

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISION DE BIOTECNOLOGIA Y ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGIA



TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.

"EVALUACION ANALITICA Y SENSORIAL DEL
EFECTO DE VARIABLES DE PROCESO (CEPA, MOSTO
Y VIABILIDAD DE LEVADURA) EN LA GENERACION
DE COMPUESTOS DE AZUFRE EN LA PRODUCCION
DE CERVEZA"

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR

ESMERALDA DEL ROCIO PEREZ ORTEGA

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE 2010

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

**CAMPUS MONTERREY
DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA**



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY®**

**“EVALUACIÓN ANALÍTICA Y SENSORIAL DEL EFECTO DE VARIABLES DE
PROCESO (CEPA, MOSTO Y VIABILIDAD DE LEVADURA) EN LA
GENERACIÓN DE COMPUESTOS DE AZUFRE EN LA PRODUCCIÓN DE CERVEZA”**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

POR:

ESMERALDA DEL ROCÍO PÉREZ ORTEGA

MONTERREY, N.L. a 10 DICIEMBRE DE 2010

Agradecimientos

A Dios por darme vida y ánimo.

A Cuauhtémoc Moctezuma S.A de C.V por las facilidades prestadas para la realización de este proyecto.

Al Ing. Jorge Meillón, Dr. Carlos Martínez e Ing. Julián Serrano por haber creído en mí y darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A Luis Damas por formar parte de este proyecto, por sus asesorías técnicas y por sus palabras de aliento cuando las cosas se tornaron complicadas.

A Dr. Mario Moisés Álvarez por aceptarme en su grupo de investigación y guiarme para la terminación de mis estudios de posgrado.

A Carlos Cañamar y Juan Carlos Cabada por haber facilitado mi asistencia a este programa de Maestría.

A Juan Carlos Robles y Edmundo González por su esfuerzo diario.

A Clara y Juan Manuel por ser mis amigos y apoyarme cuando más lo necesité.

A Yenny Webb por su incondicional asesoría y disponibilidad en todo momento.

A Edith, Adriana y Consuelo por su tiempo y paciencia.

A mis padres por estar a mi lado y animarme cuando lo he necesitado.

A mi hermano por apoyarme sin reservas ni condicionales.

A todos aquellos que de alguna forma participaron en la realización de ésta investigación.

Dedicatoria

A mi familia, mi soporte en todo momento.

Tabla de Contenidos

AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
TABLA DE CONTENIDOS	V
NOMENCLATURA.....	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	XI
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 JUSTIFICACIÓN	5
3 MARCO TEÓRICO	6
3.1 RESEÑA HISTÓRICA DE LA CERVEZA.....	6
3.2 EL SABOR DE LA CERVEZA	7
3.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA.....	9
3.3.1 <i>Materias primas</i>	9
3.3.2 <i>Operaciones para elaboración de cerveza</i>	10
3.4 NUTRIENTES DEL MOSTO	13
3.5 LEVADURA.....	17
3.6 COMPUESTOS DE AZUFRE	19
3.7 RUTAS DE FORMACIÓN DE COMPUESTOS DE AZUFRE	21
3.8 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE AZUFRE	25
3.8.1 <i>Analíticos</i>	25
3.8.2 <i>Sensoriales</i>	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5 MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
5.2 MATERIALES.....	31
5.2.1 <i>Mosto</i>	31
5.2.2 <i>Levadura</i>	32
5.3 FERMENTACIONES.....	33
5.4 MUESTREO Y FRECUENCIAS	34
5.4.1 <i>Mostos</i>	34
5.4.2 <i>Fermentaciones</i>	34
5.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	35
5.5.1 <i>Amino nitrógeno libre (FAN)</i>	35
5.5.2 <i>Aminoácidos libres</i>	35
5.5.3 <i>Carbohidratos</i>	36

