor, aumentando su concentración en el espacio gaseoso (Saison et al., 2008; Pawliszyn, 1997).

Los compuestos químicos más afectados por el aumento de la temperatura son los etil ésteres de ácidos grasos y alcoholes superiores. Se ha recomendado que la temperatura de extracción para compuestos volátiles en cerveza esté entre 30-40°C (Rodrigues et al., 2008). Es

importante mantener la temperatura de extracción constante durante el equilibrio y el tiempo de extracción para obtener resultados reproducibles (Pinho et al., 2006).

2.3.1.3 Adición de sal

La adición de sal a la muestra puede mejorar la eficiencia de la extracción ya que altera la solubilidad de los compuestos. La solubilidad de muchas moléculas orgánicas disminuye cuando se aumenta la concentración de sal, especialmente los más hidrofóbicos (Saison et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Pawliszyn, 1997). Los iones salinos disociados perturban la matriz de la muestra, disminuyendo la solubilidad de las moléculas de aroma, las cuales son más fácilmente liberadas al “HS”. Un segundo efecto de adicionar sal a la muestra es que se altera la fase límite entre la fase líquida y vapor, ayudando a la volatilización de los analitos disueltos en el líquido hacia el “HS” (Ebeler, et al., 2000).

La solubilidad de las moléculas más polares, por otro lado, puede permanecer inalterada o incrementar a través de las interacciones electroestáticas con los iones salinos (Saison et al., 2008). El efecto de la adición de sal a la muestra es significativo hasta un punto en el cual la absorción no se ve afectada por una gran cantidad de sal. La adición de sal a la cerveza hace que los límites de detección sean más bajos en el método de SPME y, por lo tanto, puede ayudar en muestras en que los ésteres estén presentes en trazas (Jelen et al., 1998).

2.3.1.4 Fibra

La naturaleza química de los analitos de interés es lo que determina el tipo de fibra a utilizar para la extracción por SPME. Escoger la fibra óptima para una gran variedad de compuestos requiere experimentación con diferentes fibras (Pawliszyn, 1997).

Para la extracción de compuestos volátiles de la cerveza por SPME, la fibra polar, poliacrilato (PA) ha mostrado ser más efectiva en la extracción de compuestos polares como los alcoholes superiores. Mientras que la fibra polidimetilsiloxano (PDMS) favorece la extracción de los compuestos menos polares como los etil ésteres, acetatos e isoamil acetatos (Rodrigues et al., 2008; Jelen et al., 1998). La fibra PDMS es una fibra no polar y extrae los

no polares muy bien, sin embargo también puede ser utilizada para compuestos polares luego de optimizar las condiciones de extracción (Pawliszyn, 1997). Entre las fibras PDMS y PA se prefiere la PDMS porque es la que muestra menos afinidad con el etanol (Ng, 2001).

Por otro lado, la fibra CAR/PDMS compuesta de PDMS y soporte poroso de carbón activado Carboxen CAR, permite una detección de un gran rango de compuestos volátiles en cerveza y produce una intensidad de señal mayor que las fibras PDMS y PA (Pinho et al., 2006). A su vez, la fibra triple compuesta por Divinilbenzeno (DVB), Carboxen (CAR) y polidimetilsiloxano (PDMS) permite la detección de un amplio rango de compuestos y produce señales más intensas que la PDMS y CAR/PDMS. (Rodrigues et al., 2008).

2.3.1.5 Tiempo de extracción

El tiempo de extracción depende de la naturaleza química de los compuestos deseados, pero en particular de la fase polimérica de la fibra (Rodrigues et al., 2008; Ebeler et al., 2000). Esto se debe a que las constantes de distribución entre los compuestos de interés y la fibra afectan el tiempo de equilibrio. La cantidad de analito extraído incrementa la constante de distribución, pero el tiempo de equilibrio se vuelve más largo. El componente que tenga una alta afinidad hacia la fibra alcanzará el equilibrio más tarde (Pawliszyn, 1997).

La eficiencia de la extracción de compuestos volátiles en cerveza para la fibra CAR/PDMS fue alcanzado a los 60 minutos de ser expuesta la fibra a la muestra (Rodrigues, et al., 2008). Mientras que para la fibra PA, la gran mayoría de los compuestos alcanzó el equilibrio luego de los 45 minutos.

Sin embargo, un estado de equilibrio no es requerido para un análisis cuantitativo de los compuestos, asumiendo que la preparación de los estándares y la muestra son llevadas a cabo bajo las mismas condiciones (Jelen et al., 1998).

2.3.1.6 Volumen de la muestra

La extracción de compuestos volátiles en cerveza usando 5 ó 10 ml de muestra ha mostrado buena reproducibilidad cuando las otras condiciones son fijas (Constant y Collier, 1997). Es importante considerar una cantidad de muestra adecuada para el tamaño del envase de extracción, ya que los compuestos muy volátiles prefieren acumularse en el espacio gaseoso, resultando en una pérdida sustancial en sensibilidad en espacios gaseosos grandes (Pawliszyn, 1997).

2.3.2 Instrumentación analítica en identificación de los compuestos volátiles

El análisis de compuestos volátiles ha ido progresando rápidamente en los últimos años, gracias a la técnica de cromatografía de gas y espectrometría de masas (GC/MS). Esta técnica puede lograr la separación e identificación de mezclas complejas en una sola operación. Un sistema de cromatografía de gas acoplado a espectrometría de masas consta de un gas de arrastre, un puerto de inyección de la muestra, una columna, el horno que contiene a la columna, y un sistema espectrométrico de masas (fuente de ionización, analizador de masas y un detector). La muestra se volatiliza en el puerto de inyección y se inyecta con exactitud y precisión en la cabeza de la columna cromatográfica. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil del gas inerte, él cual no interacciona con las moléculas del analito; su única función es de transportarlo a través de la columna.

La columna por su parte, es el corazón de la cromatografía de gas. Posee una fase estacionaria en la cual se produce la retención de los analitos a diferentes proporciones como consecuencia de la absorción física y produciendo luego la separación. La elección de la fase estacionaria de la columna, depende de la naturaleza de los componentes de la muestra a ser separados (Skoog y Leary, 1994).

El modo de ionización (impacto de electrones o ionización química) determina el tipo de abundancia de los iones producidos. En el modo de impacto de electrones (EI, por sus siglas en inglés) la fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una

muestra en iones por bombardeo con electrones. Se obtiene un haz de iones frecuentemente positivos que es entonces acelerado en el analizador de masas. La dispersión está basada en las relaciones masa/carga de los iones del analito. El espectrómetro de masas contiene un detector para iones que convierte el haz de iones en una señal eléctrica de los componentes de la muestra que puede ser entonces procesada, almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada o registrada (Skoog y Leary, 1994).

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Materia prima y fermentador:

3.1.1 Microorganismo

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* provista por la Cervecería local, la cual se encontraba almacenada a 4°C en el medio Universal Beer Agar (UBA) antes de ser propagada. La cantidad de levadura adicionada al fermentador es adicionada por el equipo de monitoreo de levadura modelo 720 de la compañía Aber Instruments Ltd, UK.

3.1.2 Mosto

Los mostos utilizados para las fermentaciones fueron preparados en la cervecera local. Estos contenían como fuente de nutrientes (carbono y nitrógeno) cebada malteada, malta caramelo y harina de maíz. Estos fueron previamente modificados durante las operaciones de maceración, filtrado y cocción; para obtener una gravedad específica final de aproximadamente 13.5 °P. También, durante las operaciones antes mencionadas se adicionó: ácido fosfórico (al 85%) para alcanzar un pH de 5.2 a 5.3, sulfato de calcio, sulfato de zinc y cloruro de sodio como fuente de calcio, zinc y sodio, respectivamente. Antes de entrar al fermentador, el mosto fue enfriado a 11.5 °C y aireado.

3.1.3 Fermentador

Se utilizó un tanque cilíndrico-cónico en acero inoxidable de 21.7 m de alto y 5.4 m de diámetro, con una capacidad de llenado de 4192 hectolitros (hl). El llenado del fermentador se realizó mediante la adición de 6 lotes de mosto previamente enfriado, de los cuales 5 fueron aireados en línea antes de entrar al fermentador. La cantidad adicionada por cada lote al fermentador fue de 550 hl para un volumen total de mosto de 3300 hl. Las fermentaciones se realizaron a una temperatura de 15°C y a presión atmosférica. La fermentación finalizó

cuando el mosto alcanzó una gravedad específica de 0.1 °P. El fermentador posee un sistema de control para mantener las condiciones de presión y temperatura. La cantidad de levadura para cada fermentación fue adicionada en el segundo lote que entra al fermentador, por lo cual, al finalizar el llenado de cada tanque se hizo el conteo de levadura para determinar la cantidad de levadura inicial al comenzar la fermentación. La cantidad de glucoamilasa adicionada en el fermentador fue de 65.52 lb de enzima, esta se adiciona antes de iniciar el llenado del fermentador.

3.2 Factores que afectan la formación de compuestos volátiles

3.2.1 Amino ácidos libres (FAN)

Para aumentar el contenido de amino nitrógeno libre o FAN (por sus siglas en ingles), se modificó el proceso de maceración. Se permitió un descanso proteico con el fin que enzimas proteolíticas tenga mayor tiempo de acción para convertir las proteínas presentes en el mosto en amino ácidos libres. La temperatura óptima para producir amino nitrógeno libre en el mosto es 50 °C (O'Rourke, 2002). Por lo tanto, las fermentaciones de mostos con mayor contenido en amino nitrógeno libre "FAN" se mantuvieron a 50°C por 10 minutos. Se evaluó el efecto que tiene el contenido de "FAN" para cada uno de estos mostos, sobre la formación de compuestos volátiles. El método que se utilizó para analizar el contenido de "FAN" en el mosto fue el oficial por la Asociación Americana de Químicos Cerveceros (ASBC) "Wort-12". Para medir el nitrógeno total el método utilizado fue el (ASBC) "Malt-5" y el método para determinar color en mosto y cerveza fue el (ASBC) "BEER-10" y "MALT-9" (American Society of Brewing Chemists (ASBC), 1992).

3.2.2 Perfil de azúcares fermentables

Se determinó el efecto que tiene producir mostos con alto contenido en glucosa y bajo en maltosa sobre la producción de compuestos volátiles durante la fermentación. Para obtener este cambio en el perfil de azúcares en el mosto se utilizó la enzima glucoamilasa.

La glucoamilasa es capaz de romper las moléculas de almidón, dextrina, maltotriosa y maltosa a glucosa, aumentando así los niveles de este último azúcar en el mosto a fermentar. La enzima hidroliza el enlace α -1,4 y las ramificaciones de los enlaces de almidón (α -1,6). Además, la enzima es más activa en un pH ácido (4.0 y 4.5) y a una temperatura de 60°C (Hardwick, 1994).

Esta enzima es generalmente adicionada durante la fermentación, para incrementar la cantidad de azúcares fermentables disponibles en el mosto y así obtener cerveza con más contenido de alcohol o baja en calorías. Sin embargo, las condiciones de la fermentación no son las óptimas para que la enzima logre producir mostos con alto contenido de glucosa, por ende, se debe adicionar en algún punto del proceso antes de la fermentación. También se ha reportado problemas con la floculación de la levadura luego de la fermentación, cuando altas cantidades de enzima son adicionadas al mosto luego de la ebullición (mayores a $1\text{ml}_{\text{enz}}/\text{l}_{\text{mosto}}$) (Samp y Silberman, 2006). Por lo tanto, la cantidad de enzima, momento de adición de la enzima en el proceso y el tiempo de acción se deben determinar experimentalmente con pruebas en laboratorio. Cada mosto preparado fue caracterizado por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) modelo 717 Plus de la compañía Waters (MA, USA), para determinar la concentración (%w/v) de los azúcares fermentables (fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa).

El primer grupo de pruebas de laboratorio se realizó manteniendo el mismo tiempo de descanso a 65°C durante la maceración con diferentes cantidades de enzima adicionada. Se comenzó con una cantidad de enzima de $0.09\text{g}_{\text{enzima}}/\text{l}_{\text{mosto}}$ y se fue incrementando 25%, 50%, 75%, 100% y 300% sobre la cantidad que se usa actualmente en el fermentador.

El segundo grupo de muestras se realizó para determinar si existía algún efecto en la producción de glucosa variando el tiempo en el descanso a 65°C durante la maceración. El tercer grupo de pruebas fue determinar si el efecto de producción de glucosa se incrementaba al aumentar el tiempo en el descanso a 65°C y la cantidad de glucoamilasa adicionada durante la maceración (100% y 300% de la cantidad base escogida $0.09\text{g}_{\text{enzima}}/\text{l}_{\text{mosto}}$).

Finalmente, se determinó el efecto de adicionar la enzima al inicio de la ebullición con concentraciones de menores de $1\text{ml}_{\text{enz}}/1\text{mosto}$. Las cantidades exactas y los tiempos utilizados se encuentran descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Experimentos con glucoamilasa para producir mostos con alto contenido en glucosa

Operación Unitaria	Tiempo (min)	Cantidad de enzima (g/l_{mosto})
Maceración	30	0; 0.09; 0.11; 0.14; 0.16; 0.18; 0.36
Maceración	0, 30, 45, 60	0
Maceración	60, 120	0; 0.18; 0.36
Ebullición (Kettle)	90	0; 0.34; 0.68; 1.1

Para cada experimento se recolectaron las muestras de la siguiente manera:

1. Se extrajo en un vaso plástico aproximadamente 4L de mosto del tanque de maceración justo cuando la mezcla del tanque de cocción y del tanque de maceración estén a una temperatura de 65°C. En el caso del experimento del mosto del tanque de ebullición, la muestra fue extraída cuando la mezcla del filtro y del tanque de ebullición alcanzó los 68°C.
2. Se midieron 400 ml del mosto extraído con una probeta y fueron adicionados en los vasos metálicos del baño de maceración de la compañía THIEMT modelo TMB-08.
3. Se ajustó el baño de maceración para obtener una temperatura de 65°C y a una velocidad de agitación de 200 rpm.
4. A cada vaso metálico se adicionó la cantidad de enzima especificada en la tabla 2 y se dejaron en el baño térmico el tiempo determinado anteriormente. Fue necesario preparar una solución de la enzima glucoamilasa para poder ser medida con mayor facilidad y exactitud. La solución fue preparada en una volumétrica de 100 ml con agua destilada y glucoamilasa con una concentración de 1 % (w/v).
5. Luego del tiempo para cada mosto, los envases fueron retirados del baño de maceración y calentados en una hornilla hasta ebullición para la inactivación de la enzima. Es importante agitar el contenido para evitar que ocurra una ebullición explosiva.

6. Cada muestra de mosto caliente se filtró con papel filtro de tamaño de 150mm de la compañía Waters # catalogo 1202-150. Los envases de filtración fueron lavados con etanol para evitar contaminación microbiana.

7. Parte de cada mosto filtrado fue envasado en tubos de ensayo estériles de plástico de 15 ml comprados en la compañía Fischer Scientific para el análisis de azúcares fermentables por HPLC. Estos se llenaron hasta la tapa y se refrigeraron hasta el análisis.

8. A cada uno de los mostos filtrados se midió la concentración de azúcar ($^{\circ}$ P) y se refirió los valores a un valor de referencia de 12 $^{\circ}$ P.

Para todos los experimentos anteriores se utilizaron las condiciones (cantidad de enzima, temperatura y momento de adición de la enzima en el proceso) en el cual se obtuvo el cambio en el perfil de azúcares deseado (mayor cantidad de glucosa que de maltosa).

3.2.3 Oxígeno disuelto (DO) en el mosto

Para determinar el efecto que tiene el incremento en la aeración del mosto antes del entrar al fermentador, se aumentó la aeración de $6\text{m}^3/\text{h}$ a $8\text{m}^3/\text{h}$. Mostos airados con valores superiores al experimentado, podría conllevar a una excesiva formación de espuma durante la fermentación, lo cual es indeseado. Además, experimentar con niveles de aire por debajo del valor actual podría conllevar a un desempeño pobre de la levadura durante la fermentación.

Se midió el oxígeno disuelto (DO) al primer lote de mosto que no tiene levadura, ya que los otros 4 lotes que fueron oxigenados, se airearon igual que el primero y, por lo tanto, la cantidad de oxígeno disuelto en cada uno al entrar debe ser igual. No se puede medir el oxígeno disuelto de los otros mostos porque la medición se afecta por la levadura adicionada al tanque. Para medir la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto se usó el equipo Orbisphere 3650 de la compañía Hach, CO, USA.

Para medir el oxígeno disuelto, se abrió la llave del toma muestra durante 5 minutos del fermentador para purgar la línea. Con el equipo encendido se conecta al grifo y se abre la llave para dejar correr mosto. El equipo se mantiene en el modo “ox dsl” el cual reporta el oxígeno disuelto en partes por millón (ppm). Cuando la temperatura registrada en el equipo se mantenga constante (aproximadamente en 13 °C), se toma el valor de oxígeno disuelto. Se cerró el grifo y se desconectó el equipo Orbisphere. Se adicionó etanol 200° prueba al grifo para evitar contaminación microbiana.

3.2.4 Cantidad de levadura adicionada

Para evaluar el efecto que tiene adicionar una cantidad de levadura menor al fermentador en la producción de compuestos volátiles durante la fermentación; se disminuyó la cantidad de levadura de 22×10^6 células/ml a 13.5×10^6 células/ml. Este último valor fue escogido porque se recomienda que los millones de células de levadura adicionada al fermentador sea cercano al valor del extracto del mosto (para nuestro caso 13.5°P) (Master Brewers Association of the Americas M.B.B.A., 2002). El conteo de células se realiza en el equipo “Cellometer Auto M10, automatic cell counter” de la compañía Nexcelom Bioscience (MA, USA). La muestra fue tomada al final del llenado del fermentador y rápidamente se realizó el conteo para evitar la proliferación de la levadura.

Para tomar la muestra del fermentador se dejó abierto por 5 minutos el grifo para que la línea se purgara. En un vaso de 100 ml se tomó la muestra y rápidamente se llevó al laboratorio, al finalizar de tomar la muestra se purgó el grifo con etanol 200° prueba para evitar la contaminación microbiana. Ya en el laboratorio, se adicionó un agitador magnético y se agitó a 800rpm para obtener un buen mezclado. Mientras se estaba agitando, se tomó 20µl de la muestra con una micropipeta Eppendorf de la compañía VWR International, PA, USA. La muestra se adicionó a la laminilla del “Cellometer” y se introdujo en el lector. Utilizando el programa de la computadora se enfocó el lente para poder realizar un conteo correcto de células. Finalmente, en el programa del equipo, se introduce el valor de 1 en el factor de

dilución y se oprime conteo de células. El valor que aparece como conteo de levadura es el número de millones de células por ml de mosto que tiene la muestra.

3.2.5 Cantidad de CO₂ disuelto en el medio

Para determinar el efecto del dióxido de carbono disuelto sobre la formación de compuestos volátiles, se decidió primero realizar una curva de fermentación para observar el punto óptimo de producción de compuestos volátiles durante la fermentación. El CO₂ disuelto en el mosto se removió con nitrógeno gaseoso.

El nitrógeno gaseoso de alta pureza de la compañía Praxair se adicionaría en el momento en la fermentación donde ocurra la máxima producción de ésteres y cuando la levadura ya haya consumido todo el oxígeno disponible en el mosto. El flujo máximo de nitrógeno gaseoso a usar es $7.14 \text{ ml N}_2/(\text{min} \times l_{\text{mosto}})$, con este flujo se ha encontrado a nivel laboratorio que hay una mayor producción de alcoholes superiores y ésteres (Hodgson et al., 1995). Este se adicionaría desde la parte inferior del tanque. La cantidad de dióxido de carbono disuelto en el mosto se midió con el Haffmans CO₂ Gehaltener.

Para realizar la curva de fermentación se tomaron muestras cada 8 horas hasta que se agotó la cantidad de extracto (cuando el °P llegó a 0.1°P), durante una fermentación de operación normal del fermentador que se describió en la sección 3.1. Para tomar cada muestra de mosto se realizó de la siguiente manera:

1. Para tomar la muestra en el fermentador se dejó abierto por 5 minutos el grifo para que la línea se purgara. En un vaso de 200 ml se tomó la muestra y rápidamente se llevó al laboratorio, al finalizar se purgó el toma muestra con etanol 200° prueba para evitar la contaminación microbiana.
2. Ya en el laboratorio, se adicionó mosto en un frasco de vidrio de 40ml hasta la parte superior y se refrigeró a 5°C. Estos frascos de vidrio fueron previamente lavados y

esterilizados en una autoclave a temperatura de 121°C y presión de 15 psi por 15 minutos. Luego esta muestra se analizó para determinar la concentración de compuestos volátiles por la técnica SPME/GC-MS/FID dentro de las próximas 24 horas después de haber sido tomada.

3. Finalmente, la cantidad de muestra que permanece en el vaso de 200ml se le midió: pH, cantidad de extracto (°P) y % etanol como se describe posteriormente.

3.2.6 Análisis estadístico

Debido a que el objetivo principal de este estudio es determinar cuáles factores tienen un mayor impacto en la producción de compuestos volátiles durante la fermentación de la cerveza a nivel industrial, se utilizó un estadístico capaz de evaluar el efecto individual de cada factor comparado contra un control. Se utilizaron dos herramientas estadísticas: análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) y la prueba de Dunnett. Para cada uno de los factores se hicieron 3 réplicas.

El análisis de varianza es usado para probar la hipótesis acerca de la diferencia entre dos o más medias bajo la hipótesis nula (H_0):

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_t$$

$$H_a: \text{al menos una } \mu_i \text{ es diferente}$$

Ecuación 1. Hipótesis nula (H_0) e hipótesis alterna (H_a) del análisis de varianza (ANOVA).

El estadístico que se usó para probar simultáneamente todas las medias fue el estadístico F obtenido de la tabla de ANOVA para la partición de la variabilidad total en variabilidad entre tratamientos y variabilidad dentro de cada tratamiento. Con este estadístico se determinó si existía una diferencia significativa o no ($P < 0.1$) para los diferentes mostos y cervezas producidas.

Si por el análisis estadístico ANOVA encontrábamos que al menos una media de los tratamientos era diferente, entonces se utilizó la prueba de “Dunnett” para probar si existía

diferencia significativas entre la media de cada tratamiento y el control ($P < 0.1$). Se decía que había una diferencia significativa entre la media del tratamiento i y la del control c si:

$$|\bar{Y}_i - \bar{Y}_c| \geq D$$

Ecuación 2. Región de rechazo para la prueba de Dunnett.

Donde Y_i es la media del tratamiento, Y_c es la media del control y D es el valor crítico de la prueba de “Dunnett” ($P < 0.1$).

3.3 Técnicas de análisis

3.3.1 Viabilidad de la levadura o conteo de células muertas

La muestra se tomó del tanque de levadura que fue utilizado para la fermentación. Para esto se purgó la tubería de salida de la muestra, dejando salir muestra por aproximadamente 3 minutos. Se tomó la muestra en un envase estéril de vidrio y se lleva al laboratorio lo más rápido posible para evitar la proliferación del microorganismo.

Ya en el laboratorio, se mezcló la muestra con un agitador de vidrio para homogeneizarla. Se midió 100 ml de agua destilada con una probeta y se adicionó a un vaso de 250 ml. Luego se adicionó al vaso (tres veces) muestra contenida en la superficie del agitador de vidrio para diluir la muestra del tanque de levadura y hacer un conteo de células adecuado.

Ya diluida la muestra en un cristal de reloj, se mezcló 3 gotas del tinte azul de metileno comprado a la compañía Fisher Scientific (USA, # de catalogo 122965) y 5 gotas de la muestra diluida. Se agitó con agitador de vidrio y se tomaron 20 μ l de la muestra con una micropipeta Eppendorf de la compañía VWR International (PA, USA). La muestra se adicionó a la laminilla del “Cellometer” y se introdujo en el lector del equipo. En el programa del equipo se enfocó el lente para poder realizar un conteo correcto de células. Finalmente, en el programa del equipo, se activó la función de conteo de células y viabilidad

de levadura y se oprimió conteo de células. Al final el equipo reportó el porcentaje de células muertas en la muestra automáticamente.

3.3.2 pH, cantidad de extracto (°P) y contenido de etanol

Se determinó el pH del mosto antes de la fermentación, al inicio de la maduración y en el producto final. El pH se midió con Corning Pinnacle 555 pH/ion meter de la compañía Corning laboratory meters MA, USA. Se utilizaron las soluciones amortiguadoras de 4.00 y 7.00 de Fisher Chemical (USH) para calibrar el equipo. El equipo de pH se calibró de la siguiente manera: se oprime el botón “calibrate” y se pone el electrodo previamente lavado con agua destilada en la solución de pH 4.00 y se deja el electrodo sumergido en la solución hasta que el valor llegue a 4.00. Luego se realiza lo mismo para la solución amortiguadora de pH 7.00. Finalmente para medir el pH de la muestra se limpia con agua destilada el electrodo y se sumerge en la muestra, se oprime el botón “read”. El valor se registra cuando se estabilice la lectura.

Por otro lado la cantidad de extracto fue medido al mosto al inicio de la fermentación, a la cerveza al inicio de la maduración y a la cerveza final. Mientras que el % de etanol solo se midió en la maduración y en el producto final. Ambos parámetros fueron medidos por el “Alcolyzer plus and density meter DMA” de la compañía Anton Para, VA, USA. Se tomaron 100ml de la muestra y se adicionaron en un vaso al que previamente se había adicionado 5 gr de tierra diatomácea de Fisher Chemical. Esta mezcla se filtró con papel filtro de tamaño de 150mm de la compañía Waters # catalogo 1202-150. Del líquido filtrado se tomaron aproximadamente 40 ml que fueron puestos en el envase del equipo y oprime el botón “start”, al final el equipo reporta el valor de °P y % etanol.

3.3.3 Análisis de azúcares fermentables

El HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) que se utilizó para la cuantificación de los azúcares fermentables en mosto posee un “autosampler” modelo 717 plus, de la compañía Waters, MA, USA; el cual posee un sistema “Waters 600 E system controller” acoplado a

una bomba cuaternaria y un detector de índice de refracción. Las condiciones óptimas para el análisis cromatográfico fueron las siguientes: 1) columna Carbohydrate ES; 2) Elución isocrática con una fase móvil de 75:25 acetonitrilo/agua con un flujo de 1ml/min a temperatura ambiente y presión 1800-2200 psi. El acetonitrilo tiene una pureza del 99.9% fue comprado en la compañía Sigma Aldrich; 3) el volumen de inyección por muestra fue 10µl; 4) la temperatura del detector de índice de refracción fue de 40°C; 5) el tiempo de análisis para cada muestra fue de 20 min.

La curva de calibración para los azúcares fermentables de interés se preparó de la siguiente manera: En una balanza analítica modelo LA-110 de la compañía Acculab se pesaron aproximadamente las cantidades de los azúcares que se muestra en la tabla 3. En una volumétrica de 5ml se adicionaron los azúcares y se disolvieron en agua doble destilada para obtener las concentraciones mostradas. Esta será la solución primaria para hacer las diluciones de la curva de calibración. Los azúcares mostrados en la tabla 3 fueron comprados a la compañía Sigma Aldrich con # de catalogo 239704, 65500, 605417, M9171 y 851493, respectivamente.

Tabla 3. Concentraciones de los azúcares fermentables de la solución primaria para la curva de calibración para HPLC.

Compuesto	Cantidad (g)	Concentración (% w/v)
Fructosa	0.1000	2.000
Glucosa	0.5000	10.00
Sacarosa	0.0500	1.000
Maltosa	0.5500	11.00
Maltotriosa	0.1000	2.000

La solución primaria de estándares fue filtrada con un filtro de jeringa de 0.45 µm. Finalmente se adicionaron con una micropipeta de 1000µl Eppendorf de la compañía VWR International, PA, USA; los volúmenes de la solución primaria que se muestra en la tabla 4 en 6 frascos de vidrio para HPLC de un ml. Luego se completaron todos los frascos de vidrio a un volumen final de un ml con agua doble destilada. Las concentraciones de los azúcares analizados en cada estándar se indican en la misma tabla.

Tabla 4. Concentraciones de los estándares para las curva de calibración de los azúcares fermentables analizados.

Estándar #	Volumen (μl)	Fructosa (% w/v)	Glucosa (% w/v)	Sacarosa (% w/v)	Maltosa (% w/v)	Maltotriosa (% w/v)
0	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	200	0.400	2.000	0.200	2.200	0.400
2	400	0.800	4.000	0.400	4.400	0.800
3	600	1.200	6.000	0.600	6.600	1.200
4	800	1.600	8.000	0.800	8.800	1.600
5	1000	2.000	10.00	1.000	11.00	2.000

Para la cuantificación de los azúcares fermentables en el mosto, en un frasco de vidrio para HPLC se adicionó 1 ml de mosto refrigerado previamente filtrado a través de un filtro de jeringa de 0.45 μm.

3.3.4 Análisis de compuestos volátiles por SPME/GC-MS/FID

3.3.4.1 Optimización de la extracción de los compuestos del espacio gaseoso por Micro-extracción en fase sólida (SPME)

Estándar interno

Se escogió como estándar interno el compuesto 1-butanol. Estudios previos han utilizado este compuesto con éxito para la cuantificación de compuestos volátiles en cerveza (Lochow et al., 2005). Se prepara una solución primaria, al adicionar 250 μL de 1-butanol a una solución acuosa al 5% v/v etanol en una volumétrica de 50 ml. El agua destilada usada fue del sistema modelo Aqua-Summa II de la compañía Culligan, IL, USA; 1-butanol (99.8%) y el etanol (anhidro) fueron comprados en la compañía Sigma-Aldrich (USA) con # catalogo 281549 y 676829, respectivamente.

Solución de estándares

Los compuestos volátiles de interés que se analizaron fueron: acetaldehído (99.5%), etil acetato (99.8% anhidro), 1-propanol (99.7 %Anhidro), 2 metil 1-propanol (99.5% anhidro), 2-metil 1-butanol (99% anhidro), 3-metil 1-butanol (99% anhidro), Isoamil acetato (99% anhidro), fenil etil alcohol ($\geq 99\%$) y fenil etil acetato (99%) de la compañía Sigma-Aldrich (USA) con número de catalogo 402788, 270989, 279544, 538132, 133051, 309435, 306967, p13606 y 290580, respectivamente.

Se recomienda preparar la solución primaria disolviendo los estándares en etanol anhidro (Jelen, 1998). La solución primaria fue preparada en volumétrica de 25 ml. El volumen y las concentraciones de cada estándar que contenía la solución primaria se muestran en la tabla 5. Estas concentraciones fueron las adecuadas para que la solución de estándares diluidos en agua destilada fueran las deseadas.

Tabla 5. Volumen adicionado de cada compuesto en la solución primaria para la optimización del método HS/SPME

Compuesto	Volumen (ml)	Concentración solución Primaria (ppm)
Acetaldehído	0.4	12480
Etil acetato	0.2	7216
1-propanol	0.4	12864
2 metil, 1-propanol	0.4	12848
2 metil, 1-butanol	0.2	6400
3 metil, 1-butanol	0.4	12800
Isoamil Acetato	0.02	704
2 fenil, etil alcohol	0.2	8160
2 fenil, etil acetato	0.03	1236

Para preparar la solución de estándares se tomó una alícuota de 50 μl de la solución primaria, se adicionó a una volumétrica de 50 ml, se disolvieron en agua y etanol para preparar una solución acuosa al 5% v/v de etanol. El agua destilada usada fue del sistema modelo Aqua-Summa II de la compañía Culligan, IL, USA. Las concentraciones de cada compuesto en la solución de estándares se encuentran en la tabla 6. Estas concentraciones se seleccionaron tomando como base estudios previos que muestran el rango de concentraciones que comúnmente se encuentran en la cerveza.

Tabla 6. Concentraciones de los compuestos volátiles de interés en la solución estándar para la optimización de los parámetros de SPME

Compuesto	Concentración (ppm)
Acetaldehído	12.5
Etil acetato	7.2
1-propanol	12.9
2 metil, 1-propanol	12.8
2 metil, 1-butanol	6.4
3 metil, 1-butanol	12.8
Isoamil Acetato	0.70
2 fenil, etil alcohol	8.2
2 fenil, etil acetato	1.2

Optimización de parámetros de extracción por SPME

En estudios previos (Pinho et al., 2006) se han optimizado algunos parámetros para la extracción de compuestos volátiles en cerveza por SPME, tales como: la cantidad de muestra (entre 3 y 5 g) y el volumen del frasco de vidrio (15 ml). La absorción incrementó rápidamente según aumentaba la cantidad de muestra; hasta que se mantuvo constante con una cantidad de muestra mayor a 5 g. Un incremento en sensibilidad se observó cuando se adicionaron 1.5g NaCl a la muestra, aunque la absorción fue mayor cuando la concentración de sal fue de 2g NaCl (Pinho et al., 2006).

Durante este experimento se utilizó un frasco de vidrio transparente de 15 ml (no.27184, Supelco, Bellefonte, PA, USA) con una tapa de rosca y un septum de PTFE, la temperatura de extracción fue de 24°C y la cantidad de sal fue 2 g NaCl y se mantuvieron constantes para el análisis de compuestos volátiles en la cerveza.

Las muestras de cerveza y las soluciones acuosas de estándares fueron enfriadas a 4°C para evitar la pérdida de volátiles. Se pesaron aproximadamente 2 g de NaCl (Fischer Scientific, No. Catálogo 7647-14-5, grado ACS,) en una balanza analítica modelo LA-110 de la compañía Acculab, se adicionaron en un frasco de vidrio de 15 ml y se introdujo un agitador magnético de 2mm ID y 5 mm L. Luego se añadieron al envase 5.00 ml de la muestra con una pipeta y 200µL de la solución estándar interno con una micropipeta Eppendorf. El frasco

de vidrio fue sellado con una tapa plástica de rosca y septo de silicona (White faced, 20mm de diámetro, 0.125” de espesor, part. no. 2637505, Supelco, Bellefonte, PA, USA). La velocidad de agitación fue de 870 rpm.

Para la exposición de la fibra a la muestra, se escoge el valor # 2 del soporte de inyección manual que contiene la fibra antes de perforar el septo del envase. El soporte y las fibras fueron comprados a la compañía Supelco, Bellefonte, PA, USA. Antes de ser expuestas a la muestra, las fibras fueron acondicionadas según las especificaciones de manufacturero en el puerto de inyección del cromatógrafo de gas

Para mostrar la viabilidad de la técnica SPME, primero se optimizaron las condiciones experimentales del análisis extractivo tales como: a) tipo de fibra, b) tiempo de desorción y c) tiempo de exposición.

a) Selección de la fibra

Generalmente, el tipo de fibra que se utiliza en la extracción depende de la naturaleza química de los analitos de interés (Pawliszyn, 1997). La regla ‘similar atrae lo similar’ aplica en este caso, por lo tanto, la polaridad de los compuestos es un buen criterio para escoger el tipo de fibra (Pawliszyn, 1997). Se evaluaron 3 diferentes fibras con diferente polaridad con la finalidad de escoger la más adecuada para analizar los compuestos volátiles de interés en la cerveza. Las fibras evaluadas fueron Polidimetilsiloxano 100 μm (PDMS), 75 μm Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano 50/30 μm (DVB/CAR/PDMS). Todas las fibras fueron compradas a Supelco, Bellefonte, PA, USA.

Para escoger la fibra adecuada, se expuso cada fibra a una muestra de cerveza a las condiciones que se especificaron en la página anterior, con un tiempo de exposición de 30 minutos y un tiempo de desorción en el inyector del cromatógrafo gas de 10 minutos. Las muestras se realizaron por triplicado. Se escogieron las fibras que mostraron buena selectividad para los compuestos volátiles de interés.

b) Tiempo de desorción

Las fibras seleccionadas con anterioridad fueron expuestas en el inyector del cromatógrafo de gas a diferentes tiempos de desorción. La temperatura del inyector fue de 250 °C y 290 °C para las fibras PDMS y CAR/PDMS, respectivamente, según la temperatura máxima que recomienda el fabricante. La fibra PDMS fue expuesta por 5, 7 y 10 minutos en el inyector del cromatógrafo de gas, mientras que la fibra CAR/PDMS fue expuesta por 10, 15 y 20 minutos. Se expuso cada fibra a una muestra de la solución de estándares (ver tabla 6), con un tiempo de exposición de 30 minutos. Las muestras se realizaron por triplicado.

Se escogieron las fibras que mostraron una desorción completa de los compuestos volátiles. Para garantizar, esto luego de cada análisis en el cromatógrafo de gas la fibra fue expuesta nuevamente para observar si existió una desorción completa de los analitos de interés.

c) Tiempo de exposición

Finalmente la fibra seleccionada fue expuesta al espacio gaseoso del frasco de vidrio que contiene la solución de estándares por 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. Se debe evaluar nuevamente el tiempo de desorción para garantizar la liberación completa de los compuestos de interés para los diferentes tiempos de exposición.

Luego de determinar el tiempo de exposición óptimo, se evaluó si dejar equilibrar la muestra (es decir fase líquida y fase gaseosa) por un periodo de tiempo antes de ser expuesta la fibra a la fase gaseosa aumenta la cantidad de compuestos extraídos por la fibra. Para esto se dejó equilibrar el espacio gaseoso y la muestra líquida en el frasco de vidrio por 0, 10 y 20 minutos. Cada muestra se hizo por triplicado.

3.3.4.2 Análisis Cromatográfico GC-MS

Las muestras se analizaron por cromatografía de gas acoplada a un detector selectivo de masas (GC-MS) para analizar su composición química. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gas, GC modelo 6890 de la compañía Hewlett Packard, equipado con una columna capilar. En este estudio se utilizó una columna no polar BP1, fase estacionaria 100%

dimetilpolisiloxano (SGE, part. No. 054047, Texas, USA) 30m de largo, 0.32 mm diámetro interno y un espesor de película de 1 μm . El gas de arrastre utilizado fue helio de alta pureza (99.999%), a flujo constante dentro de la columna de 1.0mL/min. La rampa de temperatura utilizada para la separación de los compuestos volátiles fue de la siguiente manera: 35°C por 7 min; aumentar a 8°C/min hasta 200°C y mantenerlo por 5 min; aumentar a 10°C/min hasta 250°C y mantenerlo por 10 min

El inyector estuvo equipado con una camisilla de vidrio o liner de 0.75 mm de diámetro interior (Inyección SPME, part. no. 2637505, Supelco, Bellefonte, PA, USA) y un septo (Thermogreen LB-2, Supelco, Bellefonte, PA, USA), operado a modo de inyección “splitless” a una temperatura según la naturaleza de la fibra (250°C para PDMS y 290 °C para CAR/PDMS) y a un flujo de purga total de 50.9 mL/min. El detector selectivo de masas (MS), modelo 5973 de la compañía Hewlett-Packard con sistema de ionización por impacto de electrones operado a 70 eV, a temperatura de cámara de ionización de 250 °C, a razón de barrido de 1.21 s^{-1} e intervalo de masa de 35 a 350 uma y operado con un analizador másico cuadrupolar, con el programa HP-Chem, Enhanced Chemstation, versión 4.03.00-1996 de la compañía Hewlett Packard.

Luego de la extracción de los compuestos volátiles por la fibra, cuando los compuestos han alcanzado el equilibrio entre la fase estacionaria de la fibra y la muestra a un tiempo previamente optimizado, la fibra fue retraída. Luego fue insertada en el septo del puerto de inyección del GC/MS para la desorción térmica de los mismos. Transcurrido el tiempo de desorción optimizado se retrajo la fibra y se retiró el dispositivo SPME del equipo.

El detector respondió a la presencia de los analitos eluidos a la salida de la columna, generando con el programa de la computadora un cromatograma con una serie de picos o compuestos identificados en cada muestra. El cromatograma, llamado también cromatograma de iones totales (CIT) es una gráfica de la función de abundancia versus tiempo de elusión o tiempo de retención de cada compuesto de la muestra. El detector no sólo detectó la aparición de los picos al final de la columna, sino también proporcionó información acerca de la

identidad del compuesto. Esto se llevó a cabo cuando se produjo la migración de las moléculas de los analitos de la muestra a la fuente de ionización donde fueron impactados por un flujo de electrones con energía de 70 eV para ionizar las moléculas, produciéndose luego la separación de los iones generados, en base a su razón masa-carga (m/z) por el analizador cuadrupolar de masas.

Todos los iones de masa específica fueron detectados haciendo barridos varias veces por segundo para el rango de masa asignada. La abundancia o número de iones por barrido es generado versus la razón masa-carga (m/z) de los fragmentos de iones de cada compuesto de la muestra, esta gráfica recibe el nombre de espectro de masas. Se compararon los espectros de masa correspondientes a cada uno de los componentes que se observaron en los cromatogramas reconstruidos de cada muestra (cromatograma de iones totales, CIT) con los espectros del banco de datos de los programas de la biblioteca electrónica de espectros de masa en formato CD-ROM, Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6ta edición, 1998 de 230,000 compuestos y Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7ma edición, 2003 de 390,000 compuestos de la compañía Palisade Corporation, USA.

Cada muestra siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente y fueron trabajadas cada una de ellas por triplicado. Además se acondicionó la fibra (proceso requerido para remover las impurezas en ella), luego de cada inyección de la muestra al equipo cromatográfico. Este proceso de acondicionamiento se realizó en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gas, GC modelo 5760 de la compañía Hewlett Packard con un detector de ionización de flama (GC/FID), a una temperatura y tiempo establecido según las especificaciones del fabricante para cada fibra.

3.3.4.3 Cuantificación de compuestos volátiles por SPME/GC/FID

3.3.4.3.1 Preparación de estándares

Para la cuantificación de los compuestos volátiles, se utilizó la técnica de adición de estándar interno. En esta, se adicionan cantidades conocidas de los compuestos de interés y del estándar interno a la muestra, o a una matriz parecida, antes de la extracción. En muchos

casos, solo ciertos componentes son deseados para ser analizados, por lo cual se prepara una mezcla sintética conteniendo cada componente y el estándar interno (Hites, 2000).

Luego de la extracción, se determina el factor de respuesta entre el analito y el estándar interno. El factor de respuesta de cada componente de la mezcla debe ser determinado. Esta relación es luego utilizada para determinar la cantidad presente de los compuestos en la muestra inyectada al sistema GC; siempre y cuando la concentración del estándar interno sea la misma en la muestra (Hites, 2000). El factor de respuesta FRR se determina como:

$$FRR = \frac{A_c \times C_{IS}}{A_{IS} \times C_c}$$

A_c = área del analito

C_{IS} = concentración de estándar interno

A_{IS} = área del estándar interno

C_c = concentración del analito.

Ecuación 3. Factor de respuesta relación entre concentraciones y áreas del analito y el estándar interno

El mejor estándar interno es un compuesto químico muy similar a los analitos de interés, así cualquier pérdida de analito durante el procedimiento analítico está contrarrestado en igual medida por la pérdida de estándar interno, por lo cual es un sistema de auto corrección (Hites, 2000). El estándar interno fue preparado como se describió en la sección anterior. Mientras que soluciones individuales de cada compuesto volátil de interés fueron preparadas para determinar el factor de respuesta entre cada analito y el estándar interno.

Se preparó una solución primaria para cada analito de interés en etanol en volumétricas de 5 ml. Las concentraciones de cada solución primaria para los diferentes compuestos de interés se encuentran descritas en la tabla 7:

Tabla 7. Concentración de cada solución primaria para cada compuesto analizado para la cuantificación de compuestos volátiles por SPME/GC/FID.

Compuesto	Volumen adicionado (ml)	Concentración (ppm)
Acetaldehído	0.05	7800
Etil acetato	0.05	9020
1-propanol	0.05	8040
2 metil, 1-propanol	0.03	4818
2 metil, 1-butanol	0.05	8000
3 metil, 1-butanol	0.05	4000
Isoamil Acetato	0.02	1760
2 fenil, etil alcohol	0.02	4080
2 fenil, etil acetato	0.01	2060

De la solución primaria de cada analito se preparó una solución acuosa al 5% (v/v) en etanol con todos los compuestos de interés en volumétricas de 50 ml con las concentraciones descritas en la tabla 8. Con esta solución se determinó el factor de respuesta relativo para cada analito de interés.

Tabla 8. Concentraciones de los compuestos volátiles de interés en la solución estándar para la cuantificación por GC/FID.

Compuesto	Concentración (ppm)
Acetaldehído	15.60
Etil acetato	39.69
1-propanol	32.16
2 metil, 1-propanol	19.27
2 metil, 1-butanol	32.00
3 metil, 1-butanol	72.00
Isoamil Acetato	2.800
2 fenil, etil alcohol	32.64
2 fenil, etil acetato	2.060

También se determinó el tiempo de retención para cada compuesto volátil de interés en el sistema GC/FID. Para esto se expuso la fibra a soluciones acuosas al 5%v/v de cada compuesto de interés. Las concentraciones de cada solución fueron la mitad de las concentraciones de las soluciones primarias de la tabla 7. Es necesario hacerlo con soluciones altamente concentradas para identificar claramente cada compuesto.

3.3.4.3.2 Cromatografía de gas; detector de ionización de llama (GC-FID)

La cuantificación de los compuestos volátiles se realizó por cromatografía de gas con detector de ionización de llama (GC-FID). El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gas, GC modelo 6890 de la compañía Hewlett Packard, equipado con una columna capilar. Las condiciones del instrumento fueron las siguientes:

1. Temperatura del inyector, 250 °C
2. Columna, BP1, fase estacionaria 100% dimetilpolisiloxano (SGE, part. No. 054047, Texas, USA) 30m de largo, 0.32 mm diámetro interno y un espesor de película de 1 µm.
3. Flujo de helio de alta pureza (99.999%): 1ml/min
4. Programación de temperatura: 35 °C por 7 min; aumentar a 8 °C/min hasta 200 °C y mantenerlo por 5 min; aumentar a 10 °C/min hasta 250 °C y mantenerlo por 10 min.
5. Programación en presión: 6 psi por 5 minutos, 0.22 psi/min hasta 9 psi.
6. Temperatura del ionizador de llama: 270°C.
7. Mezcla de gases para la llama: 40.0 ml/min de H₂ grado UHP y 450 ml/min de aire (grado cero), helio UHP utilizado como gas auxiliar 45ml/min.
8. Razón de adquisición de datos: 20Hz.

Se determinó el porcentaje (%) de recuperación para la correcta cuantificación de cada compuesto analizado. Para esto se preparó una solución de concentraciones conocidas de los estándares de los compuestos de interés. Se determinó la concentración de los analitos de interés con la metodología desarrollada (C_{exp}) y se comparó con la concentración real (C_{real}) de la solución según:

$$\%Recuperación = \frac{C_{exp}}{C_{Real}} \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de recuperación usado para la cuantificación de compuestos volátiles en cerveza

En una volumétrica de 50 ml se preparó una solución acuosa al 5% (v/v) en etanol y se adicionaron los compuestos de interés para tener las concentraciones que aparece en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de los compuestos deseados en la solución estándar para determinar el % de recuperación de cada compuesto.

Compuesto	Concentración (ppm)
Acetaldehído	12.48
Etil acetato	18.04
1-propanol	7.24
2 metil, 1-propanol	7.71
2 metil, 1-butanol	12.8
3 metil, 1-butanol	41.6
Isoamil Acetato	1.4
2 fenil, etil alcohol	20.4
2 fenil, etil acetato	0.58

3.3.4.3.3 Preparación de muestra

Las muestras de cerveza y soluciones de estándares fueron enfriadas a 4°C para evitar la pérdida de compuestos volátiles. Se pesaron aproximadamente 2 g de NaCl (Fischer Scientific, No. Catálogo 7647-14-5, grado ACS,) en una balanza analítica modelo LA-110 de la compañía Acculab, se adicionaron en un frasco de vidrio de 15 ml y se introdujo un agitador magnético de 2mm ID y 5 mm L. Luego se añadieron al envase 5.00 ml de la muestra con una pipeta y 200µL de la solución estándar interno con una pipeta Eppendorf. El frasco de vidrio fue sellado con una tapa plástica de rosca y septo de silicona (White faced, 20mm de diámetro, 0.125” de espesor, part. no. 2637505, Supelco, Bellefonte, PA, USA). La velocidad de agitación fue de 870rpm. El tiempo de exposición de la fibra escogida durante la optimización fue de 45 min a temperatura de salón, 24 °C y el tiempo de desorción en el inyector del cromatógrafo gas fue de 15 min.

3.3.5 Evaluación Sensorial

Se realizaron dos diferentes pruebas de análisis sensorial y para ambas pruebas se utilizó un panel de expertos (maestros cerveceros) de tamaño 3. La primera fue una prueba de diferencia al control. La cual permite encontrar diferencia general al comparar más de un tratamiento contra el tratamiento control. Esto es posible debido a la presencia de un control ciego como parte de los tratamientos bajo consideración por los panelistas. Este control ciego es el que permite determinar si la diferencia percibida por los panelistas es o no estadísticamente significativa. Se almacenaron 3 cervezas de cada tratamiento en la nevera al menos 24 horas antes de la prueba. Cerca de los 10 minutos antes de la prueba se mezclaron las tres cervezas de cada tratamiento en un vaso de vidrio de 1L el cual fue previamente lavado y secado al horno para eliminar cualquier olor o sabor que pudiera afectar el análisis. A cada panelista se le sirvieron en vasos estériles de plástico transparentes la cerveza de cada tratamiento, más el control ciego, y una cerveza adicional que era el “control”, para un total de 6 cervezas por cada uno. Los panelistas deben comparar la diferencia general que observan en cada muestra contra la muestra control. Se les dio agua a temperatura ambiente previamente filtrada y galletas de soda sin sal para que mojaran el paladar entre cada muestra. Cada panelista tenía un formato en el cual tenía una escala de 0 a 15 donde 0 es que la cerveza evaluada es igual que la cerveza control y 15 es que la cerveza evaluada es totalmente diferente a la cerveza control.

La segunda prueba fue un análisis descriptivo. El objetivo de esta prueba era evaluar cada cerveza individual según las características sensoriales que le impartían los compuestos volátiles de nuestro interés (ésteres, aldehídos y alcoholes superiores) al producto final. Estos se clasifican como: aroma alcohólico (etanol y alcoholes superiores); detergente, solventes, laca o barniz; frutas (cualquiera o combinación de estas); acetaldehído (manzana verde, cáscara de manzana). Estos atributos son evaluados por un panel, en una escala de 1 a 4 donde 1 es la clasificación como el nivel no deseado en el producto y la calificación de 4 es el nivel deseado para el producto. Las muestras fueron preparadas igual que la prueba

anterior, la única diferencia fue que se realizaron dos sesiones para el catado de todas las cervezas respecto del control.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de compuestos volátiles por SPME/GC-MS/FID

4.1.1 Optimización de parámetros de extracción por SPME

4.1.1.1 Tipo de fibra

Como se observa en la figura 3, las fibras PDMS y CAR/PDMS, tuvieron una mayor respuesta (mayor abundancia) de los analitos de interés comparada con la fibra DVB/CAR/PDMS para el análisis de cerveza. Sin embargo la fibra DVB/CAR/PDMS captura un mayor rango de compuestos volátiles, por lo cual sería ideal para un análisis de todos los compuestos volátiles que aportar aroma a la cerveza.

Las fibras PDMS y CAR/PDMS, también mostraron mayor selectividad por los compuestos volátiles de interés, sobre todo tienen mayor afinidad por los ésteres y alcoholes superiores. Por eso estas dos fibras fueron escogidas para los pasos siguientes en la optimización del proceso de extracción por SPME. La fibra PDMS es una fibra no polar y extrae los compuestos no polares muy bien. Sin embargo, puede ser utilizado para los compuestos polares luego de optimizar las condiciones de extracción (Pawliszyn, 1997).

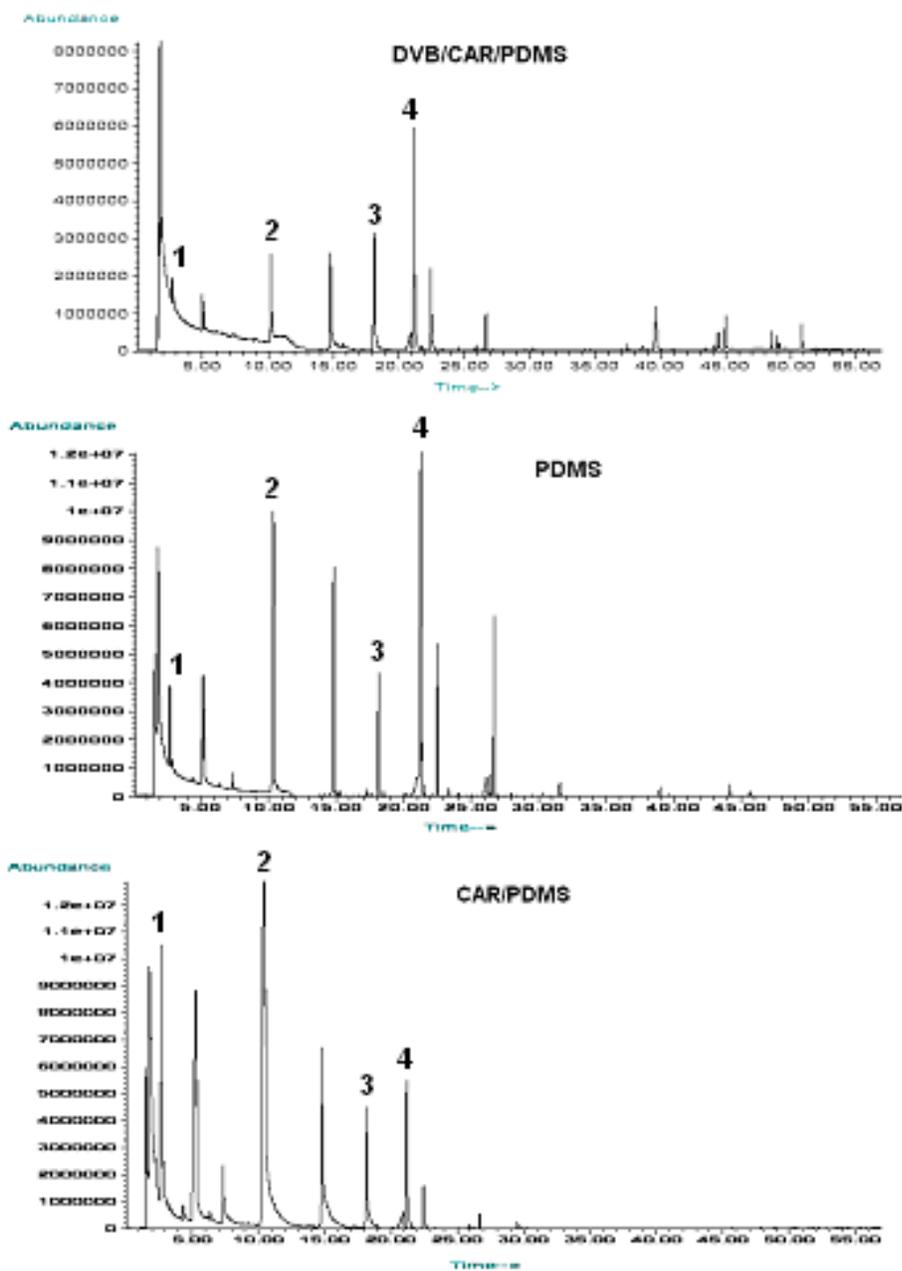


Figura 3. Cromatogramas total de iones (TIC) para las fibras escogidas el análisis de compuestos volátiles en cerveza. 1. etil acetato; 2. isoamil Acetato; 3. 2-fenil etanol; 4. 2-fenil acetato.