5.5.4	<i>Viabilidad de Levadura</i>	36
5.5.5	<i>Compuestos de Azufre</i>	36
5.5.6	<i>Análisis Sensorial</i>	37
5.5.7	<i>Parámetros Fermentativos</i>	37
5.5.8	<i>Control Microbiológico</i>	38
5.5.9	<i>Análisis Estadísticos</i>	38
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1	NUTRIENTES DEL MOSTO	40
6.2	EVALUACIÓN QUÍMICO ANALÍTICA.....	46
6.3	VIABILIDAD DE LEVADURA	57
6.4	EVALUACIÓN SENSORIAL.....	58
6.5	RELACIÓN ENTRE EVALUACIONES QUÍMICO-ANALÍTICAS Y SENSORIALES	63
6.6	OTROS PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN	74
6.6.1	<i>Compuestos frutales</i>	74
6.6.2	<i>Diacetilo, porcentaje de alcohol y células en suspensión</i>	80
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
8	FUTURAS INVESTIGACIONES	85
9	APÉNDICES	86
10	REFERENCIAS	111

Nomenclatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
DUBA	Agar universal para cerveza
FAN	Amino nitrógeno libre
cel/mL	Células por mililitro
cm	Centímetro
CA	Compuestos de azufre
CCM	CerveceríaCuauhtémoc Moctezuma
SO ₂	Dióxido de azufre
F2D	Fermentación segundo día
F3D	Fermentación tercer día
FF	Final de fermentación
°C	Grado Celsius
°P	Grado plato
g	Gramo
hl	Hectolitro
L	Litro
MRS	Medio De Man-Rogosa-Sharpe
MetSAc	Metil tioacetato
µg/L	Microgramo por litro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
ppb	Parte por billón

ppm	Parte por millón
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
R3D	Reposo tercer día

Lista de Figuras

Figura 1. Rueda del Sabor de la Cerveza	8
Figura 2. Esquema general para la elaboración de cerveza.....	13
Figura 3. Esquema de asimilación de nutrientes del mosto.....	17
Figura 4. Rutas de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro, y su incorporación en aminoácidos.	23
Figura 5. Posibles rutas de generación de metanotiol y su esterificación para formación de tioésteres.	25
Figura 6. Condiciones experimentales de fermentación en probetas de 2 L....	33
Figura 7. Comparación de perfil de aminoácidos libres de mostos experimentales, expresados como porcentajes del total..	43
Figura 8. Concentración de ácido sulfhídrico medido en F2D, FF y R3D para ambas cepas todos los tratamientos.	47
Figura 9. Esquema con incorporación de los genes con diferencias de expresión.	50
Figura 10. Concentración de metil tioacetato medido a F2D, FF y R3D para ambas cepas, todos los tratamientos.	53
Figura 11. Concentración de H ₂ S (A) y MetSAc (B) al FF y R3D para ambas cepas en el experimento 2 ²	56
Figura 12. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos, para cepa 790 en FF.....	59
Figura 13. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos, para cepa 820 en FF.....	60
Figura 14. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos, para cepa 790 en R3D..	61
Figura 15. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos, para cepa 820 en R3D.....	62
Figura 16. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos en FF (A) y R3D (B).	63

Figura 17. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 en FF.....	66
Figura 18. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 820 en FF.....	67
Figura 19. Relación entre el ranking sensorial con la concentración de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 en FF.....	68
Figura 20. Relación entre el ranking sensorial con la concentración de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 820 en FF.....	69
Figura 21. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 en R3D.....	70
Figura 22. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 820 en R3D.....	71
Figura 23. Relación entre el ranking sensorial con la concentración de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 (A) y 820 (B) en R3D.....	71
Figura 24. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para experimento 2 ² en FF.....	73
Figura 25. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para experimento 2 ² en R3D.....	73
Figura 26. Concentración de acetaldehído, acetato de etilo y acetato de isoamilo medido en FF para ambas cepas y todos los tratamientos.....	74
Figura 27. Concentración acetato de isoamilo medido en FF para ambas cepas y todos los tratamientos.....	75
Figura 28. Habilidades de ordenamiento para compuestos frutales, con cuasi-intervalos de confianza simultáneos, para cepa 790 (A) y 820 (B) en FF.....	78
Figura 29. Habilidad de ordenamiento y contenido de acetaldehído para la cepa 790 (A) y 820 (B) en FF.....	80

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación de aminoácidos del mosto en base a su velocidad de asimilación por la levadura.	16
Tabla 2. Factores y niveles del diseño experimental	31
Tabla 3. Formulación de mostos cerveceros experimentales.....	32
Tabla 4. Parámetros evaluados y frecuencias de muestreo durante la fermentación y reposo..	34
Tabla 5. Resultados analíticos generales de los mostos experimentales.	40
Tabla 6. Perfil de aminoácidos de mostos experimentales.	41
Tabla 7. Valor-p para los efectos principales e interacciones para H ₂ S y MetSAC.....	49
Tabla 8. Valor-p para efectos principales e interacciones de experimento 2 ² , para H ₂ S y MetSAC al FF y R3D.....	55
Tabla 9. Porcentajes de células viables, posterior al tratamiento.....	57
Tabla 10. Valor-p para los factores evaluados en la predicción del ranking y del modelo general.....	64
Tabla 11. Valor-p para el modelo de covariables en la predicción del ranking sensorial.....	65
Tabla 12. Valor-p para los factores evaluados en la predicción del ranking y del modelo general para el experimento 2 ²	72
Tabla 13. Valor-p para el modelo de covariables en la predicción del ranking sensorial para el experimento 2 ²	72
Tabla 14. Valor-p para los efectos principales e interacciones los compuestos volátiles frutales evaluados al FF.....	77
Tabla 15. Valor-p para los factores evaluados en la predicción del ranking sensorial de aroma frutal y del modelo general.	79
Tabla 16. Valor-p para el modelo de covariables de compuestos frutales en la predicción del ranking sensorial.	79
Tabla 17. Células en suspensión al final de la fermentación (FF).....	81

Resumen

En la producción de cerveza, la fermentación resulta ser la etapa donde se genera la mayor cantidad de compuestos aromáticos, con efecto en el perfil sensorial del producto final. Entre las notas aromáticas indeseables se encuentran los compuestos de azufre, los cuales confieren aromas que se relacionan con drenaje, huevo podrido y vegetales en descomposición.

Los compuestos de azufre que se han identificado y cuantificado en cerveza son: ácido sulfhídrico, tioles, tioésteres y dióxido de azufre; la importancia de éstos compuestos radica en su alto impacto aromático, ya que niveles en el orden de partes por billón o trillón pueden ser detectados por el olfato humano.

En este estudio se realizaron fermentaciones a nivel laboratorio en donde se ensayaron variables de proceso (cepa, mosto y viabilidad de levadura) con el objetivo de determinar los factores de mayor impacto en la generación de compuestos de azufre.

Las cepas de levadura evaluadas fueron del género *Saccharomyces* tipo lager, con uso actual en la industria cervecera (820 y 790); los mostos variaron en el contenido de nutrientes nitrogenados y la viabilidad de la levadura se modificó mediante tiempo y temperatura de almacenamiento previo a la inoculación.

Los resultados indican que los factores de cepa y mosto, fueron los de mayor impacto en la generación de compuestos azufrados. De los analitos de interés, cuantificados por cromatografía de gases con detector de quimiluminiscencia, solamente ácido sulfhídrico (H_2S) y metil tioacetato (MetSAc), presentaron

diferencias significativas entre tratamientos. La combinación de cepa 820 con un mosto deficiente en nutrientes (amino nitrógeno y aminoácidos libres) generó la mayor concentración de compuestos de azufre, detectable sensorialmente por el grupo de catadores entrenados.

Se demostró que la cepa 790 es capaz de regular la producción de compuestos de azufre de manera más eficiente que la 820 y que el aumento de nutrientes nitrogenados en el mosto puede disminuir la generación de H₂S y MetSAc en fermentaciones realizadas con la cepa 820.

1 Introducción

La cerveza se define como el resultado de la fermentación alcohólica del extracto acuoso de granos malteados. El cereal malteado generalmente es cebada, aunque pueden agregarse otras fuentes de almidón o azúcares fermentables (Hardwick, 1995).