4.1.1.2 Tiempo de desorción

La temperatura de desorción debe ser lo suficientemente alta para liberar totalmente los compuestos volátiles absorbidos en la fibra. Por lo tanto, los factores limitantes son las

características de los compuestos y la resistencia de la fibra a las altas temperaturas (Jelen et al., 1998). Además, la temperatura del inyector y el flujo lineal alrededor de la fibra determina el tiempo de desorción. Por lo cual, aplicar temperaturas muy altas puede acortar la vida útil de la fibra y resultar en la pérdida de polímero en la fibra; causando dificultad en la separación y cuantificación (Pawliszyn, 1997).

Los tiempos de retención para el sistema de separación e identificación GC/MS de los compuestos volátiles de interés se encuentran en la tabla 10 para las dos fibras utilizadas. Como era de esperarse el tiempo de retención para ambas fibras difiere muy poco. Esto confirma que la separación la realiza la columna, y no la fibra utilizada para la extracción de los compuestos.

Tabla 10. Tiempos de retención para los compuestos volátiles de interés para las fibras PDMS y CAR/PDMS en GC/MS

Número	Compuesto	Tiempo de retención CAR/PDMS(min)	Tiempo de retención PDMS (min)
1	Acetaldehído	1.72	1.73
2	Etil acetato	2.95	3.03
3	1-propanol	2.42	2.41
4	2 metil, 1-propanol	3.22	3.26
5	2 metil, 1-butanol	6.30	6.30
6	3 metil, 1-butanol	6.17	6.17
7	Isoamil Acetato	11.84	11.93
8	2 fenil, etil alcohol	17.45	17.67
9	2 fenil, etil acetato	20.30	20.54

Según los cromatogramas de iones totales (TIC) para la fibra CAR/PDMS, el tiempo y temperatura de desorción fijada (290°C y 20 minutos) no fueron suficientes para desorber totalmente los compuestos de interés. Específicamente, el compuesto fenil etil acetato (el # 9 en la figura 4), muestra una gran afinidad por la fibra, luego de 20 minutos de estar expuesta la fibra a una temperatura de 290°C en el inyector, no lo desorbe totalmente luego de inyectar nuevamente la fibra sin acondicionarla (ver figura 5). Este comportamiento entre la fibra y este compuesto se obtiene tanto para la muestra de estándares como para la muestra de cerveza. Por lo tanto, la fibra CAR/PDMS se descarta para la cuantificación de los

compuestos volátiles, debido a que la desorción completa de los analitos es un criterio esencial para la cuantificación de compuestos volátiles por GC/FID.

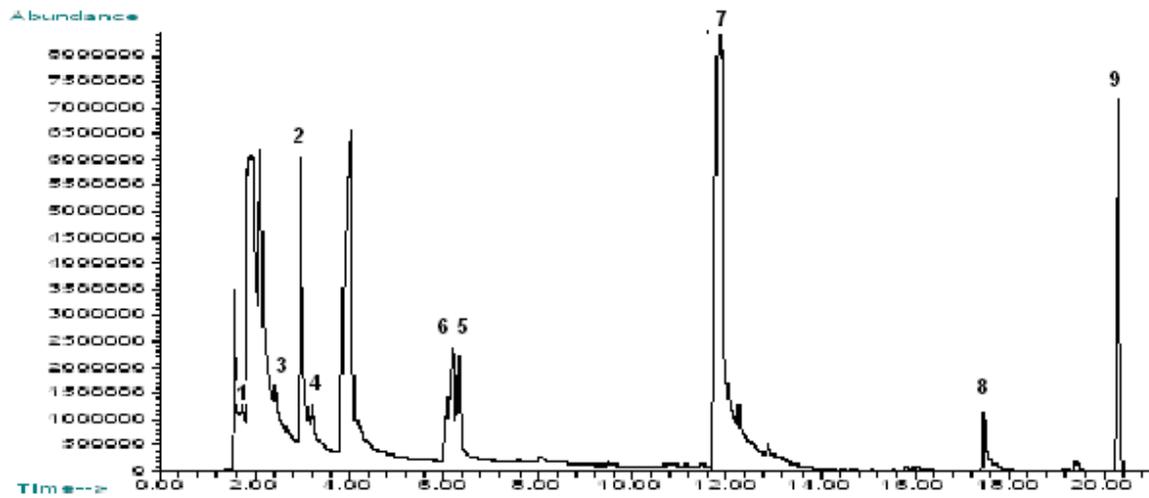


Figura 4. Cromatograma de iones totales de la mezcla preparada con los estándares de los compuestos volátiles de interés para la fibra CAR/PDMS con un tiempo de desorción de 10 minutos. Los números corresponden de cada compuesto son los mismo que los de la tabla 12.

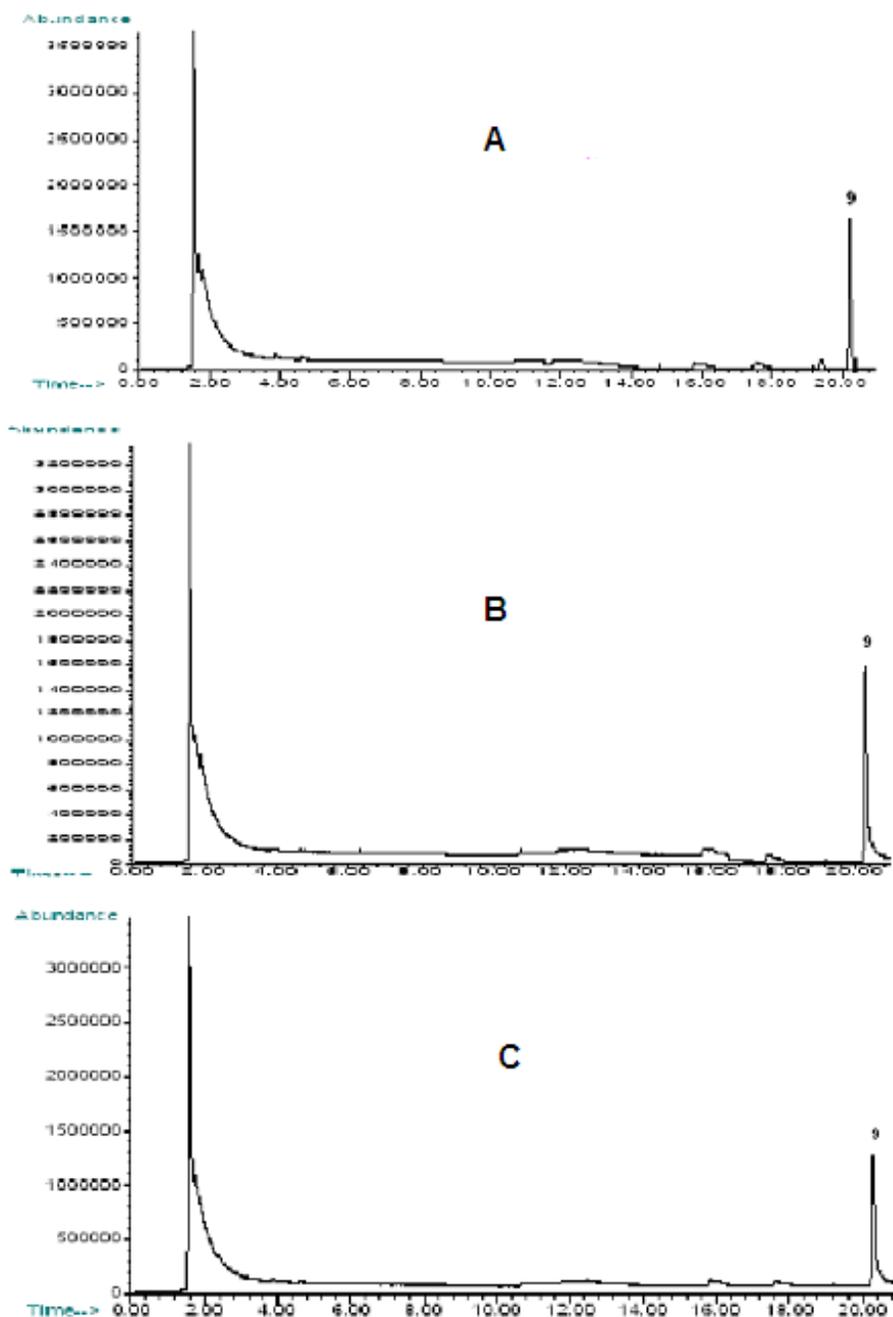


Figura 5. Cromatograma de iones totales para la fibra CAR/PDMS con diferentes tiempos de desorción para la extracción de los compuestos volátiles de interés en la cerveza. Tiempos de desorción: A. 10 minutos, B. 15 minutos y C. 20 minutos.

Para la fibra PDMS todos los compuestos fueron totalmente desorbidos a los 10 minutos de la fibra ser expuesta a una temperatura de 270 °C en el inyector es decir luego de ser la fibra

expuesta nuevamente al inyector sin ser acondicionada (ver figura 7). Sin embargo cuando la fibra fue expuesta en la muestra por 45 minutos o más, la desorción de los compuestos a los 10 minutos no se alcanzaba (ver gráfica 8). Por lo tanto el tiempo de 15 min de desorción en el inyector es adecuado para una desorción completa para la cuantificación de los compuestos volátiles de interés presentes en la cerveza.

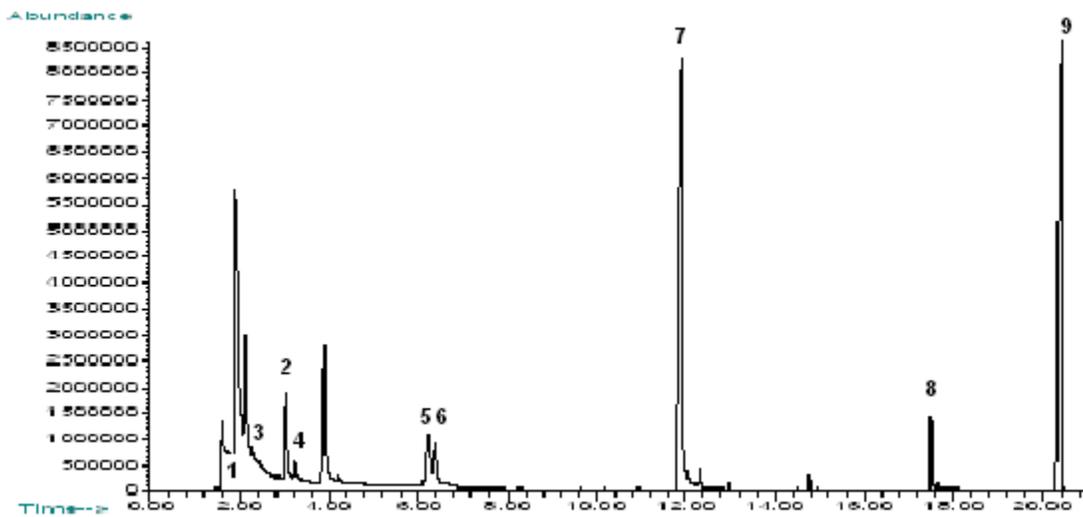


Figura 6. Cromatograma de iones totales de la mezcla preparada con los estándares de los compuestos volátiles de interés para la fibra PDMS con un tiempo de desorción de 5 minutos

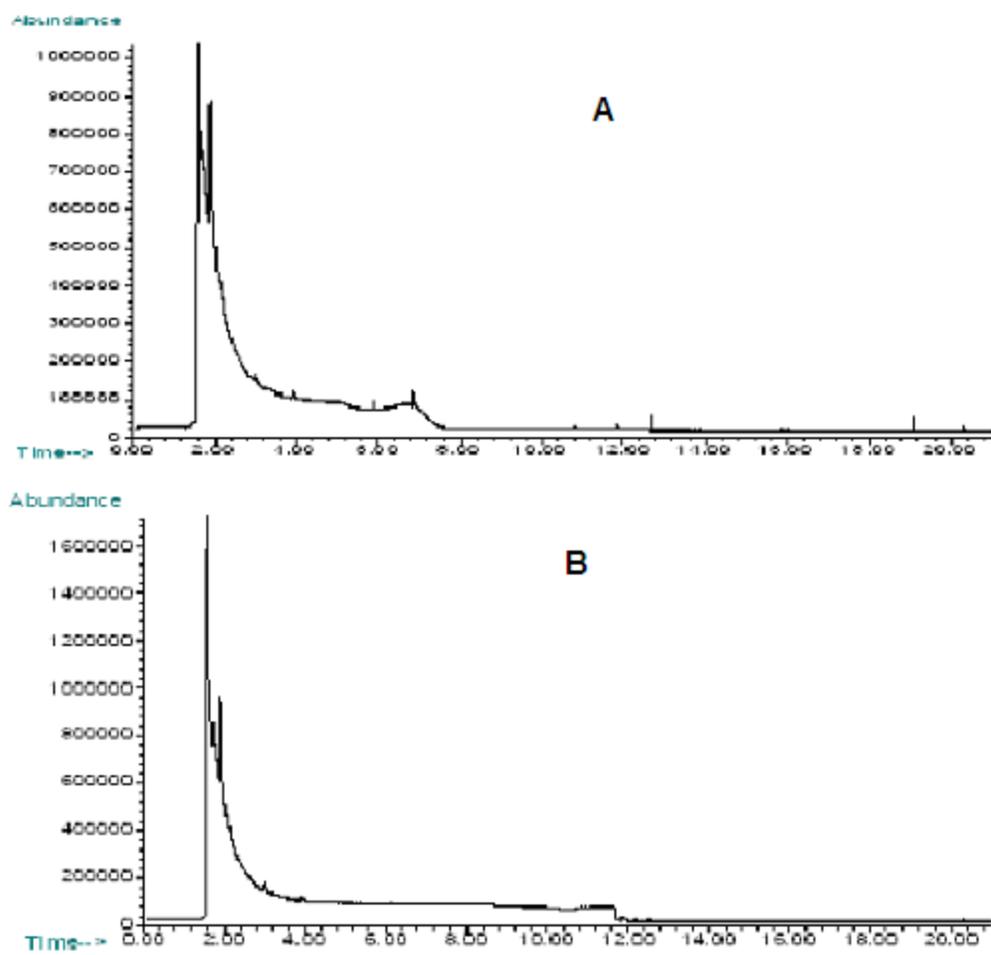


Figura 7. Cromatograma de iones totales para la fibra PDMS con diferentes tiempos de desorción para la extracción de los compuestos volátiles de interés en la cerveza. 30 minutos de tiempo de exposición y Tiempos de desorción: A. 5 minutos y B. 10 minutos.

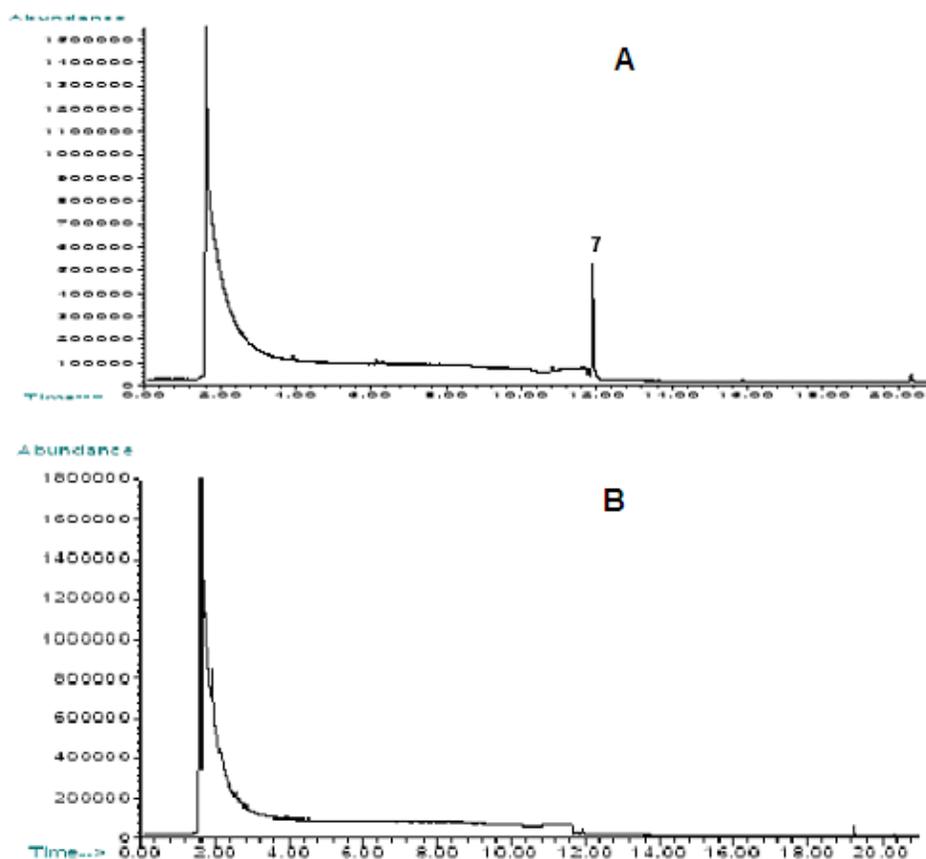
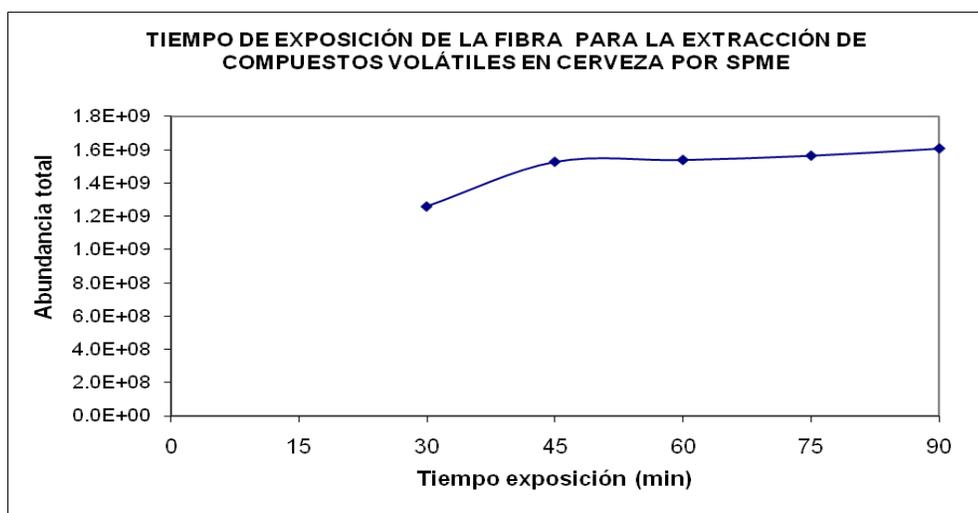


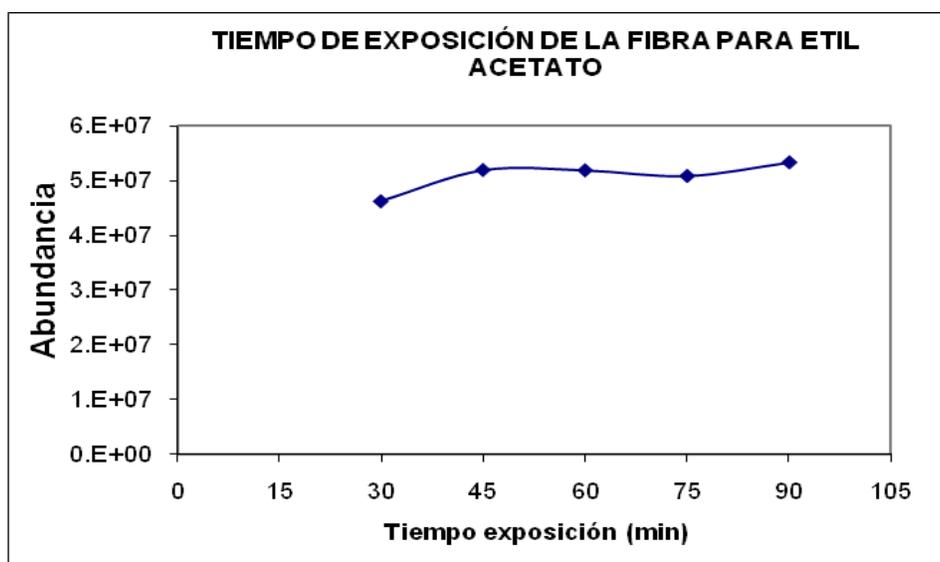
Figura 8. Cromatograma de iones totales para la fibra PDMS con diferentes tiempos de desorción para la extracción de los compuestos volátiles de interés en la cerveza. 45 minutos de tiempo de exposición y Tiempos de desorción: A. 10 minutos y B. 15 minutos.

4.1.1.3 Tiempo de extracción

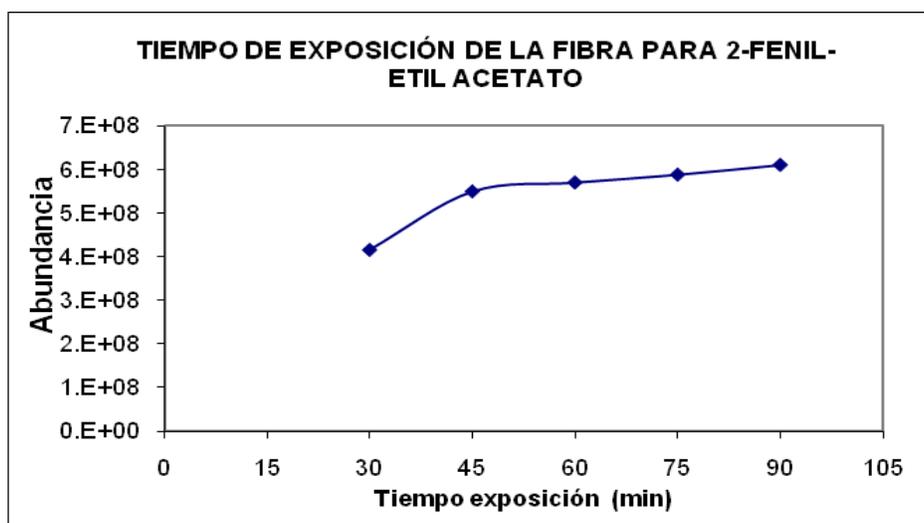
La fibra fue expuesta por 30, 45, 60, 75 y 90 min a la mezcla de estándares de los compuestos volátiles de interés. Las fases fibra, espacio gaseoso y líquido alcanzan el equilibrio luego de 45 min (ver gráfica 1), es decir, la cantidad extraída de los analitos analizados es aproximadamente constante en las tres fases y es independiente del tiempo de exposición de la fibra a la muestra. Este mismo comportamiento del tiempo de exposición fue alcanzado para cada compuesto individualmente. Sin embargo el equilibrio para los compuestos más volátiles (gráfica 2) se alcanzó mucho más rápido comparado con los compuestos menos volátiles analizados (gráfica 3).



Gráfica 1. Curva de equilibrio para los compuestos volátiles de interés presentes en cerveza con la fibra escogida (PDMS)

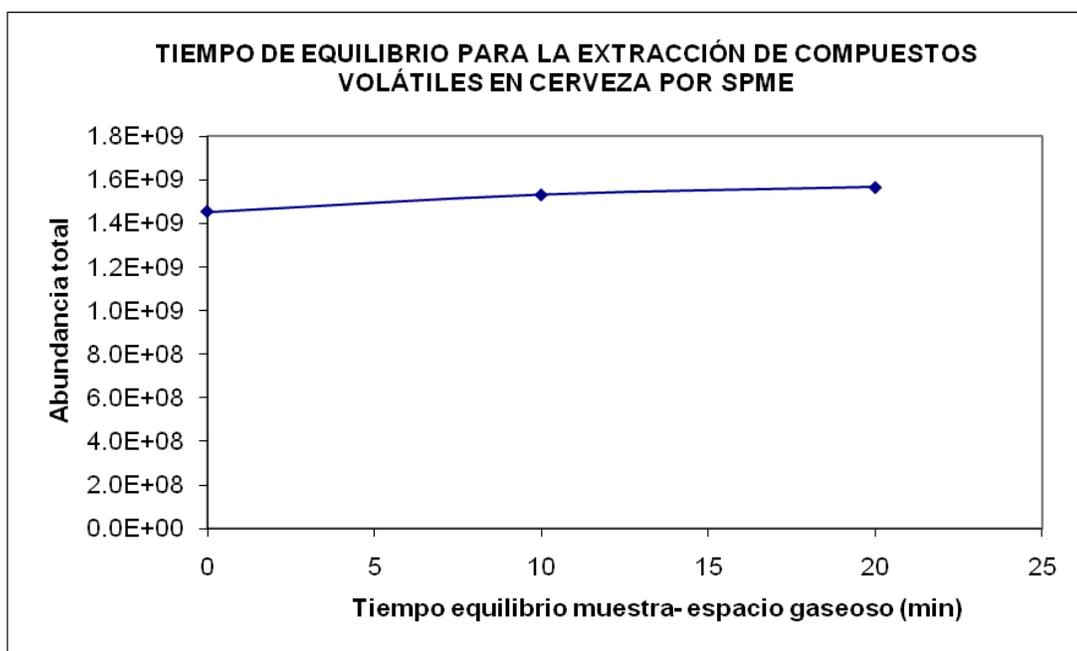


Gráfica 2. Curva de equilibrio para el compuesto etil acetato con la fibra escogida (PDMS)



Gráfica 3. Curva de equilibrio el compuesto 2-fenil-etil acetato para la fibra escogida (PDMS)

Posteriormente fue evaluado el tiempo de equilibrio entre la muestra y la fase gaseosa antes de la exposición de la fibra, con el fin de determinar si la respuesta de los analitos de interés incrementaba. Los tiempos evaluados para el equilibrio entre la fase gaseosa y la muestra fueron 0, 10 y 20 minutos antes de la exposición de la fibra a la muestra por 45 minutos. Se encontró que la respuesta total es considerablemente constante y, como la respuesta total del instrumento es un reflejo de la cantidad extraída por la fibra, se determinó que no es necesario este equilibrio antes del tiempo de exposición, ya que se quiere un tiempo de análisis lo más corto posible (gráfica 4).