La producción de cerveza, aunque se ha industrializado, continúa siendo un arte. Lograr una consistencia impecable en parámetros de calidad y aceptación, como el aroma y el sabor, es aún un reto para los productores de esta bebida (Vermeulen et al., 2005). Las principales fuentes de variación en el sabor de la cerveza son las materias primas, las condiciones de fermentación y los tratamientos post-fermentación (Coghe et al., 2004).

Durante la fermentación se desarrollan los aromas de mayor impacto en el perfil sensorial de la cerveza. Tanto el etanol como el dióxido de carbono contribuyen al sabor del producto impartiendo calidez y efervescencia, respectivamente. Sin embargo, el carácter esencial de cualquier cerveza está determinado por los metabolitos aromáticos, resultado de la acción de la levadura (Boulton y Quain, 2003). Se han identificado varios cientos de compuestos aromáticos en la cerveza, algunos que imparten notas positivas y otros indeseables en el perfil de sabor (Meilgaard, 1981). Los componentes del aroma de la cerveza son variados y han sido clasificados de acuerdo a su percepción sensorial. Algunos grupos son: ésteres, dicetonas vecinales, alcoholes superiores y compuestos de azufre (Drews et al., 1969).

Es aceptado que ciertos compuestos de azufre forman parte normal del aroma de la cerveza, pero su contribución positiva depende de las concentraciones en las que éstos se encuentren y del equilibrio que logren con otros compuestos volátiles. La importancia de los compuestos de azufre en la cerveza radica en su alto impacto aromático a pesar de las bajas concentraciones presentes; en algunos casos niveles de hasta 1 ppb pueden contribuir en el perfil sensorial (Walker y Simpson, 1993). Entre los compuestos de azufre que se han identificado y cuantificado en cerveza se encuentran: ácido sulfhídrico, tioles, tioésteres y dióxido de azufre, todos ellos activos en la contribución de aroma (Laundaud et al., 2008). Ligeros aumentos en los niveles de concentración de los compuestos de azufre, en el orden de partes por billón o trillón, crean notas aromáticas desagradables.

2 Justificación

Debido a su contribución aromática, la formación de compuestos de azufre (CA) en bebidas fermentadas ha sido sujeto de interés. Para los consumidores de cerveza, los CA pueden jugar un rol atractivo o repulsivo, dependiendo de su identidad y concentración (Laundaud et al., 2008).

Para la industria cervecera se considera de interés ampliar el conocimiento de las necesidades nutricionales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, etc.) y de proceso (temperatura de fermentación, condiciones de almacenamiento, oxigenación, presión, etc.) de sus cepas de levadura, para lograr el mejor desempeño, no solamente en los parámetros básicos de producción de alcohol y abatimiento de extracto, sino también en términos de la generación de compuestos con efecto en el aroma (Stewart y Russell, 1993). Por lo anterior, el conocimiento acerca de los factores de mayor impacto en la generación de compuestos de aroma permitirá manejar las fermentaciones de tal manera que se produzcan los compuestos requeridos en las cantidades adecuadas o se disminuya la formación de compuestos indeseables.

Establecer una relación entre resultados químico-analíticos y sensoriales se considera de alto valor, ya que da robustez a ambos análisis. Conocer cuáles son las concentraciones sensorialmente detectables de compuestos de azufre ayuda a fijar metas realistas acerca de las concentraciones máximas permitidas en el producto, sin afectar su perfil de sabor.

3 Marco Teórico

3.1 Reseña histórica de la Cerveza

La más antigua referencia que se tiene de producción de cerveza data del año 6000 A.C. en la región de Babilonia, posteriormente se fue generalizando el consumo de cerveza en todos los pueblos de la antigüedad, desde los egipcios, griegos, romanos, celtas, hasta españoles y la parte septentrional de África (Hardwick, 1995).