Gráfica 4. Tiempo de equilibrio entre el líquido y la fase gaseosa antes de ser expuesta la fibra a la muestra.

4.1.2 Cuantificación de los compuestos volátiles por SPME/GC/FID

Para la cuantificación de los compuestos volátiles de interés, se determinó individualmente el tiempo de retención en el sistema GC/FID y el factor de respuesta relativo (FRR) respecto del estándar interno utilizado (1-butanol). En la tabla 11 se encuentran los valores encontrados para los analitos analizados.

El tiempo de retención de los compuestos volátiles está determinado por la afinidad con la columna y su volatilidad. Como era de esperarse los compuestos más volátiles eluyen primero que los compuestos menos volátiles a través de la columna (tabla 11 y ver figura 9).

Generalmente la precisión de un análisis con réplicas se describe en términos de la desviación estándar y la desviación estándar relativa. La desviación estándar indica qué tan dispersos se encuentran los datos del promedio y se calcula según la ecuación:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Ecuación 5. Desviación estándar.

Mientras que la desviación estándar relativa es bastante útil en la construcción de curvas de calibración y el análisis instrumental, ya que nos da una idea de la magnitud de la desviación con relación al valor promedio. Según lo anterior ésta se determina como:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Ecuación 6. Desviación estándar relativa

La desviación estándar relativa (RSD) es mayor para los compuestos muy volátiles como el acetaldehído, ya que los errores al preparar la muestra se pueden incrementar por las propiedades del compuesto. La metodología de cuantificación por SPME indica que solo los valores de RSD mayores del 15%, indican que los datos tienen una baja reproducibilidad, por lo tanto, para todos los compuestos analizados la reproducibilidad al cuantificar es aceptable (Pawliszyn, 1997).

Tabla 11. Tiempos de retención y factor de respuesta relativa para la cuantificación de los compuestos volátiles de interés por GC/FID

Número	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Desviación Estándar	Factor de respuesta relativo (FRR)	RSD (%)
1	Acetaldehído	3.35	0.005	0.08	7.25
2	Etil acetato	8.03	0.01	3.19	4.80
3	1-propanol	6.07	0.002	0.31	3.96
4	2 metil, 1-propanol	8.62	0.006	1.11	1.94
5	2 metil, 1-butanol	12.67	0.01	4.57	1.73
6	3 metil, 1-butanol	12.57	0.004	3.94	3.06
7	Isoamil Acetato	16.76	0.008	226.50	1.96
8	2 fenil, etil alcohol	22.183	0.005	4.37	4.63
9	2 fenil, etil acetato	25.142	0.008	222.20	3.08

Por otro lado, el factor de respuesta relativo muestra la afinidad del compuesto con la fibra y es una razón entre las áreas encontradas para el analito de interés y el estándar interno. Ya

que la fibra utilizada (PDMS) es no polar va a tener mucho más afinidad con los compuestos no polares (por ejemplo, 2-fenil etil acetato e isoamil acetato) que con los más polares (por ejemplo, 1-propanol). Esto conlleva a una extracción con límites de detección más bajos y más efectiva respecto de los compuestos polares. Sin embargo, esto no fue un factor limitante para los demás compuestos de interés, ya que los compuestos polares también pudieron ser extraídos con las condiciones optimizadas de la extracción.

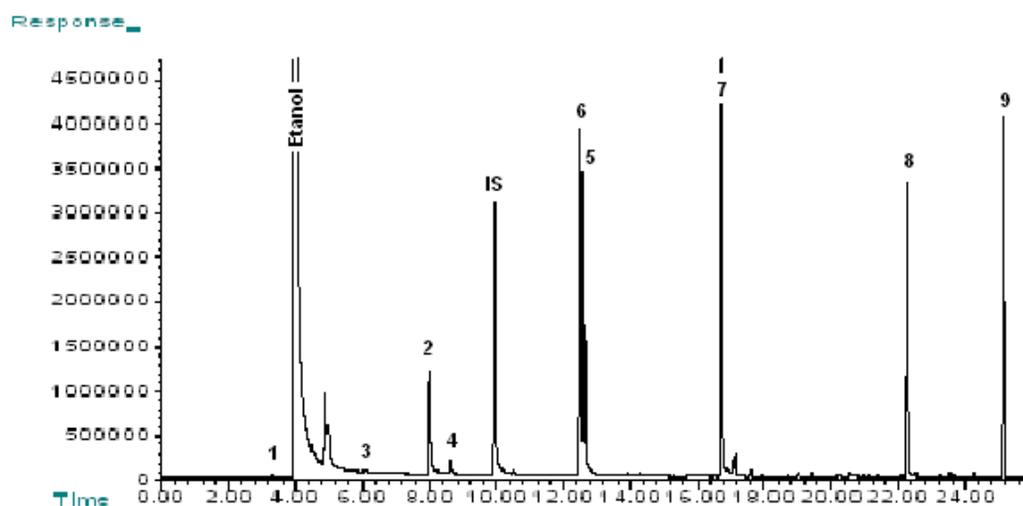


Figura 9. Cromatograma del detector de ionización de llama para la mezcla preparada con los estándares de los compuestos volátiles de interés para la fibra PDMS con un tiempo de desorción de 15 minutos y un tiempo de exposición de 45 min.

Finalmente para la cuantificación de los compuestos volátiles se determinó el % de recuperación para cada compuesto por la metodología de SPME validada. Se obtuvieron % de recuperación mayores y menores de 100 para los compuestos volátiles de interés cuantificados.

Para los compuestos que tienen menor % de recuperación puede indicar que la fibra no tiene una muy alta afinidad (por ejemplo, acetaldehído) que puede ser afectada por las condiciones de extracción y las propiedades químicas del analito. También puede mostrar el deterioro de la fibra debido a su uso y esto puede afectar la absorción de los compuestos de interés. Por otro lado, los compuestos volátiles que presentan valores mayores a 100% puede deberse a la alta afinidad de la fibra (PDMS) (por ejemplo isoamil acetato) por este compuesto, hace que

el programa de integración del equipo, no integre desde la base del pico por lo que puede registrar una mayor área y por consiguiente sería una mayor concentración. Además de los errores de experimentación al preparar la muestra y el estándar interno. Es por esto que es tan importante calcular este parámetro para ajustar los valores encontrados a sus valores reales (ver tabla 12).

Tabla 12. % de recuperación para los compuestos volátiles de interés cuantificados por la metodología SPME/GC/FID.

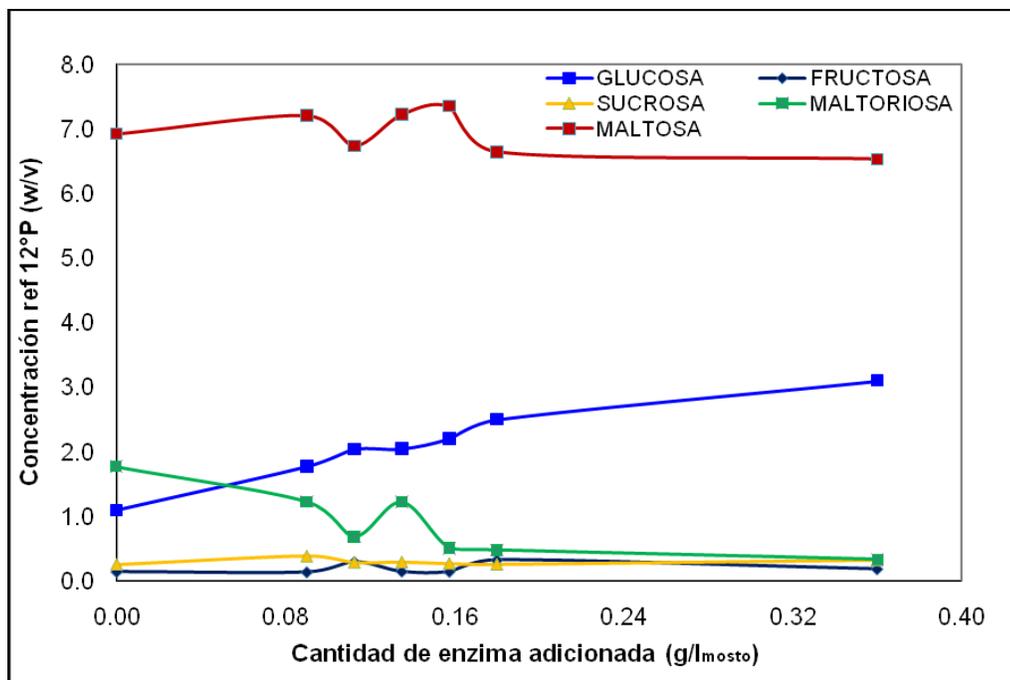
Compuesto	Concentración Teórica (ppm)	Concentración Encontrada (ppm)	ST	RSD	% Recuperación
Acetaldehído	12.5	6.3	0.18	2.9	50.6
Etil acetato	18.0	17.0	0.30	1.7	94.1
1-propanol	7.2	3.0	0.15	4.9	41.2
2 metil, 1-propanol	7.7	8.7	0.58	6.7	112.9
2 metil, 1-butanol	12.8	15.6	0.54	3.5	121.7
3 metil, 1-butanol	41.6	38.7	0.95	2.5	93.0
Isoamil Acetato	1.4	1.6	0.04	2.4	114.6
2 fenil, etil alcohol	20.4	16.3	0.84	5.2	79.7
2 fenil, etil acetato	0.6	0.6	0.03	4.6	96.4

4.2 Efecto de la enzima glucoamilasa en el perfil de azúcares fermentables

Las enzimas presentes en el grano de cebada malteada durante la maceración convierten el almidón en azúcares fermentables. α y β amilasa reducen las cadenas de amilosa y amilopectina en maltosa, maltotriosa y glucosa. Desafortunadamente, éstas enzimas no son capaces de romper los enlaces α ,1-6 de la amilopectina lo que resulta en la formación de dextrinas. Para la producción de cervezas tipo “light” es necesario adicionar otra enzima para que disminuya la cantidad de calorías en el producto final aportado por las dextrinas. Por lo cual adicionar la enzima glucoamilasa durante la maceración puede ser una opción para obtener mostos con un contenido más alto en glucosa. La glucoamilasa es capaz de producir glucosa a partir de dextrinas, maltotriosa y maltosa.

Como se observa en la gráfica 5, adicionar la enzima durante el tiempo y temperatura de maceración (30 min y 65°C), no es suficiente para que se aumente considerablemente la concentración de glucosa en el mosto. Además no se observó una disminución considerable en la concentración de maltosa en el mosto. Esta lenta acción de la enzima se debe a que su pH óptimo está entre 4.0-4.5, y el pH del mosto es de 5.4. Por lo tanto es necesario mayor tiempo de acción o mayor cantidad de enzima.

Solo se observó un ligero aumento en la formación de glucosa, debido a la acción de la glucoamilasa sobre las moléculas de maltosa, maltotriosa y dextrinas. Es importante anotar que la acción de la enzima es más evidente para la maltotriosa que para la maltosa. También, la enzima no tiene efecto sobre la producción de sacarosa ni de fructosa.

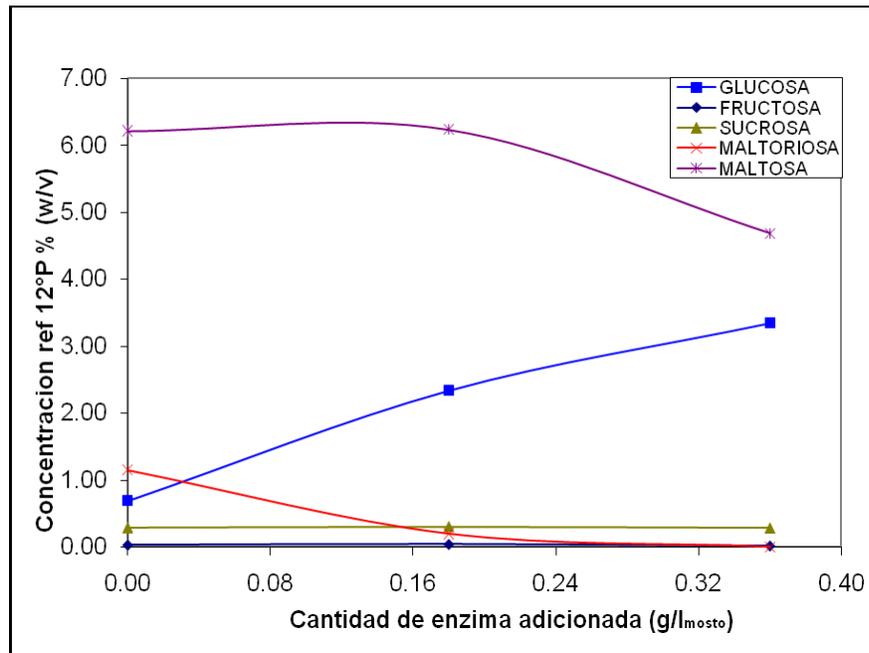


Gráfica 5. Efecto en la concentración de azúcares fermentables en el mosto con la adición de glucosamilasa durante la maceración (30 min a 65°C).

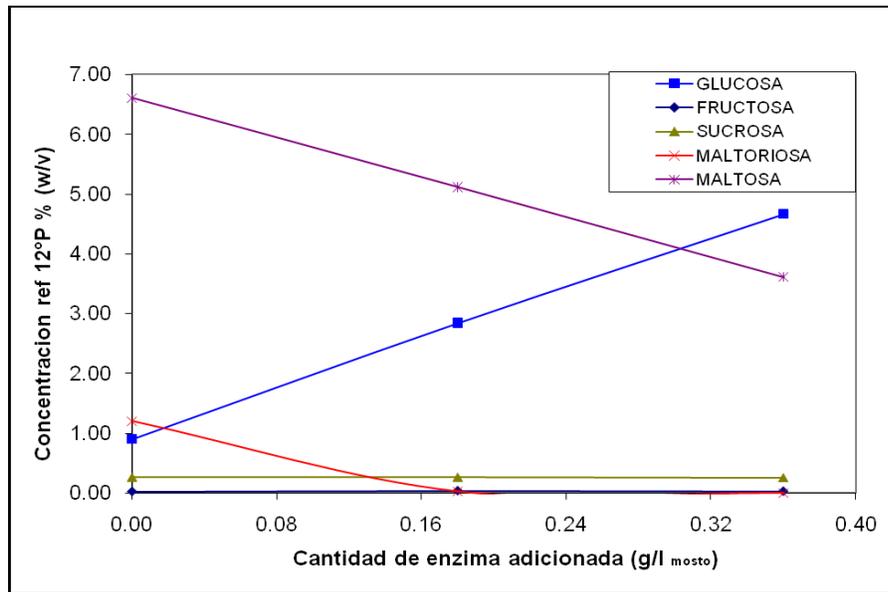
Aumentar el tiempo de maceración y aumentar la cantidad de enzima (respecto de la usada en la fermentación, dos y cuatro veces más) podría ser una posible solución. Sin embargo, hay que tener cuidado con adicionar cantidades altas de enzima, ya que puede generar

problemas en la floculación de la levadura luego de la fermentación (Samp and Silberman, 2006).

Cuando se aumentó el tiempo de maceración a 120 min con estas concentraciones de enzima se obtuvo un efecto notable en la conversión de la maltosa, maltotriosa y dextrinas a glucosa. La concentración de maltosa disminuyó de 6.6% hasta 3.6%, mientras que la de glucosa aumentó de 0.9% a 4.6%. En contraste, con la de 60 min de maceración y las mismas concentraciones de enzima, la cantidad de glucosa aumentó desde 0.7 hasta 3.3%, mientras que la concentración maltosa disminuyó desde 6.2% hasta 4.7% (ver gráfica 6 y 7). Estos valores se obtuvieron para las concentraciones más altas de glucoamilasa adicionada. Sin embargo la cantidad de glucosa y de maltosa son muy cercanas, por lo tanto es necesario adicionar mayor cantidad de enzima o tratar de aumentar el tiempo de maceración y así lograr mostos con mayor contenido de glucosa que de maltosa.

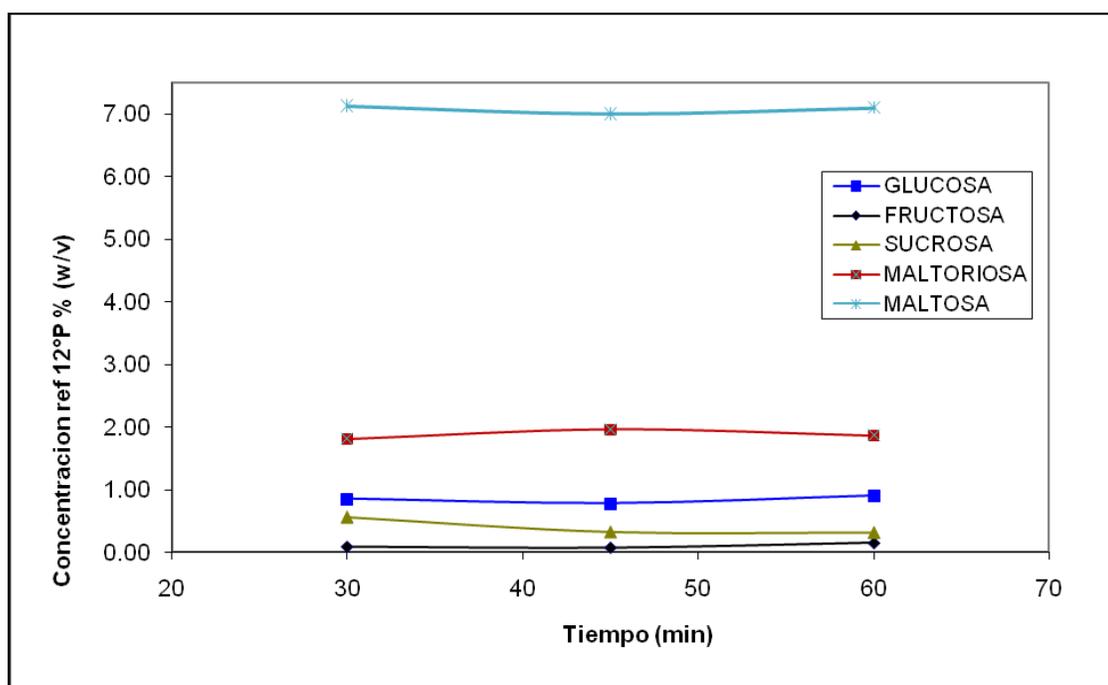


Gráfica 6. Efecto en la concentración de azúcares fermentables debido al aumento en el tiempo de maceración (60min a 65°C) y adición de glucoamilasa.



Gráfica 7. Efecto en la concentración de azúcares fermentables debido al aumento en el tiempo de maceración (120min a 65°C) y adición de glucoamilasa

Se evaluó si las enzimas (amilasas) propias de la cebada que tienen algún efecto en la conversión del almidón a azúcares fermentables debido al aumento del tiempo de maceración. Se observó que la concentración de azúcares fermentables no varía al aumentar el tiempo de maceración sin adicionar glucoamilasa (ver gráfica 8). Por lo tanto, existe un tiempo máximo de maceración para la conversión del almidón en azúcares fermentables por las amilasas de la cebada (30 minutos), que luego de éste, la cantidad de azúcares fermentables no varía; por lo cual es necesaria la adición de la enzima que ayude a producir más glucosa. Es decir el efecto del tratamiento anterior se debe solo a la acción de la enzima glucoamilasa y no a la acción de las enzimas propias de la cebada.

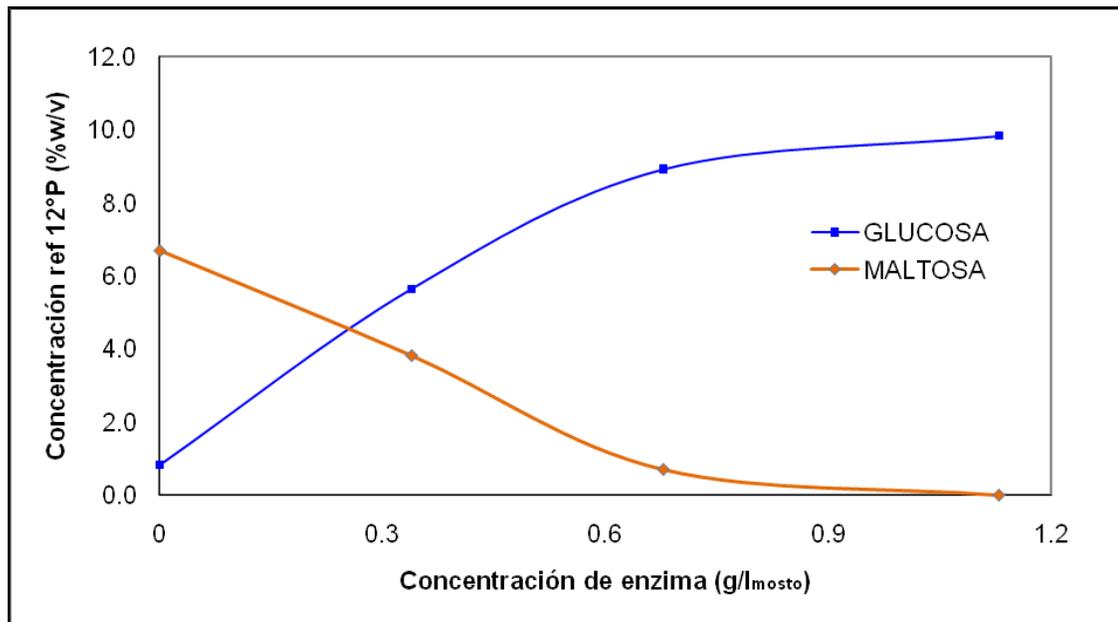


Gráfica 8. Efecto en la concentración de azúcares fermentables debido al aumento en el tiempo de maceración.

Finalmente, la glucoamilasa fue adicionada al inicio de la ebullición. Ya que la enzima no está en sus condiciones óptimas de temperatura y pH, el mosto se mantuvo por un periodo de 90min a 65°C al inicio de la ebullición. Como se ve en la gráfica 9, para estas condiciones la concentración de glucosa en el mosto aumenta a medida que se aumenta la cantidad de enzima; hasta una cantidad máxima (9.83%) según el mayor nivel de enzima adicionado. Mientras, la concentración de la maltosa disminuye a medida que se adiciona glucoamilasa siendo la menor cantidad (casi 0%) para la máxima cantidad de enzima adicionada.

Por lo tanto, se encontró que bajo estas condiciones, la glucoamilasa actúa adecuadamente para la producción de glucosa, ya que para una concentración de enzima de $1\text{g/l}_{\text{mosto}}$ se producen mostos donde la concentración de glucosa es aproximadamente 10% (w/v), mientras la concentración de maltosa se reduce cerca de 0% (w/v). Con este comportamiento de la enzima, se decidió escoger el punto óptimo de adición en el cual la concentración de glucosa supere considerablemente a la concentración de maltosa; y así obtener mostos con una mayor cantidad de glucosa que de maltosa; para observar su efecto en la producción de

compuestos volátiles. Como se observa en la gráfica 9 eso ocurre cerca de los 0.33g enzima/l_{mosto}, por lo tanto, se escogió un valor cercano a éste para realizarlo a nivel industrial (0.37g/l_{mosto}).



Gráfica 9. Efecto en la concentración de azúcares fermentables en el mosto debido a la adición de glucoamilasa con un descanso de 90min a 65°C al inicio de la ebullición.

Este buen desempeño de la enzima durante la ebullición puede deberse a que en este punto del proceso la producción de azúcares fermentables por las enzimas endógenas de la cebada ya ha terminado, facilitando el trabajo de la glucoamilasa al tener los sustratos más accesibles y no competir por los sustratos con las otras amilasas. Además, como el mosto es filtrado luego de la maceración, la clarificación del mosto ayuda a que las limitaciones de transferencia de masa entre sustrato y enzima se minimicen.

4.3 Factores que afectan la producción de compuestos volátiles

4.3.1 Cantidad de CO₂ disuelto en el medio

Para determinar el momento más oportuno de inyección de nitrógeno gaseoso al medio fermentativo con el fin de remover el CO₂ generado por la levadura, se realizó la curva de

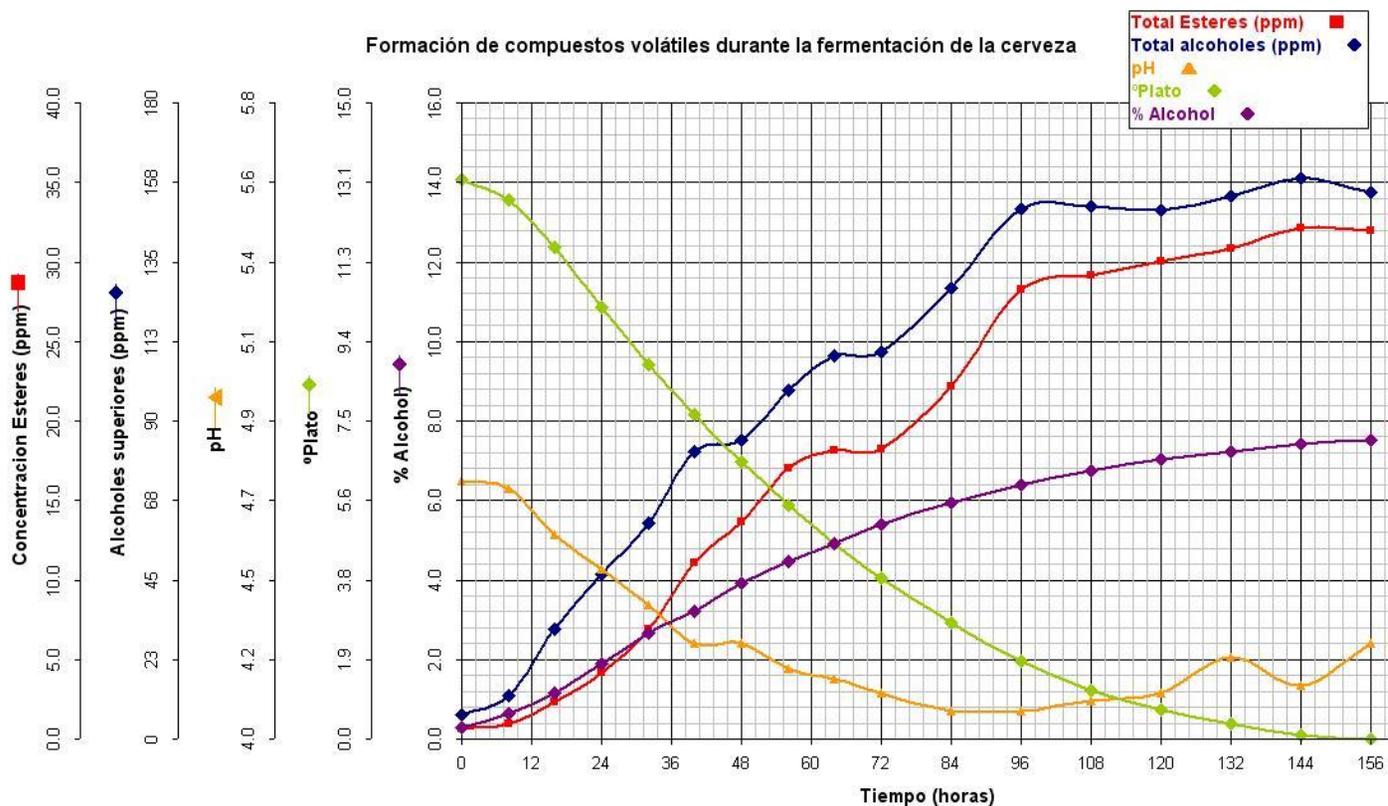
fermentación del proceso. Con esta información, se deseaba encontrar el momento durante la fermentación donde existía una alta producción de compuestos volátiles.

Como se observa en la gráfica 10, la formación de alcoholes superiores por la levadura ocurre casi desde el comienzo de la fermentación (antes de las 12 horas). Durante las primeras horas de fermentación la levadura produce poco de estos compuestos ya que se encuentra en la fase “lag”; donde se adapta al medio fermentativo y se encuentra bioquímicamente activa pero no se divide. Luego de este periodo de tiempo, los alcoholes superiores, conforme se consumen los nutrientes del medio y la levadura se multiplica, se van produciendo hasta el 4^{to} día (96 horas) de fermentación. Luego de este periodo, la escasez de nutrientes hace que la levadura deje de reproducirse y la formación de estos compuestos sea escasa.

Por otra lado, la formación de ésteres por la levadura antes del primer día (24 horas) de fermentación es muy poca, esto se debe a la baja disponibilidad del acetil CoA, (que es usado por completo para el crecimiento de la levadura) la baja actividad de la enzima AA transferasa y la cantidad baja de alcoholes superiores (su producción se acelera luego de las 12 horas de fermentación) (Yoshioka y Hashimoto, 1983a). Luego del primer día (24 horas) de fermentación, la velocidad de producción de ésteres por la levadura se incrementa hasta el cuarto día (96 horas) de fermentación. A diferencia de los alcoholes superiores, luego del cuarto día (96 horas) de fermentación la velocidad de producción de ésteres disminuye, pero su formación continúa hasta casi la finalización de la fermentación (6^{to} día o 144 horas). La disminución de producción de ésteres luego del cuarto día (96 horas) se debe al comienzo de la floculación de la levadura debido a la poca cantidad de nutrientes, por lo que empieza a disminuir la cantidad de células en suspensión para producir compuestos volátiles. Además la poca cantidad de azúcares fermentables disponibles para consumir, hace que disminuya los niveles de Acetil CoA presente dentro de la célula.

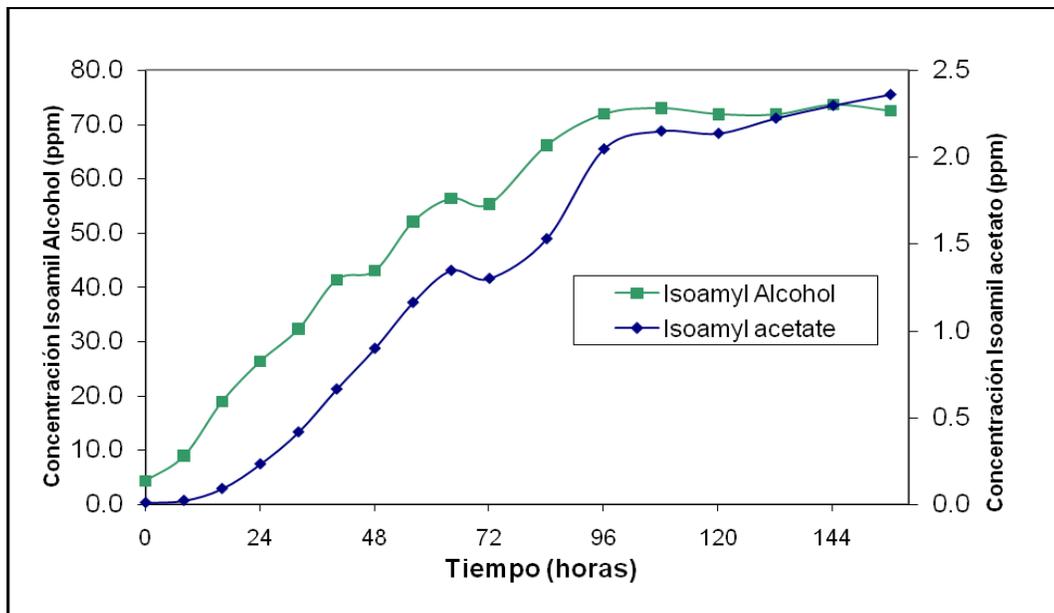
El cambio en la velocidad de producción de alcoholes superiores y de ésteres alrededor del 2^{do} y 3^{er} día (48 y 72 horas) de fermentación es muy cerca de los días de máxima producción

de CO₂ por la levadura (3^{ro} y 4^{to} día). Por lo que indicaría que el cambio en la producción de compuestos volátiles se debe a la saturación de medio de fermentación por el CO₂. Como se mencionó con anterioridad esto es perjudicial para la levadura ya que disminuye su velocidad de proliferación y disminuye la actividad de enzimas (como la alcohol acetil transferasa) necesarias para la formación de compuestos volátiles. Además, reduce los niveles de acetil CoA para el crecimiento celular y para la formación de compuestos volátiles. Se cree entonces que el punto de inflexión en la gráfica cerca de estos días sea como consecuencia de la máxima producción de CO₂.



Gráfica 10. Formación de compuestos volátiles durante la fermentación de la cerveza. A partir de mosto con 13.5 °P, temperatura de fermentación 15°C, levadura inicial 21 millones de células/ml mosto

Para observar más claramente la formación de alcoholes superiores y su relación con la producción de ésteres por la levadura, la gráfica 11 presenta la formación del isoamil acetato y su alcohol superior (isoamil alcohol) durante la fermentación. Se observa la misma tendencia observada en la gráfica 10.



Gráfica 11. Formación de Isoamil acetato y su alcohol superior precursor (Isoamil alcohol) durante la fermentación de la cerveza

Por lo tanto, el momento adecuado para disminuir la cantidad de CO_2 disuelto en el medio de fermentación sería entre el 2^{do} y 4^{to} día (48 y 96 horas), ya que durante este lapso ocurre la mayor producción de compuestos volátiles y ocurre la posible sobresaturación del medio de fermentación por CO_2 . Esta gran cantidad de tiempo de inyección de nitrógeno y el flujo necesario para remover el CO_2 disuelto en el medio fermentativo, hace que esta técnica para aumentar la formación de compuestos volátiles a nivel industrial no sea factible económicamente, y por tal razón no fue considerada.

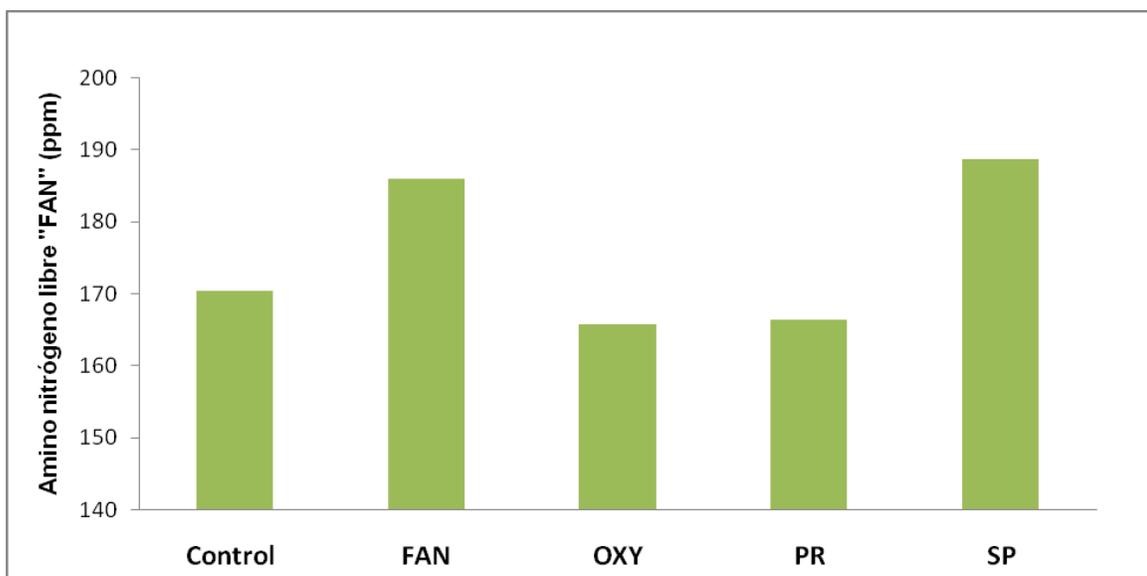
4.3.2 Amino ácidos libres (FAN)

Para aumentar el contenido de amino nitrógeno libre del mosto, se decidió realizar un descanso proteico al inicio de la maceración (50°C por 10 min), para que las enzimas proteolíticas presentes en la cebada malteada tengan mayor tiempo de acción.

Los principales grupos de enzimas envueltas en el rompimiento de las proteínas de la malta son las endoproteinasas (rompen las grandes moléculas de proteínas en cadenas de polipéptidos) y las exopeptidasas (atacan los polipéptidos desde una ramificación específica y liberan unidades de aminoácidos). Estos dos tipos de enzimas tienen una temperatura óptima de acción entre 45-50°C (O'Rourke, 2002). Como se puede observar en la gráfica 12, el descanso proteico tuvo un efecto estadísticamente significativo en el contenido de amino nitrógeno libre para los mostos sometidos a este tratamiento. Los mostos producidos sin el descanso (control) tuvieron un valor promedio de 170ppm mientras que los mostos producidos bajo este tratamiento obtuvieron una media de 186ppm.

Por otro lado, en los otros tratamientos evaluados se observó que el descanso al inicio de la ebullición (adición de glucoamilasa para cambiar el perfil de azúcares) también tuvo un aumento significativo en el contenido de amino nitrógeno libre. Esto se debe a que las exopeptidasas pueden resistir temperaturas altas y pueden liberar los aminoácidos de las cadenas de polipéptidos a estas temperaturas. En específico las aminopeptidasas (que se clasifican como exopeptidasas) que atacan las cadenas de polipéptidos desde la terminación de aminoácidos y su temperatura de inactivación está por encima de los 70°C (O'Rourke, 2002). Aunque 68°C no es su temperatura óptima de acción, se encontraban activadas, por lo que durante el periodo de tiempo que se dejó el mosto durante este descanso (90 min) alcanzó a liberar más aminoácidos al medio de fermentación (ver gráfica 12). Es decir, aumentar la cantidad de FAN en un mosto va a tener la misma magnitud si se permite un descanso proteico de 10 min a 50°C en la maceración o un descanso de 90 min a 68°C al inicio de la ebullición.

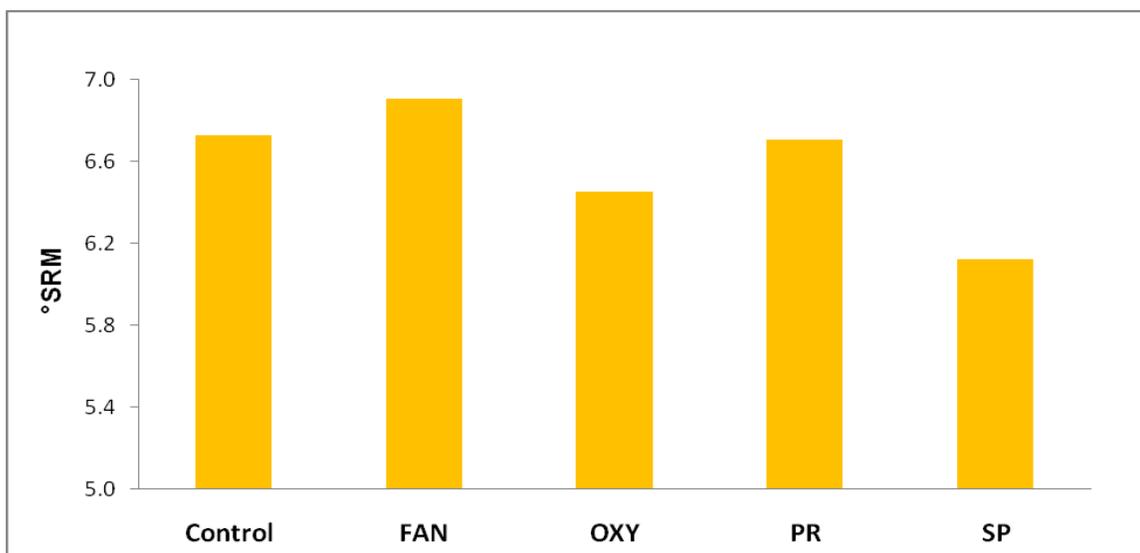
Sin embargo el contenido de nitrógeno soluble en el mosto no tuvo un cambio significativo, presentado valores promedio de 887 ppm para el control y 896 ppm para los mostos sometidos al descanso proteico. Esto puede deberse a que no existe más proteína disponible para solubilizar ya que las enzimas responsables de la solubilización de la proteína tienen la misma temperatura óptima que las enzimas responsables de producir amino nitrógeno libre en el mosto. El mismo comportamiento del nitrógeno soluble se observó para los otros tratamientos evaluados.



Gráfica 12. Contenido de amino nitrógeno libre "FAN", en los diferentes mostos producidos con los diferentes parámetros cambiados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto.

Durante la ebullición del mosto, ocurren reacciones de pardeamiento no enzimático (reacciones de Maillard), entre amino ácidos libres presentes en el medio y azúcares reductores (como glucosa o maltosa), la formación de melanoidinas por estas reacciones incrementa el color del mosto, que afectará el color final de la cerveza (Hardwick, 1994). Debido al aumento en la cantidad de amino ácidos libres en el mosto durante la maceración, existe la posibilidad de un aumento en color del mosto. Sin embargo, como se observa en la gráfica 13, no hay un aumento significativo en color para los mostos con mayor contenido en amino nitrógeno libre (6.9 °SRM) respecto del color de los mostos control (6.7 °SRM). Por

otro lado, para el tratamiento en el cual se cambio el perfil de azúcar del mosto, se observó una reducción significativa en el color del mosto (6.1°SRM), respecto del color de los mostos control. Este efecto se debe a la diferencia en el llenado del tanque de ebullición durante el tratamiento del perfil de azúcares respecto de los otros tratamientos. La carga térmica para el tratamiento del perfil de azúcares es menor al momento del llenado del tanque ya que se debe mantener a una menor temperatura al inicio, por lo que las reacciones de Maillard al inicio disminuirán y, por lo tanto, tendrá menor color respecto de los otros tratamientos.



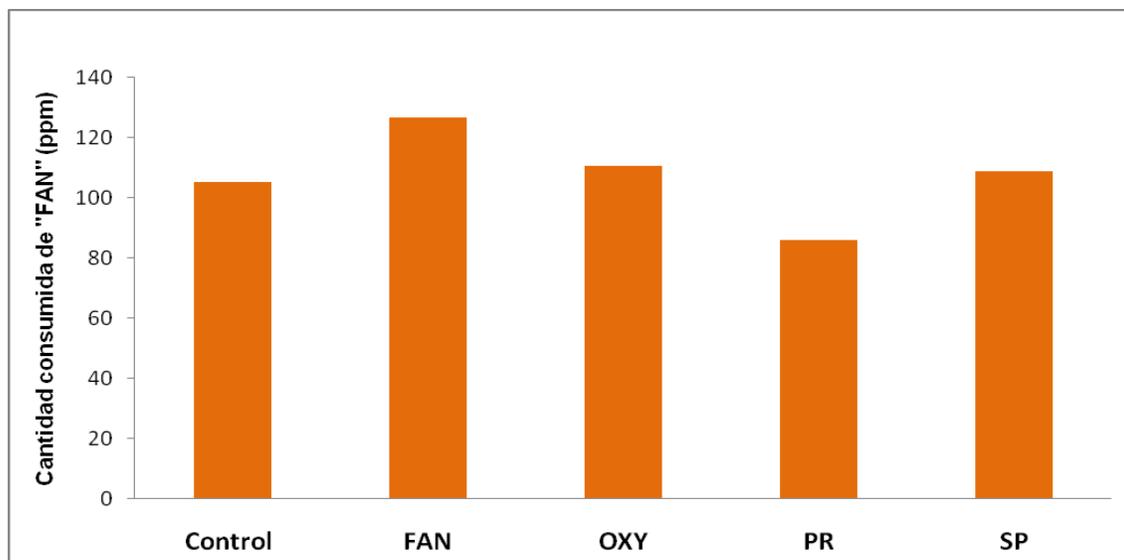
Gráfica 13. Color de los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

Por otra parte, la levadura en crecimiento requiere nitrógeno principalmente en forma de aminoácidos para la síntesis de proteínas de nuevas células. El consumo de “FAN” termina durante la fermentación cuando la proliferación celular concluye. La proliferación celular termina cuando empiezan a acumularse productos del microorganismo o se agota el consumo de nutrientes (carbohidratos o aminoácidos disponibles) (Hardwick, 1994).

Las fermentaciones realizadas con los mostos sometidos al tratamiento para aumentar el “FAN”, tuvieron un consumo significativamente mayor de amino ácidos libres que las fermentaciones control. El consumo de “FAN” promedio por la levadura en estas

fermentaciones fue de 127 ppm, mientras que la levadura de los mostos control (105 ppm) (ver gráfica 14). Por lo cual se esperaría una mayor proliferación celular para las fermentaciones con mayor contenido de amino nitrógeno libre en el medio de fermentación.

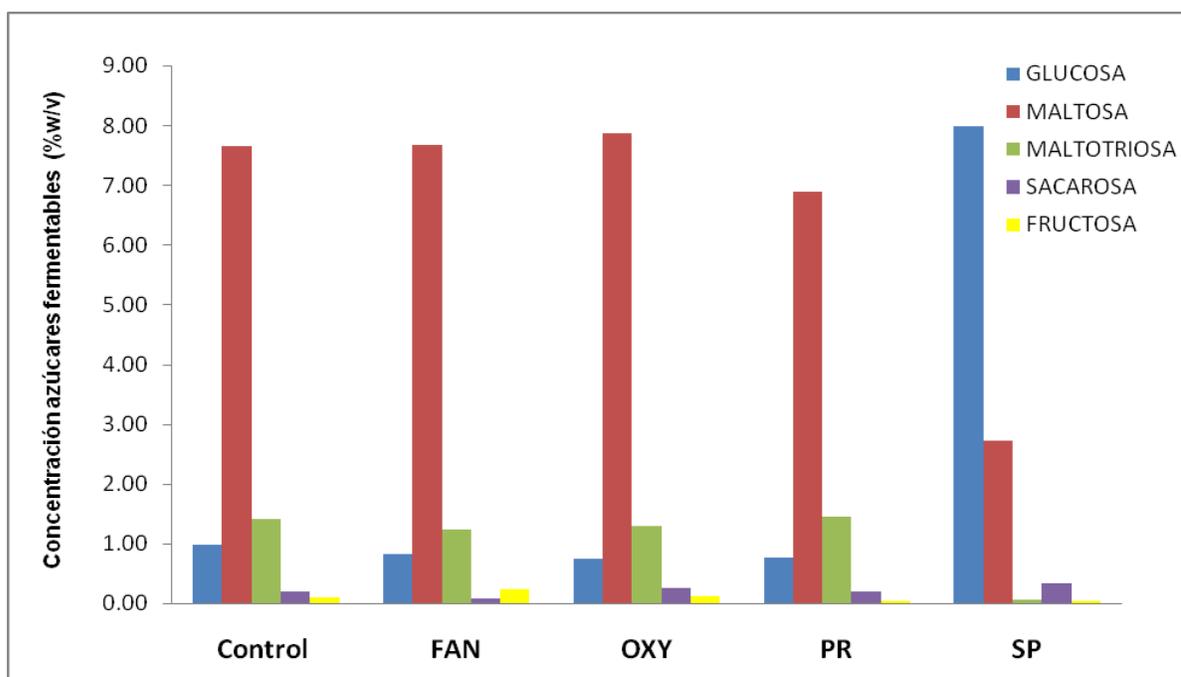
Por otro lado, el tratamiento en el cual se adicionó menor cantidad de levadura inicial, tuvo un menor consumo significativo de “FAN” por la levadura (87 ppm) durante las fermentaciones respecto al consumo en las fermentaciones control. Este comportamiento puede deberse a que, cuando se inocula con una cantidad baja de levadura, la cantidad de oxígeno utilizado por la levadura para hacer esteroides para nuevas células es bajo y el crecimiento global es bajo (Hardwick, 1994). Por lo tanto, hay menos levadura disponible para consumir los aminoácidos del medio y por eso existe un mayor remanente de estos; por lo que posiblemente la velocidad de proliferación de la levadura es menor para la producción de biomasa. Ninguno de los otros tratamientos tuvo una diferencia significativa en el consumo del FAN respecto del control.



Gráfica 14. Consumo de amino nitrógeno libre “FAN” de los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

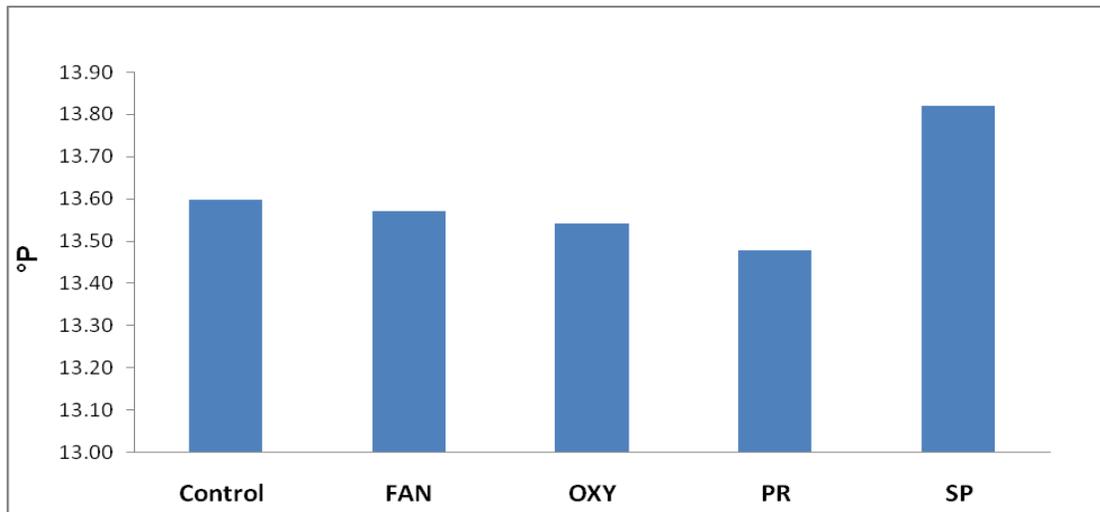
4.3.3 Perfil de azúcares fermentables

La adición de la enzima glucoamilasa al inicio de la ebullición permitió cambiar el perfil de azúcares del mosto. Mientras que los mostos producidos sin la adición de glucoamilasa presentaban concentraciones de glucosa aproximados de 1.0 %w/v, los mostos sometidos al tratamiento con la enzima obtuvieron concentraciones cerca de 8%w/v (ver gráfica 15). Este aumento en la cantidad de glucosa se debe al rompimiento de los disacáridos y polisacáridos de glucosa, como son la maltosa, maltotriosa y dextrinas. Esto se confirma con la reducción en las concentraciones de los azúcares fermentables como maltosa (se reduce de 7.6%w/v a 2.6%w/v) que su concentración se reduce casi tres veces de la concentración normal, y con la maltotriosa la reducción es más notoria (de 1.42%w/v a 0.05%w/v) obteniéndose mostos sin trazas de esta. El efecto de la adición de la enzima no produjo efectos considerables en las concentraciones de fructosa y sacarosa ya que esta enzima hidroliza el enlace α -1,4 y las ramificaciones de los enlaces de almidón (α -1,6) (Hardwick, 1994). El efecto de la enzima es concordante con el realizado en las pruebas de laboratorio. Esto confirma que las simulaciones del proceso de maceración y ebullición en el laboratorio pueden ser correlacionadas en la escala industrial.

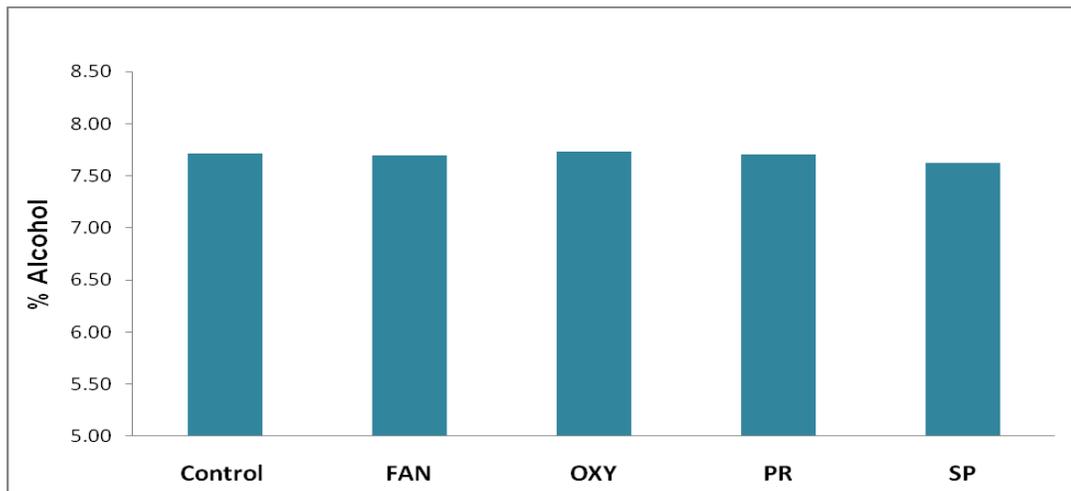


Gráfica 15. Concentraciones de los azúcares fermentables (%w/v) presentes en el mosto para los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto.

También cuando se cambió el perfil de azúcar del mosto, la cantidad de extracto en el mosto (expresada como °P) tuvo un incremento significativo (13.82°P) respecto de la cantidad de extracto de los mostos control (13.60°P) (gráfica 16). Sin embargo, este aumento en la cantidad de extracto no es lo suficientemente grande como para que afecte la producción de compuestos volátiles durante la fermentación, ni la cantidad de etanol producido por la levadura al final de la fermentación (gráfica 17). Este aumento en la cantidad de extracto es debido al llenado del tanque de ebullición durante este tratamiento. Ya que el llenado tarda unos minutos más, hay más tiempo para que el lavado del filtro con agua alcance a retirar más extracto.