Durante la época medieval, la cerveza empezó a tener un importante arraigo en Europa, sin embargo, a pesar de su popularidad y antigüedad, la cerveza se comenzó a elaborar comercialmente hasta el siglo XVI, cuando surgieron las primeras grandes fábricas cerveceras. La auténtica época dorada de la cerveza comienza a finales del siglo XVIII, con la incorporación de la máquina de vapor a la industria cervecera y el descubrimiento de la nueva fórmula de producción en frío. La producción de cerveza alcanza su perfeccionamiento en el último tercio del siglo XIX, con los hallazgos del biólogo francés Luis Pasteur relativos al proceso de pasteurización (Cerveceros de España, 2007).

En la época contemporánea, la difusión de la producción mundial de cerveza en 1961 ascendía a 435 millones de hectolitros y para 1998 esa cifra ya se había triplicado (Boulton y Quain, 2003).

En México la historia de la cerveza comienza en el año 1540, fecha en que se elabora la primera solicitud para producir y vender cerveza en la Nueva España. La expansión de la producción cervecera durante la Colonia y la época Independiente fue relativamente lenta. Fue hasta 1865 cuando la producción

industrial de cerveza empezó con la empresa Toluca y México S.A. de C.V., continuando con la fundación de Cervecería Cuauhtémoc en 1890, Cervecería Moctezuma en 1894 y Cervecería Modelo como fusión de las empresas Toluca y México, Pacífico y Yucateca en 1925 (Asociación Nacional de Fabricantes de Cerveza, 2005).

3.2 El sabor de la cerveza

A pesar de los grandes avances tecnológicos en la industria cervecera, el proceso de elaboración todavía conserva rasgos artesanales. Por tanto el equilibrio y conocimiento de los factores que afectan al sabor, ha requerido de investigación ardua y constante.

Una multitud de compuestos contribuyen al sabor de la cerveza, muchos de los cuales provienen directamente de las materias primas utilizadas en la elaboración del mosto. Sin embargo, el proceso de fermentación se considera el de mayor impacto en la generación de sabores y aromas debido a la gran cantidad de metabolitos generados por la levadura (Boulton y Quain, 2003).

Los metabolitos de la levadura que contribuyen al sabor pertenecen a varias familias químicas entre los que podemos encontrar ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, carbonilos y compuestos de azufre.

Varios cientos de compuestos han sido identificados en la cerveza, algunos contribuyen de manera positiva en el sabor y otros a ciertas concentraciones generan notas indeseables. Dentro de estas notas indeseables están el

diacetilo, 4 vinil guayacol, aluzado, oxidación, metálico y los compuestos de azufre (Meilgaard, 1999).

Morten Meilgaard fue el pionero en la identificación de los componentes aromáticos de la cerveza, publicó más de 200 de umbrales de detección y en conjunto con la ASBC (American Society of Brewers Chemists), EBC (European Brewers Convention) y MBAA (Master Brewers Association of the Americas), clasificó los compuestos por su cercanía aromática, generando la Rueda del Sabor (Meilgaard, 1981), una forma gráfica para facilitar la ubicación de los diferentes descriptores que pueden formar parte del perfil de sabor de una cerveza (ver Figura 1).