Gráfica 16. Cantidad de extracto °P presente en el mosto para los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto



Gráfica 17. Porcentaje de alcohol al final de la fermentación para los diferentes mostos producidos. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

Como se indicó anteriormente, los mostos sometidos al tratamiento con la enzima glucoamilasa en la ebullición, tuvieron un incremento significativo en el contenido de amino nitrógeno libre respecto de los mostos control, por lo que se espera que el consumo de estos por la levadura fuera parecido al tratamiento en el cual se dejó el descanso proteico. Sin

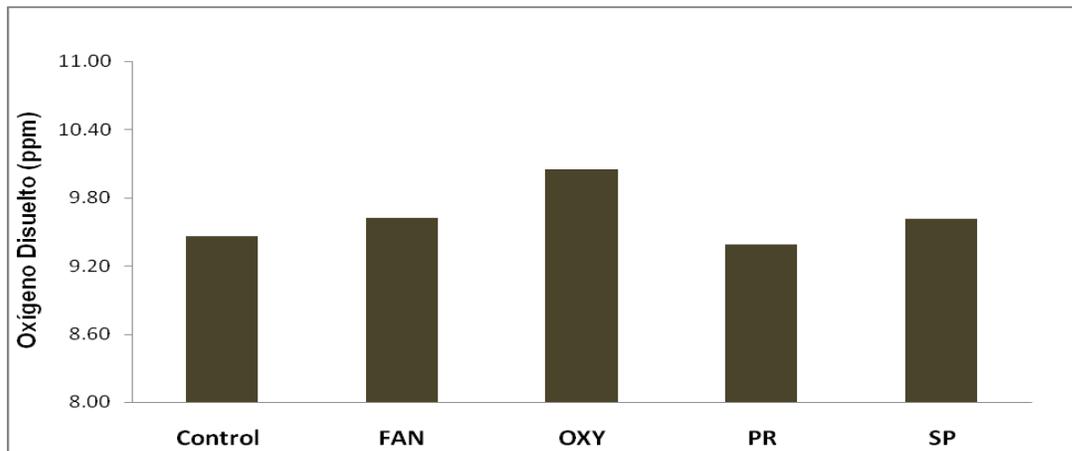
embargo el consumo de amino nitrógeno libre por la levadura para los mostos con alto contenido de glucosa (valor promedio de 109ppm) no tuvo una diferencia significativa respecto de las fermentaciones control (105 ppm) (gráfica 14). Es de esperarse entonces que el crecimiento celular durante la fermentación de los mostos con alto contenido en glucosa fuera parecida a las fermentaciones control.

El consumo de glucosa por la levadura, es energéticamente más fácil debido a que este atraviesa fácilmente la membrana celular sin la necesidad de enzimas (permeasas), además, dentro de la célula no se necesitan enzimas (glucosidasas) para que comience la glicolisis. Por el contrario, cuando se consume maltosa y maltotriosa, es necesario el uso de enzimas para ingresar al interior celular y es necesario el uso de glucosidasas para ser convertida en glucosa y comenzar su consumo. Las enzimas para el consumo de disacáridos son suprimidas cuando hay una concentración alta de glucosa en el medio de fermentación ($>1\%w/v$) y sólo es hasta que se consume de 40-50% de la glucosa que termina la represión de la glucosa y pueden ser consumidos estos carbohidratos por la levadura (Hardwick, 1994). Es por esto que las fermentaciones de los mostos con alto contenido en glucosa tuvieron menor tiempo de fermentación (7 días) respecto de los las fermentaciones control (9 días). Como se ve en la gráfica 17 el % de alcohol (etanol) producido durante la fermentación no se ve afectado por ninguno de los tratamientos, por lo tanto los diferentes tratamientos afectaron la cinética de consumo de nutrientes pero no afectaron el rendimiento de producción de etanol.

Por lo tanto, las fermentaciones de mostos con altos contenidos de glucosa incrementan su velocidad fermentativa. Entonces la velocidad de crecimiento de la levadura disminuiría debido a su alta capacidad fermentativa. En este caso la alta cantidad de glucosa podría ser el factor limitante para el crecimiento celular en vez de la cantidad de amino ácidos libres presentes en el mosto. Esto puede evidenciarse en términos del consumo de FAN por la levadura en este tratamiento, ya que teniendo mayores niveles de FAN en el mosto tuvo el mismo consumo que el control, por lo que la levadura prefiere consumir el azúcar e incrementar su velocidad fermentativa, disminuyendo su velocidad de crecimiento.

4.3.4 Oxígeno disuelto en el mosto

El aumento en la aireación del mosto antes de entrar al fermentador afecta la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto dentro del fermentador. Trabajos preliminares mostraban que aumentar la aireación del mosto de $6\text{m}^3/\text{h}$ a $8\text{m}^3/\text{h}$ aumentaba la cantidad de oxígeno disuelto del mosto en el fermentador de 9.5 ppm a 11 ppm. Sin embargo, al momento de realizar las pruebas, solo una réplica del tratamiento presentó esta tendencia, mientras que los otros dos no registraron este aumento en su oxígeno disuelto (gráfica 18). Al parecer al momento de medir estos mostos, el equipo no funcionó correctamente mostrando algunos valores erróneos.



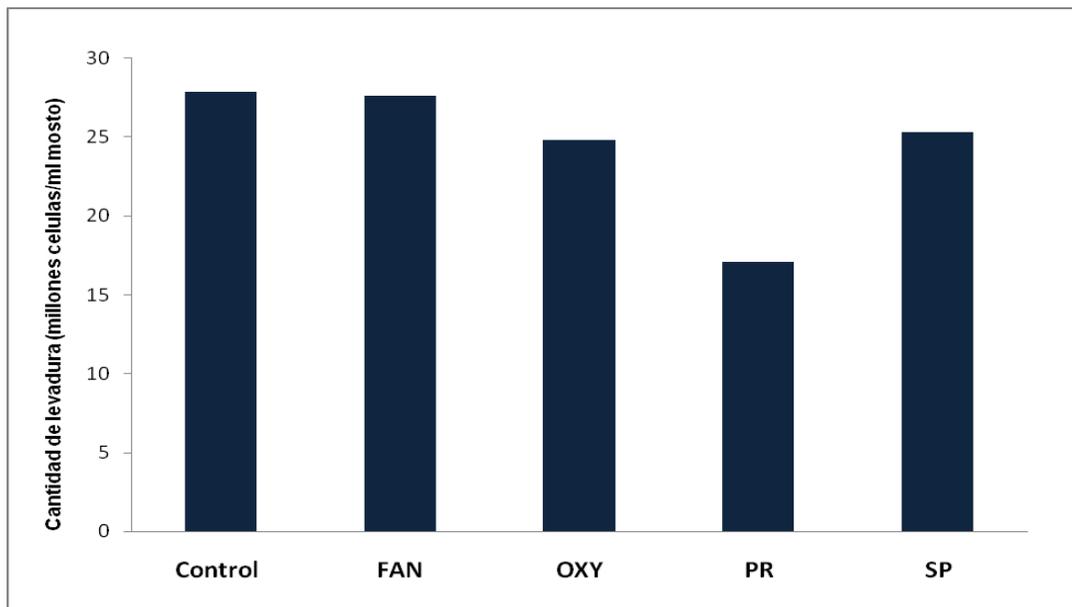
Gráfica 18. Oxígeno disuelto en el mosto para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

4.3.5 Cantidad de levadura adicionada

La levadura total usada para cada fermentación fue adicionada en el segundo lote de los 6 lotes que llenaban un fermentador. La cantidad de levadura al inicio de la fermentación fue al momento del llenado total del tanque. Consecuentemente la levadura tendrá aproximadamente 10-12 horas de proliferación y consumo de nutrientes mientras se adicionan todos los lotes al fermentador. Por lo tanto, se consideró la cantidad inicial de levadura en la fermentación como el conteo de células al final del llenado del tanque.

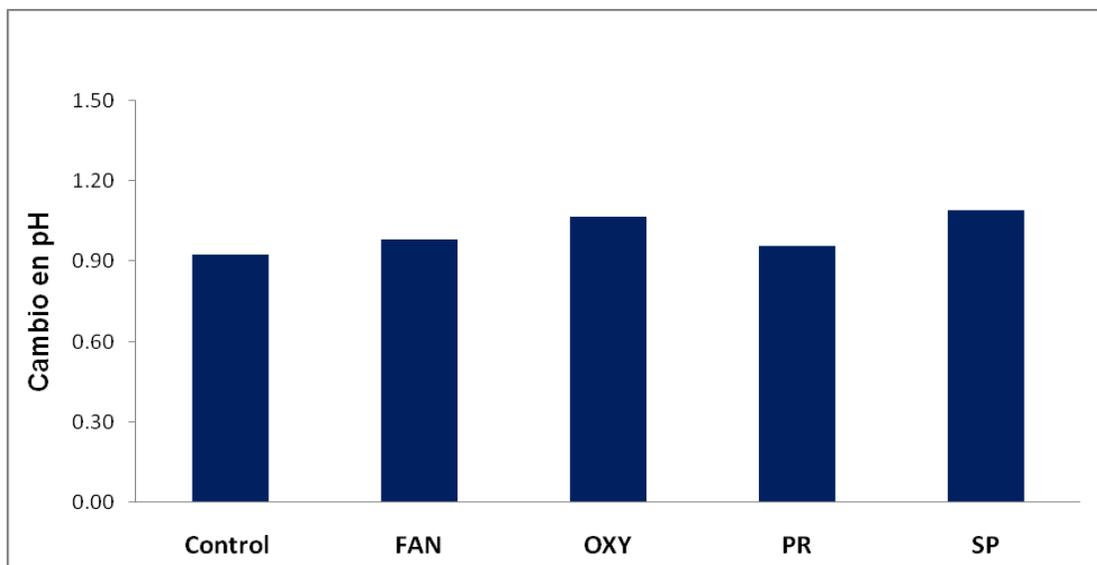
Reducir la cantidad inicial de levadura (13.5 millones de células/ml mosto) tuvo un efecto en la cantidad de levadura al final del llenado del fermentador respecto de las fermentaciones control (que usaron la cantidad de levadura de 22 millones de células/ml mosto) (gráfica 19). Ya que la levadura total producida durante la fermentación es función de la cantidad de levadura inicial adicionada y de los nutrientes del medio, se espera que este tratamiento tenga una cantidad menor de levadura neta al final de la fermentación.

La cantidad total de levadura final es función de la cantidad de levadura adicionada al inicio y de los nutrientes del medio. Al inocularse con menor cantidad de levadura, hay menor biomasa neta para consumir los nutrientes del medio, conllevando a un mayor tiempo de fermentación (10 días en promedio) respecto de las fermentaciones control (9 días). Además como se discutió con anterioridad, existió un menor consumo de aminoácidos en el medio fermentativo debido a este efecto respecto de las fermentaciones control.



Gráfica 19. Cantidad inicial de levadura en las fermentaciones para los diferentes mostos producidos según el tratamiento realizado. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

La disminución del pH durante la fermentación ocurre a medida que ácidos orgánicos son producidos y los compuestos amortiguadores (amino ácidos básicos y fosfatos primarios) son consumidos. El pH alcanzado al final de la fermentación depende de 3 factores: el pH del mosto, la capacidad amortiguadora del mosto y la cantidad de levadura producida durante la fermentación (Hardwick, 1994). El cambio en pH durante la fermentación ($pH_{\text{inicial}}-pH_{\text{final}}$) no tiene diferencia significativa para ninguno de los tratamientos respecto del control. Es decir aunque algunas fermentaciones tardaron más o menos tiempo respecto de las fermentaciones control, y aún en el tratamiento que se adicionó menor cantidad de levadura al inicio de la fermentación, el cambio en pH durante la fermentación es el mismo para todos los tratamientos, llegando al mismo porcentaje de atenuación. Por lo tanto, este parámetro no se ve afectado al finalizar el proceso de producción de cerveza (gráfica 20).



Gráfica 20. Disminución de pH durante la fermentación para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto.

4.4 Formación de compuestos volátiles para los diferentes tratamientos

En las gráficas 21 y 22 se observan las concentraciones de alcoholes superiores y de ésteres para los diferentes tratamientos estudiados, también en la tabla 13 se encuentran las concentraciones para los diferentes alcoholes superiores y esterés según los diferentes factores estudiados. Cuando se cambio el perfil de azúcares del mosto (mayor cantidad de glucosa que maltosa) se obtuvo una reducción significativa de alcoholes superiores en la cerveza respecto de los niveles encontrados en las cervezas control, mientras que los niveles de ésteres en la cerveza no presentan diferencia significativa respecto de las concentraciones de las cervezas control. Como se mencionó anteriormente, el consumo de glucosa por la levadura es más rápido que el de maltosa, incrementando así la velocidad fermentativa. Se ha encontrado que cuando se aumenta la velocidad fermentativa se previene el crecimiento celular y la multiplicación. Por consiguiente, existirá una menor producción de metabolitos secundarios durante la proliferación de la levadura como los alcoholes superiores, sin embargo se ha evidenciado que no hay un cambio considerable en la concentración de ésteres cuando la capacidad fermentativa aumenta (Guido et al., 2003).

También se ha encontrado que mostos con alto contenido en glucosa tienen una alta actividad de la enzima alcohol acetil transferasa necesaria para la formación de ésteres (Yoshioka y Hashimoto, 1984). Esto nos podría indicar que en este caso la concentración de ésteres va a estar limitada por la formación de alcoholes superiores y no por la actividad de la alcohol acetil transferasa.

Por lo tanto, los resultados indicarían que la fermentación de glucosa hace que los primeros días de fermentación (etapa donde se producen la mayor cantidad de alcoholes superiores) la velocidad fermentativa sea alta, disminuyendo la producción de alcoholes superiores debido a la disminución en la velocidad de proliferación. Por el contrario, la alta capacidad fermentativa podría ayudar a acumular grandes cantidades de acetil coenzima A en la célula y estaría disponible para la formación de ésteres.

Conforme se consume la glucosa del medio fermentativo, la intensidad fermentativa disminuye, proliferación de la levadura aumenta, aumentado así la formación de alcoholes superiores, hasta cuando se termine la multiplicación celular. Por esto, se esperaría que el crecimiento de levadura sea igual o menor que las fermentaciones control debido al lento crecimiento celular inicial. Como el consumo de amino nitrógeno libre por la levadura, se usa como índice de crecimiento celular (Inoue y Kashihara, 1995), esto es concordante con lo que se mencionó con anterioridad de que el consumo de amino nitrógeno libre por la levadura en el medio fermentativo alto en glucosa no fue significativamente diferente al consumo de las fermentaciones control; indicándonos que el crecimiento celular fue parecido a las fermentaciones control.

Debido a la alta actividad de la enzima alcohol acetil transferasa y a la posible acumulación de acetil CoA en el interior de la célula, el factor limitante para la producción de ésteres en este caso serán los alcoholes superiores. Por lo tanto, su producción será conforme se van produciendo sus precursores y por esto las concentraciones de ésteres fueron muy cercanas a las de las fermentaciones control.

Cuando se adicionó menor cantidad de levadura inicial en la fermentación se observó una reducción en la concentración de los alcoholes superiores respecto de las concentraciones encontradas en las cervezas control. Mientras se obtuvo una ligera disminución (no significativa) en la concentración de ésteres respecto del control. El isoamil acetato fue el éster evaluado que tuvo la mayor reducción pero, igual, no se tuvo una diferencia significativa respecto de las cervezas control.

Cuando se inocula con una cantidad baja de levadura la cantidad de oxígeno utilizado por la levadura para hacer esteroides para nuevas células es bajo y el crecimiento neto será bajo (Hardwick, 1994). Además la población de levadura será menor para el consumo de nutrientes (azúcares y amino nitrógeno libre) teniendo fermentaciones más lentas (10 días) como se evidenció en este caso respecto de las fermentaciones control (9 días). Además, se cree que, bajo condiciones de reducción de crecimiento celular, la actividad de la alcohol

acetil transferasa probablemente será el factor determinante para la formación de ésteres, mientras que condiciones excesivas el nivel de Acetil CoA pueden ser limitado ya que la gran parte de éste va a ser utilizado en el crecimiento. En un punto entre estos dos extremos de crecimiento estaría el máximo para la síntesis de ésteres (Smart, 2003). Se ha encontrado que altas cantidades de levadura inoculada hace que haya un crecimiento celular bajo debido al alto consumo del extracto (aumenta capacidad fermentativa) y el alto número de células en suspensión (Kaneda et al., 1992).

El consumo de aminoácidos libres por la levadura durante las fermentaciones con menor cantidad de levadura inicial fue menor que las fermentaciones control, lo que podría indicarnos un menor crecimiento celular, por lo tanto una menor cantidad de levadura presente en la fermentación. Esto explicaría la disminución en la concentración de alcoholes superiores en las cervezas respecto del control.

Por otro lado, la formación de ésteres no se ve afectada en gran medida como las de los alcoholes superiores. Parece ser que la concentración de ésteres no se ve afectada por las condiciones de crecimiento celular en las que se realizaron estas fermentaciones. Por lo tanto, se puede concluir que el menor crecimiento celular afectó la formación de alcoholes superiores, pero la velocidad de crecimiento de levadura fue adecuada para permitir disponibilidad del acetil CoA y que la alcohol acetil transferasa estuviera activa para la formación de ésteres. Por lo que se puede decir que el factor limitante para la formación de ésteres, en este caso, puede ser la disponibilidad de sus alcoholes superiores precursores; mostrando solo una ligera reducción (no significativa) de ésteres cuando se adicionó menor cantidad de levadura inicial.

Para el tratamiento en el cual se incrementó el nivel de oxígeno inicial en el mosto, no hubo diferencias significativas en la concentración de ésteres y alcoholes superiores respecto del control (ver gráficas 21 y 22). Sin embargo se puede ver un ligero aumento en la producción de alcoholes superiores (no significativa) respecto del control.

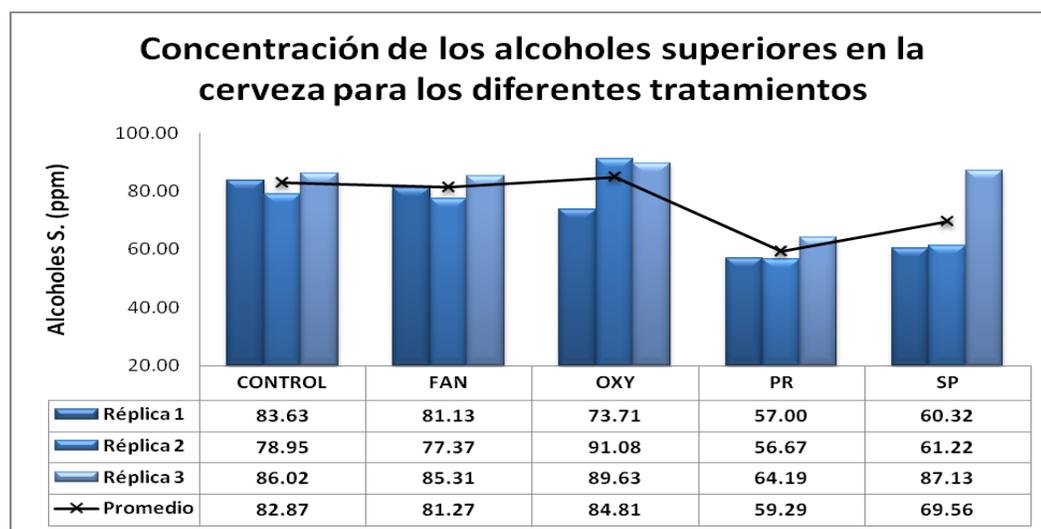
La formación de ésteres durante la fermentación disminuye cuando existe una aireación excesiva del mosto, ya que decrece la actividad de la alcohol acetil transferasa debido a la acumulación de ácidos grasos insaturados en la membrana celular por el incremento en la proliferación celular; conllevando a un posible aumento en la producción de alcoholes superiores (Yoshioka y Hashimoto, 1983a; Saerens et al., 2007). Por otro lado el crecimiento celular disminuye cuando se disminuye considerablemente la oxigenación del mosto (Kaneda et al., 1992). Por lo tanto, la producción de ésteres es máxima a cierto nivel de oxígeno y su síntesis cae cuando el contenido de oxígeno inicial en el mosto es mayor o menor que este nivel óptimo de oxigenación (Verstrepen et al., 2003).

Por lo tanto, para nuestros resultados, aumentar la aireación inicial del mosto incrementó ligeramente la proliferación celular pero no fue lo suficientemente para movernos entre estos dos valores máximos y por lo cual no se mostró evidencia significativa en la producción de alcoholes superiores ni de ésteres respecto a las fermentaciones control.

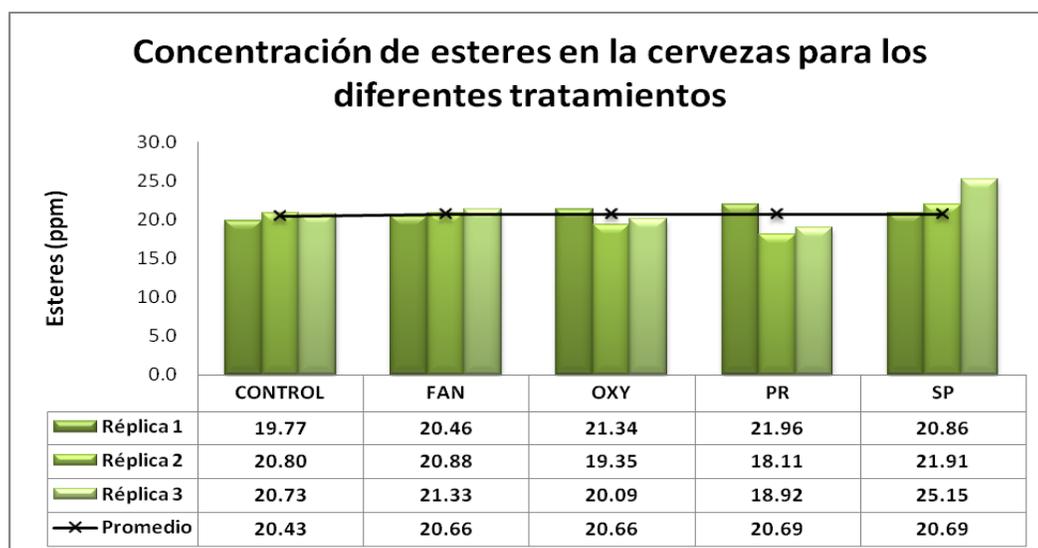
Finalmente, cuando se aumentó el contenido de amino nitrógeno libre en el mosto sin cambiar el perfil de azúcares, no hubo diferencia significativa en la producción de alcoholes superiores ni de ésteres respecto de los niveles encontrados en las fermentaciones control. Se ha visto que la velocidad de consumo de amino nitrógeno libre para crecimiento celular es constante e independiente de las condiciones de fermentación y, por lo tanto, existe una relación lineal entre crecimiento celular y síntesis de alcoholes superiores (Inoue y Kashihara, 1995). Se creería, entonces, que aumentar el consumo de “FAN” aumentaría la formación de alcoholes superiores. Para nuestro caso la levadura consumió mayor cantidad de amino ácidos libres del medio. Se esperaba que su crecimiento fuera mayor y aumentaría la producción de alcoholes superiores. Sin embargo, no se encontró un aumento significativo en los niveles de éstos en las cervezas del tratamiento respecto de las del control. Las concentraciones de ésteres y alcoholes superiores aumentan cuando se aumentan los niveles de “FAN” más de 50 ppm (Saerens et al., 2007). Parece ser que la cantidad mayor de “FAN” consumido no alcanzó a ser significativo para que la producción de alcoholes superiores ni de ésteres aumentara considerablemente respecto del control.

Tabla 13. Concentraciones promedio de alcoholes superiores y ésteres para los diferentes tratamientos Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto, SD= desviación estándar para cada tratamiento y Prom= concentración promedio para cada tratamiento.

Compuesto	Control		FAN		PR		OXY		SP	
Alcoholes S.	Prom (ppm)	SD								
1-propanol	6.65	0.50	6.47	0.82	5.67	0.52	7.40	0.38	5.79	0.92
2 metil, 1-propanol	8.13	0.32	7.70	0.17	5.48	0.74	7.48	0.70	6.78	1.51
2 metil, 1-butanol	13.77	1.30	13.24	0.37	10.03	1.22	13.78	1.66	11.85	2.85
3 metil, 1-butanol	38.64	1.92	36.09	2.86	25.89	2.15	38.54	7.29	31.90	5.95
2 fenil, etil alcohol	15.68	0.59	17.76	1.68	12.22	0.34	17.60	0.45	13.24	4.07
Ésteres	Prom (ppm)	SD								
Etil acetato	18.45	0.61	18.80	0.41	18.00	2.00	18.20	1.09	20.24	1.64
Isoamil Acetato	1.63	0.06	1.70	0.12	1.33	0.10	1.66	0.10	1.99	0.44
2 fenil, etil acetato	0.35	0.03	0.39	0.01	0.33	0.03	0.40	0.03	0.41	0.17



Gráfica 21. Concentración de alcoholes superiores en las cervezas para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto



Gráfica 22. Concentración de ésteres en las cervezas para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

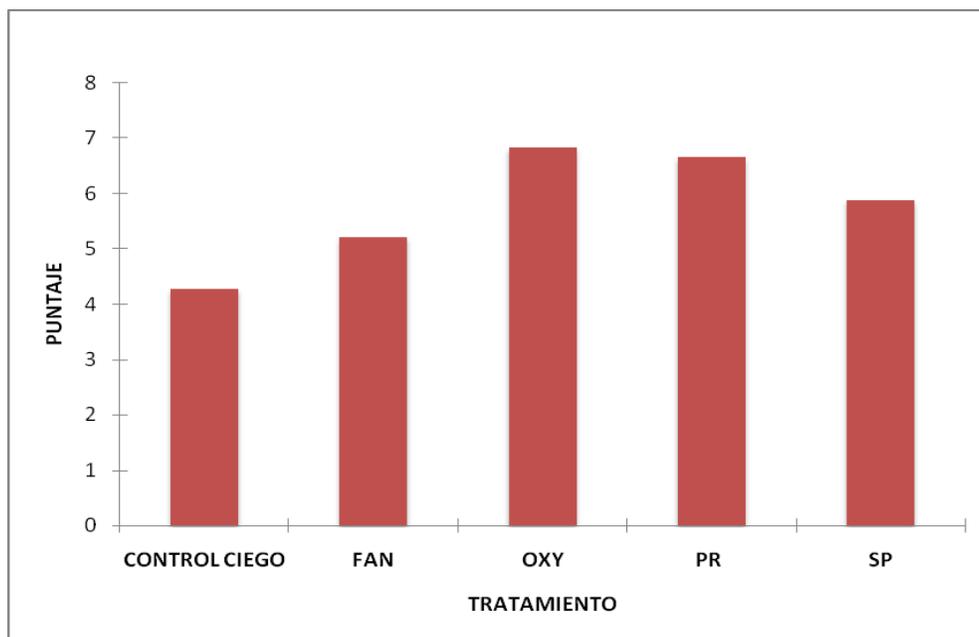
4.5 Evaluación Sensorial

El análisis sensorial se diseñó con el fin de determinar si existían diferencias generales entre las cervezas del tratamiento con la cerveza control. Como se observa en la gráfica 23, los panelistas percibieron diferencias entre los tratamientos respecto de la cerveza control. Sin embargo estas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas ($\alpha=0.1$). Aunque los panelistas eran solamente tres, estos eran expertos catadores de cerveza. Siendo así, se esperaba que hubiese consistencia entre las repeticiones de las pruebas. No obstante esto no ocurrió. Las respuestas de los panelistas presentaron variabilidad tal que hizo que el análisis estadístico no encontrara diferencia significativa entre los tratamientos.

El análisis químico realizado alcanzó a determinar diferencias estadísticamente significativas entre las cervezas cuando se adicionó menos levadura inicial y cuando se cambió el perfil de azúcares de los mostos. Sin embargo el análisis sensorial diferencial aunque percibió algunas diferencias, estas no fueron estadísticamente significativas.

Sería difícil y posiblemente no preciso afirmar que el consumidor no alcance a determinar la diferencia entre las cervezas de los tratamientos debido a que el panel de expertos no alcanzó a ver las diferencias. El panel de expertos está entrenado para detectar diferencias sutiles que afecten la calidad del producto final. Cabe recalcar que las concentraciones de algunos de los compuestos de interés en la cerveza están cerca del umbral de detección, por tanto, es posible que, aunque los instrumentos detectan diferencia significativa al hacer una evaluación integrada, las diferencias no sean fácilmente percibidas.

Sería recomendable que se adiestrara un grupo de personas con el fin de determinar los cambios producidos por estos compuestos volátiles presentes en la cerveza y así disminuir la variabilidad del panel y poder encontrar diferencias entre tratamientos más sutiles.

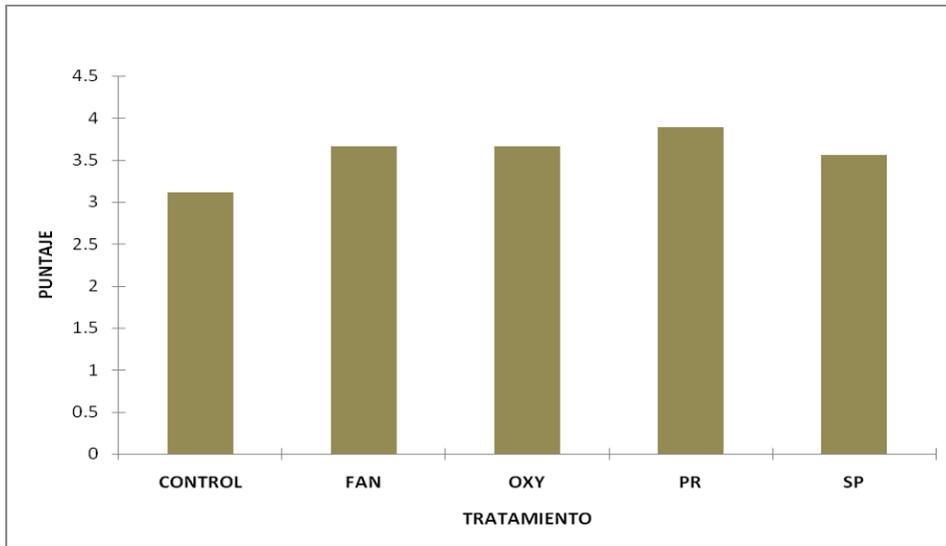


Gráfica 23. Evaluación sensorial diferencial para las cervezas producidas para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

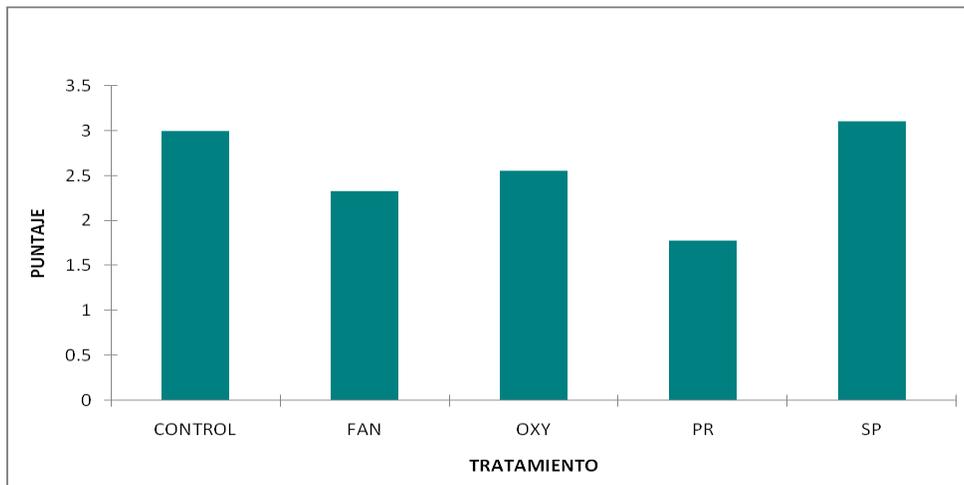
Por otro lado cuando se realizó el análisis descriptivo para los atributos que imparten los alcoholes superiores y ésteres al aroma y sabor de la cerveza, se encontró que el panel de expertos solo encontró diferencia significativa entre la cerveza control y la cerveza realizada cuando se adicionó menos cantidad de levadura inicial (ver tabla 16).

Para este análisis la cerveza control tuvo un valor promedio de 3.1 (máximo = 4) cuando se preguntó si la cerveza presentaba un olor y sabor a “alcohol o solvente”. Este valor en la escala de atributos desarrollada se clasificaba como “ligero”. La cerveza bajo el tratamiento de menor cantidad de levadura obtuvo un valor promedio de 3.9; que en nuestra escala de atributos se clasifica como “ausente” (gráfica 24). Por otro lado cuando se evaluó si la cerveza presentaba olor y sabor a “fruta”, la cerveza control tuvo un valor promedio de 3.0, que para la escala de atributos se clasifica como “fuerte”, mientras que la cerveza sometida al tratamiento de menor cantidad de levadura inicial presentó un valor promedio de 1.7 que según nuestra escala de atributos se clasifica como “ligero” (ver gráfica 25). Es importante anotar que cuando se realizó el análisis descriptivo de las cervezas uno de los panelistas parecía “descalibrado” al presentar una desviación notoria del valor promedio del panel. Es decir el panelista presentó confusión al evaluar algunos de los atributos del análisis sensorial, aumentando la variabilidad de los resultados, lo cual afecta la diferenciación entre los tratamientos.

Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados para este tratamiento en los análisis químicos. También es importante aclarar que al igual que el análisis sensorial anterior la variabilidad por los pocos panelistas expertos hace que no se puedan ver algunas diferencias en otros tratamientos.



Gráfica 24. Evaluación sensorial descriptivo para los atributos sensoriales dados por los alcoholes superiores para las cervezas producidas para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto



Gráfica 25. Evaluación sensorial descriptivo para los atributos sensoriales dados por los ésteres para las cervezas producidas para los diferentes tratamientos realizados. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto

Tabla 14. Puntaje promedio para el análisis sensorial descriptivo. Control=control, FAN=cambio en contenido de nitrógeno libre en el mosto, OXY=cambio en la oxigenación del mosto al entrar al fermentador, PR= cambio en la cantidad de levadura adicionada al fermentador, SP= cambio en el perfil de azúcares en el mosto, SD= desviación estándar para cada tratamiento y Prom= concentración promedio para cada tratamiento. Los tratamientos con * presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto del control.

Atributo	Control		FAN		PR		OXY		SP	
	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD	Prom	SD
Alcohólico (Etanol y Alcoholes Superiores)	3.1	0.9	3.7	0.5	3.9*	0.3	3.7	0.5	3.6	0.7
Detergente, Solventes, Laca o barniz	3.8	0.4	3.8	0.7	3.9	0.3	3.6	1.0	3.8	0.7
Frutas (Cualquier fruta o combinación de estas)	3.0	1.2	2.3	1.3	1.8*	0.7	2.6	1.4	3.1	1.1

5 CONCLUSIONES

1. La técnica desarrollada y validada para la cuantificación de compuestos volátiles por micro-extracción en fase sólida (SPME) y un cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) y a un ionizador de llama (GC/FID), es una técnica poderosa para la cuantificación y separación de compuestos volátiles en cerveza (alcoholes superiores, ésteres y aldehídos) ya que se lograron cuantificar y separar gran variedad de compuestos a concentraciones de trazas.
2. Se encontró que para un tiempo de exposición de 45 minutos con la fibra PDMS en el espacio gaseoso de la muestra, se alcanzó el equilibrio de las fases. Un tiempo de desorción de 15 minutos en el inyector del cromatógrafo, fue suficiente para que la fibra desorbiera la totalidad de los compuestos absorbidos.
3. Se observó que los compuestos menos polares fueron más fácilmente absorbidos por la fibra (ejemplo, isoamil acetato) que los compuestos más polares (ejemplo, acetaldehído) a las condiciones de extracción debido a la naturaleza de la fibra. Pero esto no fue un factor limitante para poder cuantificar todos los compuestos de interés, ya que los compuestos polares también pudieron ser extraídos gracias a la optimización de las condiciones de extracción por la técnica de SPME.
4. La adición de glucoamilasa en las operaciones de maceración y ebullición a nivel laboratorio tuvieron un efecto en el perfil de azúcares del mosto. La adición de concentraciones de glucoamilasa de $0.36 \text{g}_{\text{enzima}}/\text{l}_{\text{mosto}}$ durante la operación de maceración no tuvo el cambio deseado en el perfil de azúcares del mosto; aún permitiendo un tiempo de acción de 120 minutos a 65°C . Por el contrario, cuando se adicionó la enzima al inicio de la ebullición se obtuvo el cambio deseado en el perfil de azúcares; obteniéndose una concentración de glucosa de $6\%(\text{w/v})$ y una concentración de maltosa de $3\%(\text{w/v})$ en el mosto, cuando se dejó 90 min a 65°C y una cantidad de enzima de $0.33 \text{g}_{\text{enzima}}/\text{l}_{\text{mosto}}$. Este

efecto se observó más fuerte a medida que se adicionó más cantidad de enzima durante esta operación.

5. La enzima no tiene efecto sobre la concentración de sacarosa y fructosa en el mosto. El buen desempeño de la glucoamilasa durante la ebullición se debe a que los sustratos están más accesibles luego de la maceración. La clarificación previa del mosto también ayudó a que las limitaciones de transferencia de masa entre sustrato y enzima se minimicen. Este mismo efecto se observó cuando se adicionó glucoamilasa al inicio de la ebullición a nivel industrial. Este aumento en la cantidad de glucosa se debe al rompimiento de los disacáridos y polisacáridos de glucosa, como son la maltosa, maltotriosa y dextrinas. Esto se confirmó con la reducción en las concentraciones de los azúcares fermentables como maltosa y maltotriosa. Se confirma que las simulaciones del proceso de maceración y ebullición en el laboratorio pueden ser correlacionadas a la escala industrial.

6. La formación de alcoholes superiores por la levadura ocurre desde el comienzo de la fermentación. Estos se forman según se van consumiendo los nutrientes del medio para el crecimiento celular, hasta que terminan la proliferación de la levadura debido a la escasez de nutrientes.

7. La formación de ésteres por la levadura durante el primer día de fermentación fue baja. Esto se debe a la baja disponibilidad del acetil CoA (que es usado por completo para el crecimiento de la levadura), la baja actividad de la enzima AA transferasa y la poca cantidad de alcoholes superiores. Luego del primer día, la velocidad de producción de ésteres por la levadura aumentó hasta casi el final de la fermentación. A diferencia de los alcoholes superiores, luego de terminar la reproducción celular, la velocidad de producción de ésteres disminuye, pero su formación continúa hasta casi la finalización de la fermentación. Debido al comportamiento en la producción de compuestos volátiles por la levadura sería necesario inyectar una gran cantidad de nitrógeno gaseoso para remover el CO₂ disuelto en el medio de fermentación. Esta técnica para promover la formación de compuestos volátiles a nivel industrial es no factible económicamente.

8. El descanso proteico durante la maceración (50°C por 10 min) para aumentar el contenido de amino nitrógeno libre tuvo una diferencia significativa en comparación con los mostos control. Los mostos producidos sin el descanso (control) tuvieron un valor promedio de 170ppm mientras que los mostos producidos bajo este tratamiento obtuvieron una media de 186ppm. Este mismo efecto se presentó cuando se dejó el descanso al inicio de la ebullición para la acción de la glucoamilasa. Es decir, aumentar la cantidad de FAN en un mosto va a tener la misma magnitud si se permite un descanso proteico de 10 min a 50°C en la maceración o un descanso de 90 min a 68°C al inicio de la ebullición. Este efecto se debe a que las exopetidases pueden resistir temperaturas altas y pueden liberar los aminoácidos de las cadenas de polipéptidos a estas temperaturas.

9. Las fermentaciones realizadas con mostos sometidos al tratamiento para aumentar el “FAN”, tuvieron un consumo significativamente mayor de amino ácidos libres en comparación a las fermentaciones control; por lo cual se esperaría una mayor proliferación celular para estas fermentaciones. Por otro lado, el tratamiento en el cual se adicionó menor cantidad de levadura inicial, tuvo un consumo significativamente menor de “FAN” durante las fermentaciones respecto a las fermentaciones control. Esto puede deberse a la menor cantidad de levadura disponible para consumir los aminoácidos del medio, por lo que la velocidad de proliferación de la levadura fuera menor.

10. El aumento en la aireación del mosto antes de entrar al fermentador afecta la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto dentro del fermentador. Trabajos preliminares mostraron que aumentar la aireación del mosto de 6m³/h a 8 m³/h aumentaba la cantidad de oxígeno disuelto del mosto en el fermentador de 9.5 ppm a 11 ppm. Al parecer al momento de medir el oxígeno disuelto en los mosto de este tratamiento, el equipo no funcionó correctamente mostrando algunos valores erróneos. Esto se cree, porque el comportamiento observado en la producción de compuestos volátiles fue, según esperado, diferente respecto de las fermentaciones control.

11. La menor adición inicial de levadura tuvo un efecto en la cantidad de levadura al final del llenado del fermentador respecto de las fermentaciones control.

12. Las fermentaciones de mostos con altos contenidos de glucosa incrementaron su velocidad fermentativa, por lo que se cree que la velocidad de crecimiento de la levadura disminuyó debido a su alta capacidad fermentativa. Es por esto que las fermentaciones de los mostos con alto contenido en glucosa tuvieron menor tiempo de fermentación respecto de las fermentaciones control.

13. El efecto del tratamiento del cambio en el perfil de azúcares en la producción de compuestos volátiles fue una reducción significativa de alcoholes superiores, mientras que los niveles de ésteres en la cerveza no presentaron diferencia significativa respecto de los niveles encontrados en las cervezas control. Se cree que el consumo de la glucosa por la levadura es más rápido que el de maltosa, incrementando así la velocidad fermentativa y disminuyendo la producción de alcoholes superiores debido a la disminución en la velocidad de proliferación. Debido a la alta actividad de la enzima alcohol acetil transferasa y a la posible acumulación de acetil CoA en el interior de la célula, el factor limitante para la producción de ésteres en este caso fue la cantidad de alcoholes superiores.

14. Cuando se adicionó menor cantidad de levadura al inicio de la fermentación se observó una reducción en la concentración de los alcoholes superiores respecto de las concentraciones encontradas en las cervezas control. Mientras, se obtuvo una ligera disminución (no significativa) en la concentración de ésteres. Se evidenció además un consumo menor de aminoácidos libres por la levadura, lo que podría indicarnos un menor crecimiento celular y conllevó a una menor producción de alcoholes superiores. Parece ser que la concentración de ésteres no se ve afectada por las condiciones de crecimiento celular en las que se realizaron estas fermentaciones. Por lo que se podría decir que el factor limitante para la formación de ésteres en este caso pudo haber sido la disponibilidad de sus alcoholes superiores precursores, mostrando solo una ligera reducción (no significativa) de ésteres cuando se adicionó menor cantidad de levadura inicial.

15. Para el tratamiento en el cual se incrementó el nivel de oxígeno inicial en el mosto, no presentaron diferencias significativas en la concentración de ésteres y alcoholes superiores respecto del control. Los resultados mostraron que aumentar la aireación inicial del mosto incrementó ligeramente la proliferación celular pero no fue lo suficiente para incrementar considerablemente la producción de ésteres y alcoholes superiores.

16. Aumentar el contenido de amino nitrógeno libre en el mosto al nivel experimentado, no tuvo diferencia significativa en la producción de alcoholes superiores, ni de ésteres, respecto de los niveles encontrados en las fermentaciones control. Se esperaba que aumentar el consumo de “FAN” incrementaría la formación de alcoholes superiores. Parece ser que la cantidad mayor de “FAN” consumido no alcanzó a ser significativo para que la producción de alcoholes superiores, ni de ésteres, aumentara considerablemente respecto del control.

17. El panel de expertos encontró diferencia significativa entre, la cerveza control y la cerveza realizada cuando se adicionó menor cantidad de levadura inicial, sólo para el análisis sensorial descriptivo de los atributos que imparten los alcoholes superiores y ésteres al aroma y sabor de la cerveza. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados para este tratamiento en los análisis químicos. Aunque los pocos panelistas eran expertos, la variabilidad de sus respuestas causó que no se pudieran ver algunas otras diferencias en los otros tratamientos.

18. Para las condiciones de fermentación utilizadas y los factores evaluados, sólo cuando se cambió el perfil de azúcares del mosto o se redujo la cantidad de levadura inicial, se obtuvo un efecto estadísticamente significativo en la formación de compuestos volátiles por la levadura en la fermentación. No es recomendable disminuir la cantidad de levadura inicial para las condiciones de fermentación utilizadas porque conllevaría a una reducción en la producción de alcoholes superiores y una ligera disminución de ésteres, además de incrementar el tiempo de fermentación. Por el contrario, cambiar el perfil de azúcares puede ser una herramienta muy útil, ya que reduce la cantidad de alcoholes superiores sin disminuir la de ésteres y presentado tiempos de fermentación menores.

6 FUTUROS TRABAJOS Y/O RECOMENDACIONES

1. La técnica de extracción por SPME/GC-MS/FID puede ser utilizada para identificar y cuantificar otra gran variedad de compuestos que aportan al aroma final de la cerveza. Para estudios posteriores se recomienda que se estudie otro tipo de fibras con diferentes polaridades como la DVB/CAR/PDMS para caracterizar un mayor rango de compuestos volátiles presentes en la cerveza.
2. Como futuras investigaciones sería de importante optimizar la cantidad de enzima glucoamilasa adicionada antes de la fermentación para obtener el cambio en el perfil de azúcares deseado, y minimizar su uso durante la fermentación.
3. Se recomienda encontrar la manera de controlar la velocidad fermentativa cuando se tienen mostos con alto contenido de glucosa con otros parámetros de fermentación, con el fin incrementar la formación de alcoholes superiores y así incrementar la formación de ésteres.
4. Para futuros trabajos, sería importante evidenciar la sinergia de estos factores sobre la formación de compuestos volátiles por la levadura durante la fermentación.
5. Se recomienda que para un análisis sensorial más concluyente se aumente la cantidad de panelistas expertos de forma tal que se pueda tener mayor confianza (estadística) en los resultados recopilados.

7 REFERENCIAS

American Society of Brewing Chemists (ASBC) 1992. Free amino Nitrogen. Wort -12, Yeast-12, Malt-5, Beer-10 y Malt-9

Calderbank, J. y Hammond. 1994. Influence of Higher Alcohol Availability on Ester Formation by Yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52(2):84-90.

Constant M and Collier J. 1997. Headspace Gas Chromatography Profiles of fruit-flavored malt beverages using solid-phase microextraction. *Journal American Society of Brewing Chemists.* 55 (3).112-118.

Ebeler, S.E., Terrien, M.B. and Butzke C.E. 2000. Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80. 625-630.

Erten, H., Tangles, H., Cakiroz, H. 2007. The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. *J. Inst. Brewing.* 113(1):75-79

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S. y Tamai, Y. 1997. Effect of Aeration and Unsaturated Fatty Acids on Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Acetyltransferase Gene. *Applied and Environmental Microbiology.* 63 (3): 910-915.

García, A. I., García, L.A. y Díaz, M. 1994. Prediction of ester production in industrial beer fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 16:66-71.

Guido L.F, Rodrigues P.G, Rodrigues J.A, Goncalves C.R y Barros A.A. 2003. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on the flavour stability: an industrial approach. *Journal of Food Chemistry.* 87: 187-193.

Hardwick, W.A. 1994. *Handbook of Brewing.* Publicado por Marcel Dekker.213-214.

Hites, R.A. 2000. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Chapter 31. Gas Chromatography, Mass Spectrometry. Indiana University School of Public and Environmental Affairs and Department of Chemistry. 609-625

Hodgson J.A., King A.T. and Moir M. 1995. Effects of pressure and nitrogen sparging on flavor development during fermentation. Malting and brewing process.48: 411-418.

Inoue, T. y Kashihara, T. 1995. The importance of Indices Related to Nitrogen Metabolism in Fermentation Control. The Master Brewers Association of the Americas (MBAA) Technical Quartely. 32: 109-113.

Jelen, H. H., Wlazly, K., Wasowicz, E. y Kaminski E. 1998. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method. J. Agric. Food Chem. 46, 1469-1473.

Kaneda, H., Kano, Y., Sekine, T., Ishii, S., Takahashi, K. y Koshino, S. 1992. Effect of Pitching Yeast and Wort Preparation on Flavor Stability of Beer. Journal of Fermentation and Bioengineering. 73 (6): 456-460.

Kumara S., Fukui N., Kojima K. y Nakatani K. 1995. Regulation Mechanism of ester Formation by Dissolved Carbon Dioxide During Beer Fermentation. The Master Brewers Association of the Americas (MBAA) Technical Quartely. 32 (3): 159-162.

Lanças, F. 2003. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. Journal of the Brazilian Chemical Society. Vol 14. No. 2. 183-197.

Lea, A.G.H y Piggott J.R. 2003. Fermented Beverage Production. Segunda edición, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 41-54.

Lochow, E., Peschmann, P and Hellwig, C 2005. Determination of Beer Fermentation by-products Via Gas Chromatography. *Brauwelt International*, Vol. 23, No. 4. 270-271.

Master Brewers Association of the Americas M.B.B.A. 2002. *El cervecero en práctica*. Tercera edición. Master Brewers Association of the Americas. 267-292.

Meilgaard, M 2000. Efectos en el flavor de las innovaciones en los equipos cerveceros y en el proceso. *Cerveza y malta XXXVII* (4) 148: 41-54.

Montgomery, D.C. 1976. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons. 239-262.
Murakami, A.A, Goldstein H., Navarro A., Seabrooks J.R. and Ryder D.S. (2003). Investigation of Beer Flavor by Gas Chromatography-Olfactometry. *Journal American Society of Brewing Chemists*. Vol 1, No.1.23-32.

Ng, L.K. 2001. Analysis by gas chromatography/mass spectrometry of fatty acids and esters in alcoholic beverages and tobaccos. *Analytica Chimica Acta*. 465. 309-318.

O'Rourke, T (2002). The function of enzymes in brewing. *The BREWER International*. 2 (9):14-18.

Pawliszyn, J. 1997. *Solid Phase Microextraction. Theory and practice*. Wiley-VCH, Inc.11-140.

Pinho, O., Ferreira I. y Santos Lúcia. 2006. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A*. 1121:145-153.

Powell. C.D, Quain D.E. y Smart K.A. 2003. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *Federation of European Microbiological Societies*. 149-157.

Rodrigues, F., Caldeira, M., Camara J.S. 2008. Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC–qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*. 609. 82–104.

Sablayrolles J.M. y Ball C.B. 1995. Fermentation Kinetics and the Production of Volatile During Alcoholic Fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53(2):72-78.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F., Verstrepen K.J., Van Dijck, P., Thevelein J.M. and Delvaux, F.R. 2007. Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (2):454-461.

Saison, D., De Shutter D.P., Delvaux F.R. y Delvaux F.R. 2008. Optimization of a complete method for the analysis of volátiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1190:342-349.

Samp, E.J. and Silberman, L. 2006. Low Carbohydrate Beer Production: Issues with Sticky Yeast Beds. *Proceedings of the World Grains Summit of AACC International and the Master Brewers Association of the Americas*.

Shen H.Y., Schrijver S.D., Moonjai N., Verstrepen K.J., Delvaux F. y Delvaux F.R. 2004. Effects of CO₂ on the formation of flavor volatiles during fermentation with immobilized brewer's yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 636-643.

Smart, K 2003. *Brewing Yeast Fermentation performance*. Second edition. Blackwell publishing company. 213-233.

Šmogroviová, D. y Dömény, Z. 1999. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilized yeasts. *Process Biochemistry*. 34:785-794.

- Snow, N. H and Slack, G C. 2002. Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends in analytical chemistry*. 21 (9): 608-617.
- Trelea, I.C., Titica, M y Corrieu, G. 2004. Dynamic optimization of the aroma production in brewing fermentation. *Journal of process control*. 14:1-16.
- Verstrepen K. J., Derdelinckx G., Dufour J.P., Winderickx J., Thevelein J.M., Pretorius I.S. y Delvaux F.R. 2003. Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96 (2): 110-118.
- Willaert, R. y Nedovic, V.A. 2006. Primary beer fermentation by immobilized yeast-a review on flavor formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81:1353-1367.
- Yoshioka, K. y Hashimoto, N. 1983a. Cellular Fatty Acid and Ester Formation by Brewers' Yeast. *Agric. Biol. Chem.* 47 (10): 2287-2294.
- Yoshioka, K. y Hashimoto, N. 1983b. Acetyl-CoA of Brewers' Yeast and Formation of Acetate Ésters. *Agric. Biol. Chem.* 48 (1): 207-209.
- Yoshioka, K. y Hashimoto, N. 1984. Éster Formation by Brewer's Yeast during Sugar Fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 48 (2): 333-340.
- Zhu, J. Y. and Chai, X.-S 2005. Some Recent Developments in Headspace Gas Chromatography. *Current Analytical Chemistry*. Vol 1, No. 1, 79-83.

APÉNDICES

Apéndice 1: Hojas para análisis sensorial.

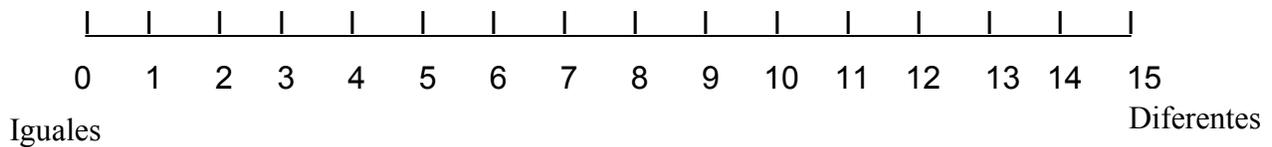
PRUEBAS DE DIFERENCIACION DE LA CERVEZA

Nombre Catador:

Fecha:

Instrucciones: Se le han entregado 6 muestras de cerveza. La primera es la referencia para la prueba. Comience evaluando la muestra de referencia. Luego de relacionarse con la muestra de referencia evalúe el resto de las muestras de izquierda a derecha. Enjuagar su boca con un sorbo de agua y un pedazo de galleta entre cada muestra.

Luego de cada evaluación marque en la línea provista una marca vertical y escriba encima de esta el número de la muestra para representar la diferencia general que entiende existe entre la muestra evaluada y la referencia.



Comentarios _____

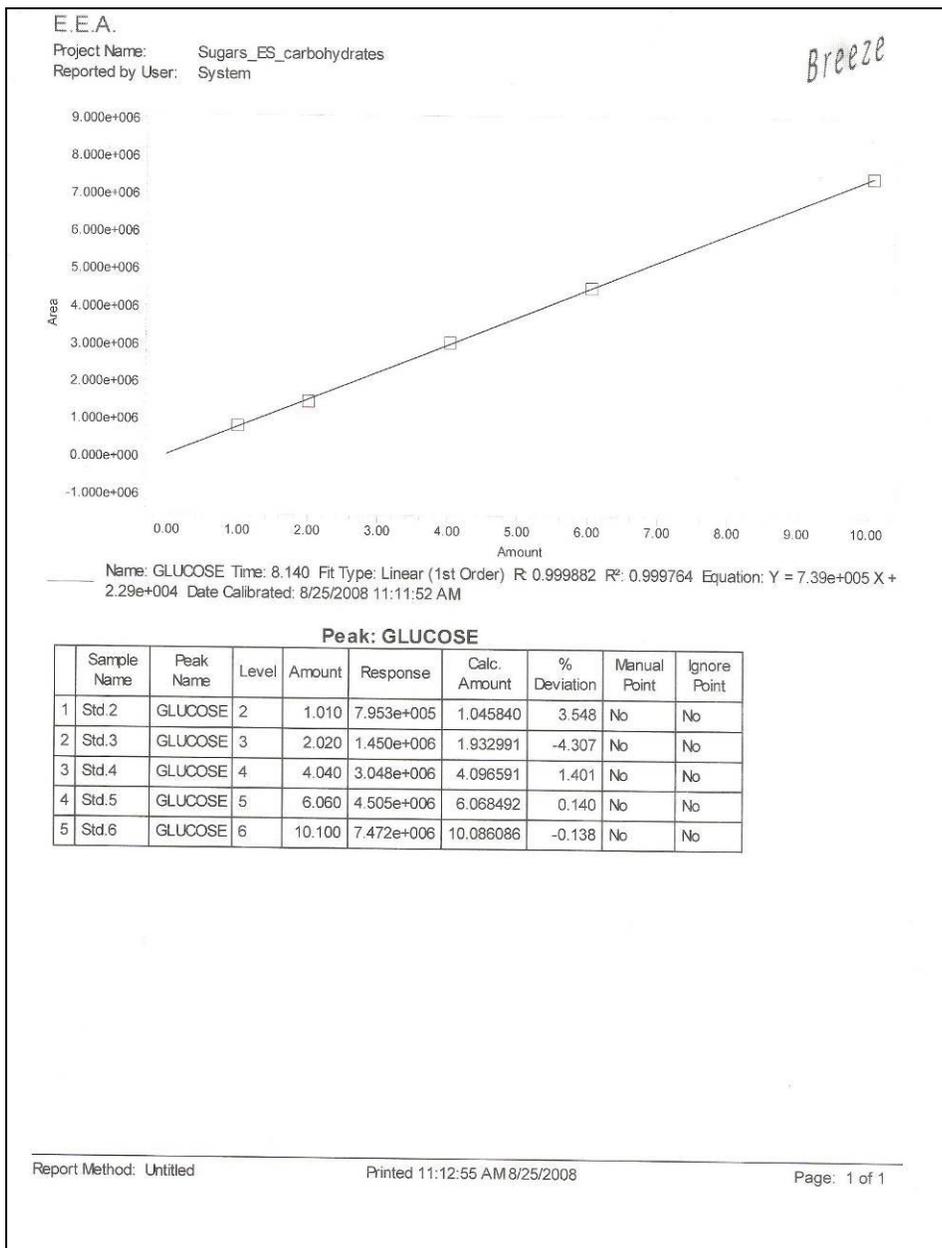
PRUEBAS DE DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE LA CERVEZA

Nombre : _____ Marca de Cerveza : _____ Tipo de Cerveza: _____

						PUNTOS	Promedio
Estabilidad de la Espuma	Ninguna	Ligera	Media	Estable			
	1	2	3	4			
Alcoholico (Etanol y Alcoholes Superiores)	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Detergente, Solventes, Laca o barniz	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Frutas (Cualquier fruta o combinacion de estas)	Debil	Ligero	Fuerte	Agradable			
	1	2	3	4			
Acetaldehido (Manzana verde, cascara de manzana)	Debil	Ligero	Fuerte	Agradable			
	1	2	3	4			
Flores (Rosas, perfumado)	Debil	Ligero	Fuerte	Agradable			
	1	2	3	4			
Lupulo (aroma a lupulo fresco, cocido, aceites de lupulo)	Debil	Ligero	Fuerte	Agradable			
	1	2	3	4			
Oxidado (Envejecido, a gato , papel, cuero)	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Acido (Acidos minerles, vinagre)	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Dulce (Miel, Confitura, Azucar, jarabe,	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Salado (sal)	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Amargo	Debil	Ligero	Fuerte	Agradable			
	1	2	3	4			
Astringente (Aspero)	Muy Astring.	Astring.	Algo Astring.	Ausente			
	1	2	3	4			
Seco (Falta dulce)	Fuerte	Medio	Ligero	Ausente			
	1	2	3	4			
Cuerpo (Aguado, sobrecargado, sin caracter)	Vacio	Ligero	Fuerte	Balanceado			
	1	2	3	4			
					Total Puntos		

Comentarios: _____

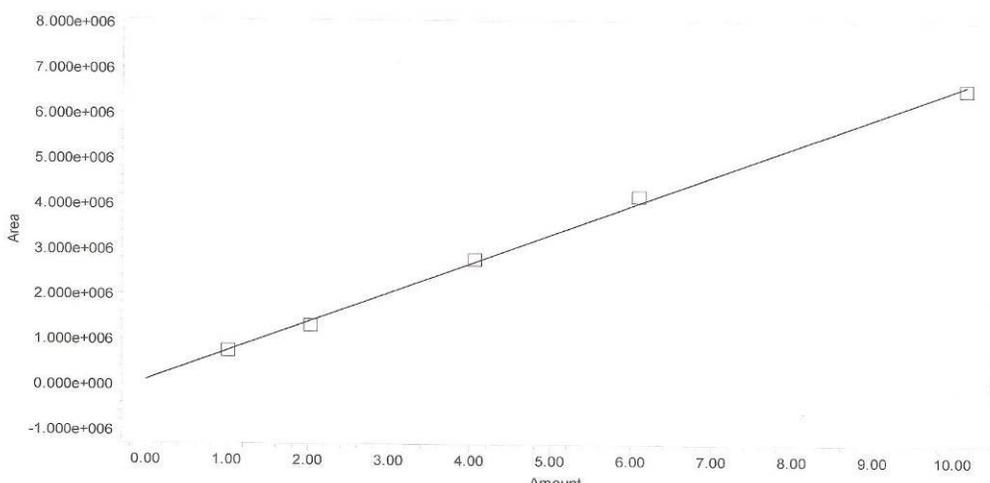
Apéndice 2: Curva de calibración de glucosa por HPLC



Curva de calibración de maltosa por HPLC

E.E.A.
 Project Name: Sugars_ES_carbohydrates
 Reported by User: System

Breeze

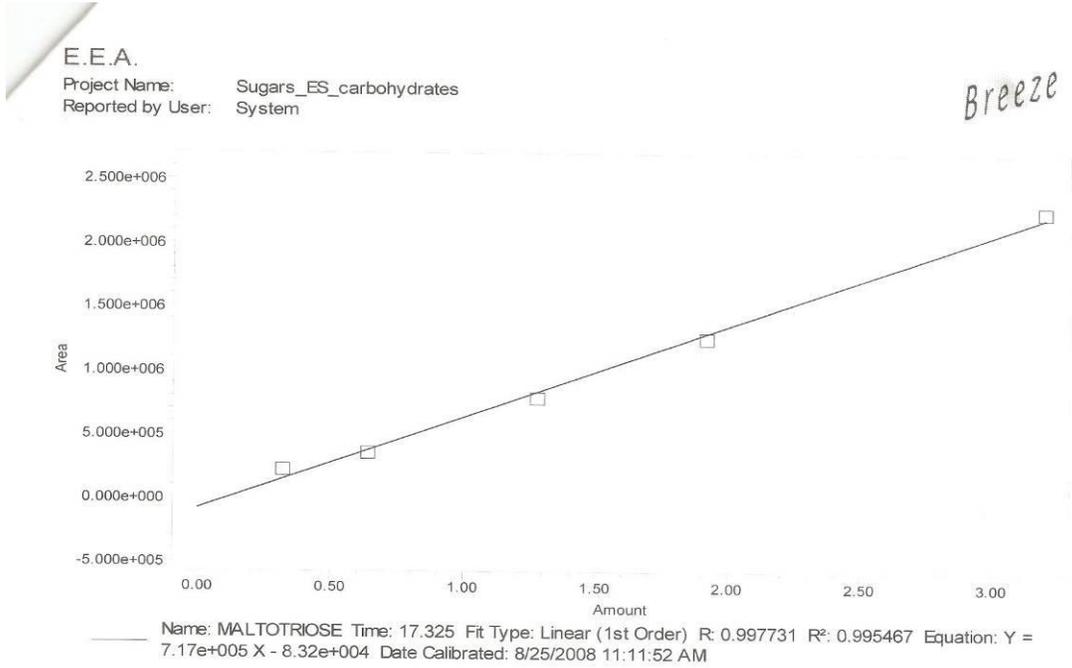


Name: MALTOSE Time: 11.666 Fit Type: Linear (1st Order) R: 0.999020 R²: 0.998041 Equation: Y = 6.45e+005 X + 1.02e+005 Date Calibrated: 8/25/2008 11:11:52 AM

Peak: MALTOSE

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Std.2	MALTOSE	2	1.016	7.496e+005	1.003542	-1.226	No	No
2	Std.3	MALTOSE	3	2.032	1.308e+006	1.868792	-8.032	No	No
3	Std.4	MALTOSE	4	4.064	2.780e+006	4.149509	2.104	No	No
4	Std.5	MALTOSE	5	6.096	4.182e+006	6.322182	3.710	No	No
5	Std.6	MALTOSE	6	10.160	6.571e+006	10.023974	-1.339	No	No

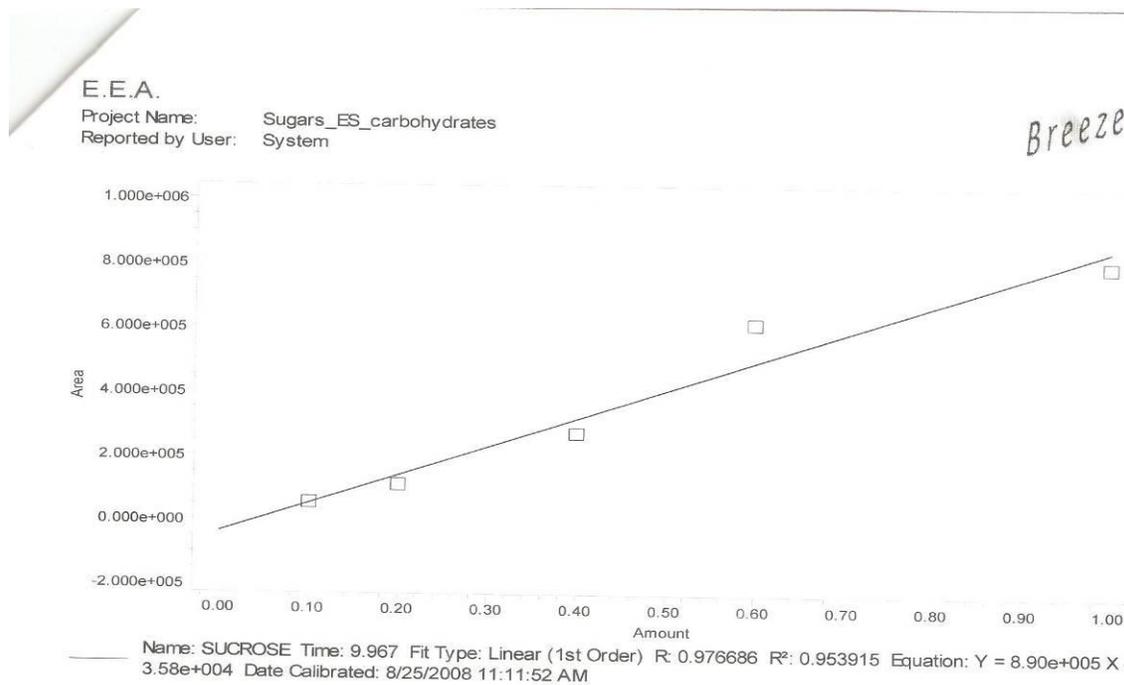
Curva de calibración de maltotriosa por HPLC



Peak: MALTOTRIOSE

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Std.2	MALTOTRIOSE	2	0.320	2.188e+005	0.421466	31.708	No	No
2	Std.3	MALTOTRIOSE	3	0.640	3.542e+005	0.610520	-4.606	No	No
3	Std.4	MALTOTRIOSE	4	1.280	7.824e+005	1.208012	-5.624	No	No
4	Std.5	MALTOTRIOSE	5	1.920	1.249e+006	1.858646	-3.196	No	No
5	Std.6	MALTOTRIOSE	6	3.200	2.254e+006	3.261358	1.917	No	No

Curva de calibración de sacarosa por HPLC



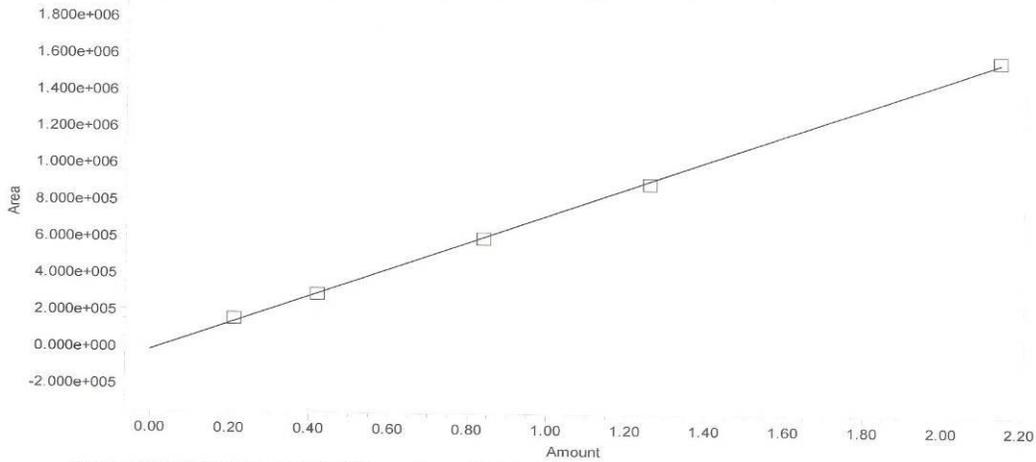
Peak: SUCROSE

	Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1	Std.2	SUCROSE	2	0.100	5.518e+004	0.102257	2.462	No	No
2	Std.3	SUCROSE	3	0.200	1.129e+005	0.167109	-16.278	No	No
3	Std.4	SUCROSE	4	0.399	2.749e+005	0.349135	-12.541	No	No
4	Std.5	SUCROSE	5	0.599	6.170e+005	0.733349	22.470	No	No
5	Std.6	SUCROSE	6	0.998	8.041e+005	0.943549	-5.456	No	No

Curva de calibración de fructosa por HPLC

E.E.A.
 Project Name: Sugars_ES_carbohydrates
 Reported by User: System

Breeze



Name: FRUCTOSE Time: 6.979 Fit Type: Linear (1st Order) R: 0.999718 R²: 0.999437 Equation: Y = 7.39e+005 X - 1.83e+004 Date Calibrated: 8/25/2008 11:11:52 AM

Peak: FRUCTOSE

Sample Name	Peak Name	Level	Amount	Response	Calc. Amount	% Deviation	Manual Point	Ignore Point
1 Std.2	FRUCTOSE	2	0.210	1.528e+005	0.231445	10.212	No	No
2 Std.3	FRUCTOSE	3	0.420	2.882e+005	0.414611	-1.283	No	No
3 Std.4	FRUCTOSE	4	0.840	5.958e+005	0.830546	-1.125	No	No
4 Std.5	FRUCTOSE	5	1.260	8.967e+005	1.237573	-1.780	No	No
5 Std.6	FRUCTOSE	6	2.146	1.580e+006	2.161824	0.737	No	No

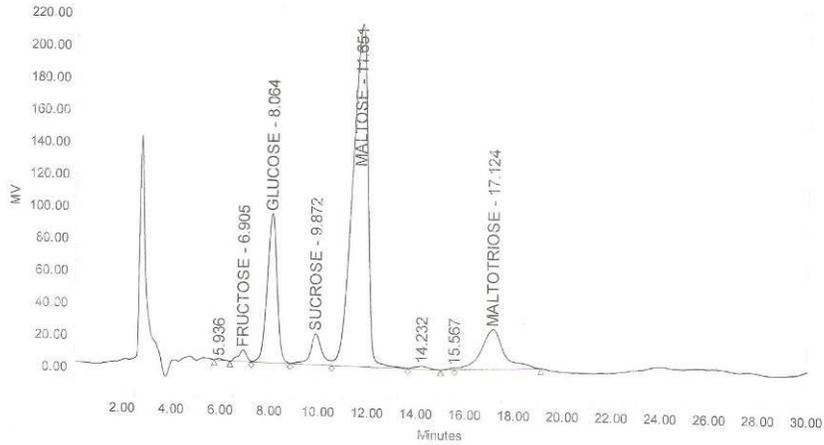
Cromatograma de los azúcares por HPLC

E.E.A.

Project Name: Sugars_ES_carbohydrates
 Reported by User: System

Breeze

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Mbsto 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	8/20/2008 6:32:34 PM
Vial:	8	Acq. Method:	Sugar_carbohydrate ES
Injection #:	1	Processed By:	System
Injection Volume:	10.00 ul	Date Processed:	8/25/2008 11:14:53 AM
Run Time:	30.00 Minutes	Channel Name:	410
Sampling Rate:	1.00 per sec	Channel Desc.:	RI Detector
		Sample Set Name:	MOSTOS ENZIMA 20 AGOSTO 2008
Sample Values			
Used in Calculations: SampleWeight = 1.00000 Dilution = 1.00000 Injection Volume = 10.00			



Peak Name	RT (min)	Peak Type	Area (µV*sec)	% Area	Height (µV)	% Height	Amount	% Amount	Units
1	5.936	Unknown	15599	0.11	858	0.24			
2	6.905	Found	173014	1.21	7365	2.05	0.259	1.24	%
3	8.064	Found	2572229	18.05	92579	25.72	3.452	16.56	%
4	9.872	Found	625348	4.39	19279	5.36	0.743	3.57	%
5	11.651	Found	9136034	64.12	212325	58.99	13.999	67.17	%

Apéndice 3. Datos obtenidos para los diferentes factores que afectan la formación de compuestos volátiles

RUN INFORMATION				YEAST			WORT									
Run name and #	Initial fermentation date	Final fermentation date	# Baticion	Viability (%)	Pitching rate (mil cells/ml wort)	Type / Gen	FAN (ppm)	Nitrogeno Soluble (ppm)	pH	°P	Color (°SRM)	Glucose Content (%w/v)	Maltose Content (%w/v)	Maltotriose Content (%w/v)	Fructose Content (%w/v)	Sucrose Content (%w/v)
CONTROL 1	25-May-09	3-Jun-09 (9DAYS)	343-348	92	27.7	G7	167	910	5.05	13.57	7.0	0.795	6.998	1.323	0.075	0.268
CONTROL 2	29-Jun-09	8-Jul-09 (9 DAYS)	427-432	92	26.6	G9	174	896	5.25	13.61	6.8	0.998	6.935	1.254	0.241	0.304
CONTROL 3	27-Jul-09	5-Ago-09 (9 DAYS)	493-498	89	29.4	I4	170	854	5.15	13.61	6.4	1.125	9.042	1.674	0.000	0.000
FAN 1	26-May-09	4-Jun-09 (9DAYS)	349-354	96	27.7	G7	186	938	5.10	13.60	7.2	0.696	6.935	1.345	0.073	0.238
FAN 2	14-Jul-09	23-Jul-09 (9 DAYS)	463-468	91	29.5	I3	183	882	5.29	13.56	6.4	0.936	6.761	1.346	0.341	0.000
FAN 3	30-Jul-09	7-Ago-09 (9 DAYS)	505-510	96	25.7	J3	189	868	5.18	13.55	7.1	0.834	9.335	1.021	0.316	0.000
OXYGEN 1	2-Jun-09	10-Jun-09 (8DAYS)	369-374	97	24.5	G7	167	868	5.13	13.54	6.5	0.678	6.912	1.406	0.086	0.387
OXYGEN 2	23-Jul-09	7-Ago-09 (9 DAYS)	484-489	93	22.3	J2	160	924	5.19	13.53	6.4	0.727	7.343	1.488	0.288	0.387
OXYGEN 3	28-Jul-09	5-Ago-09 (8 DAYS)	499-504	96	25.2	J3	170	854	5.19	13.55	6.4	0.798	9.325	0.964	0.000	0.000
PITCHING RATE 1	1-Jun-09	11-Jun-09 (10DAYS)	363-368	94	17.8	G7	165	812	5.11	13.58	6.5	0.716	6.908	1.511	0.055	0.253
PITCHING RATE 2	15-Jun-09	25-Jun-09 (10DAYS)	402-407	87	17.4	G8	168	980	5.17	13.66	7.0	0.721	6.771	1.388	0.052	0.288
PITCHING RATE 3	17-Jul-09	28-Jul-09 (11 DAYS)	472-477	85	16.0	I3	166	868	5.21	13.19	6.6	0.868	6.982	0.000	0.000	0.069
SUGAR PROFILE 1	18-Jun-09	25-Jun-09 (7DAYS)	408-413	92	26.9	G8	191	938	5.24	13.82	6.4	7.885	2.341	0.032	0.055	0.147
SUGAR PROFILE 2	23-Jun-09	1-Jul-09 (8 DAYS)	421-426	90	23.9	G9	190	924	5.18	13.76	6.0	7.8505	2.793	0.119	0.044	0.320
SUGAR PROFILE 3	21-Jul-09	28-Jul-09 (7 DAYS)	478-483	90	25.2	J2	185	924	5.26	13.88	6.0	8.221	3.027	0.000	0.000	0.549

FERMENTATION													
Run name and #	# CCT	Temp (°C)	Air flow (m ³ /h)	Dissolved Oxygen (ppm)	Final pH	Final °P	Alcohol (%)	Nitrogeno Soluble (ppm)	FAN (ppm)	Color (°SRM)	Oxigeno (ppm)	Turbidez (EBC)	BU (ppm)
CONTROL 1	13	15	6	9.61	4.20	-0.49	7.57	658	60	6.3	0.004	65.3	17.5
CONTROL 2	10	15	6	9.49	4.30	-0.65	7.72	700	71	5.9	0.015	194	18.0
CONTROL 3	9	15	6	9.27	4.17	-0.60	7.84	630	65	5.8	0.018	6.25	17.0
FAN 1	14	15	6	10.0	4.17	-0.47	7.44	630	60	6.6	0.030	117	20.5
FAN 2	14	15	6	9.27	4.35	-0.67	7.87	644	93	5.6	0.050	97.2	19.0
FAN 3	8	15	6	9.60	4.10	-0.55	7.77	602	62	6.4	0.015	116	16.0
OXYGEN 1	11	15	8	10.8	4.34	-0.80	8.00	700	66	5.9	0.019	291	18.0
OXYGEN 2	15	15	8	9.70	3.91	-0.22	7.49	588	52	5.7	0.012	61.1	20.0
OXYGEN 3	11	15	8	9.65	4.06	-0.54	7.70	616	48	5.7	0.010	76.1	16.5
PITCHING RATE 1	12	15	6	9.77	4.21	-0.39	7.70	700	78	6.1	0.080	95.5	19.5
PITCHING RATE 2	13	15	6	8.90	4.20	-0.40	7.82	770	86	6.1	0.020	0.105	18.0
PITCHING RATE 3	12	15	6	9.50	4.20	-0.59	7.60	630	77	5.7	0.012	294	16.5
SUGAR PROFILE 1	14	15	6	9.70	4.05	-0.52	7.75	854	86	6.0	0.013	0.672	17.0
SUGAR PROFILE 2	12	15	6	9.65	4.33	-0.58	7.43	700	96	6.3	0.019	217	17.0
SUGAR PROFILE 3	10	15	6	9.48	4.03	-0.45	7.68	630	58	5.6	0.016	129	16.0

CAN																	
Run name and #	Canned date	°P	Color (°SRM)	Nitrogeno Soluble (ppm)	FAN (ppm)	% Alcohol	pH	Foam (Nibe m seg)	Acetald ehyde (ppm)	Ethyl acetate (ppm)	1-propanol (ppm)	Isobutan ol (ppm)	Active amyl alcohol (ppm)	Isoamil Alcohol (ppm)	Isoamil Acetato (ppm)	2 phenyl ethanol (ppm)	2 phenyl ethyl acetate (ppm)
CONTROL 1	12-Jun-09	-0.32	3.1	343	34	4.10	4.33	182	2.9	17.8	7.2	7.8	13.3	39.8	1.6	15.5	0.37
CONTROL 2	20-Jul-09	-0.40	3.0	343	34	4.18	4.33	150	1.6	18.9	6.3	8.3	12.7	36.4	1.6	15.2	0.32
CONTROL 3	12-Ago-09	-0.40	2.9	343	35	4.19	4.35	164	2.0	18.7	6.4	8.3	15.2	39.7	1.7	16.3	0.38
FAN 1	17-Jun-09	-0.37	3.2	329	33	4.13	4.26	195	2.4	18.3	6.9	7.8	13.1	37.4	1.7	15.8	0.39
FAN 2	4-Ago-09	-0.43	3.3	385	49	4.11	4.54	168	3.6	18.9	5.5	7.5	13.0	32.8	1.6	18.6	0.38
FAN 3	20-Ago-09	-0.39	3.2	343	38	4.16	4.24	180	2.7	19.1	7.0	7.8	13.7	38.0	1.8	18.9	0.40
OXYGEN 1	24-Jun-09	-0.47	2.8	343	49	4.17	4.38	178	1.7	19.4	7.8	6.7	11.9	30.1	1.6	17.2	0.37
OXYGEN 2	10-Ago-09	-0.44	2.8	357	45	4.15	4.41	184	3.7	17.3	7.0	8.1	14.8	43.0	1.7	18.1	0.40
OXYGEN 3	18-Ago-09	-0.41	3.0	343	27	4.20	4.13	181	3.2	17.9	7.4	7.6	14.7	42.5	1.8	17.5	0.43
PITCHING RATE 1	23-Jun-09	-3.0	3.0	364	44.7	4.11	4.32	218	1.9	20.3	6.3	4.9	9.2	24.6	1.3	12.0	0.32
PITCHING RATE 2	8-Jul-09	-0.29	3.0	357	52	4.09	4.24	166	3.3	16.6	5.3	5.2	9.5	24.7	1.2	12.1	0.31
PITCHING RATE 3	5-Ago-09	-0.41	3.0	357	42	4.22	4.31	191	3.5	17.1	5.4	6.3	11.4	28.4	1.4	12.6	0.36
SUGAR PROFILE 1	13-Jul-09	-0.36	2.8	357	47	4.09	4.22	218	1.2	18.8	5.5	5.6	10.3	28.0	1.7	10.9	0.33
SUGAR PROFILE 2	17-Jul-09	-0.35	2.8	357	48	4.24	4.45	189	5.2	19.8	5.0	6.2	10.1	29.0	1.8	10.8	0.29
SUGAR PROFILE 3	7-Ago-09	-0.34	2.8	357	34	4.21	4.10	218	1.8	22.1	6.8	8.5	15.1	38.7	2.5	17.9	0.60