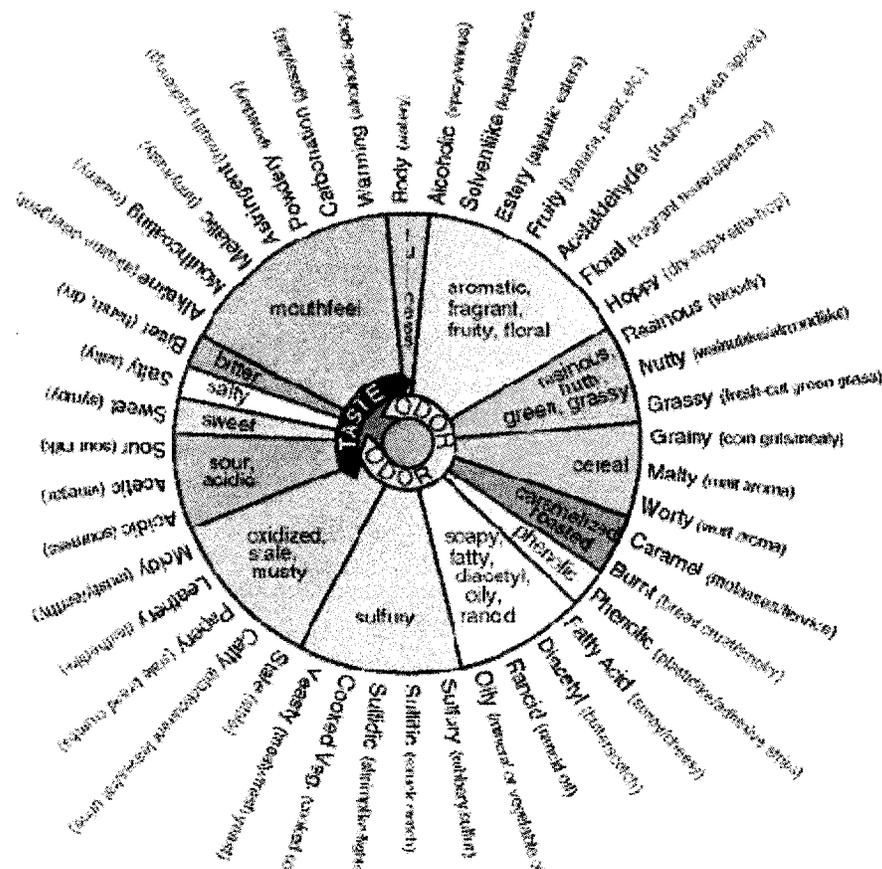


Figura 1. Rueda del Sabor de la Cerveza, Meilgaard (1981).

3.3 Proceso de elaboración de la cerveza

3.3.1 Materias primas

Las materias primas básicas para la elaboración de cerveza son agua, malta, adjuntos, lúpulo y levadura.

Agua: La calidad del agua usada para elaborar cerveza es de suma importancia, considerando que de 90 a 96% de la cerveza es agua (Sánchez, 1999).

Malta: La malta es una fuente de extracto fermentable y proporciona características de aroma, sabor y color a la cerveza. Es el grano de cebada que ha sido sometido al proceso de remojo, germinación y secado, con el objetivo de modificar las características del grano y hacerlo apto para el proceso cervecero. (Kramer, 2006).

Adjuntos: Son los ingredientes utilizados como fuente de almidones, que no son malta. Entre los principales adjuntos utilizados en la industria cervecera se encuentran maíz, arroz, trigo, cebada sin malteo y sorgo.

Lúpulo: Inflorescencias femeninas de la planta *Humulus lupulus*. El lúpulo es un ingrediente reconocido en la elaboración de cerveza, imparte el sabor amargo y un aroma herbal cítrico, ayudando a balancear las notas dulces procedentes de la malta. Las resinas del lúpulo inhiben el crecimiento de algunas bacterias, lo cual ayuda a mantener la fermentación libre de

contaminación y permite conservar las características de la cerveza (Sidor, 2006).

Levadura: Es un microorganismo unicelular perteneciente al reino Fungi. Específicamente, para fermentaciones alcohólicas, el género *Saccharomyces*, con sus diferentes especies, es el más utilizado. En la sección 3.5 se ampliará la información de este microorganismo, imprescindible en la elaboración de cerveza.

3.3.2 Operaciones para elaboración de cerveza

Cocimientos: El objetivo es la producción eficiente de un mosto, con la calidad deseada de acuerdo a la formulación. El mosto es la mezcla acuosa compleja de material soluble y suspendido, derivado de los ingredientes.

En el cocedor se adicionan los ingredientes fuentes de almidón, que no son malta, para ser acondicionados en una solución acuosa con el auxilio de enzimas y temperatura.

El macerador recibe la malta y con el efecto de la temperatura y las enzimas, los almidones serán transformados en azúcares. Aquí también se agrega el material del cocedor previamente tratado. Por efecto de la actividad enzimática de la malta, los almidones se convertirán en azúcares simples, enriqueciendo la concentración del grado plato (g sólidos disueltos / 100 g de solución, °P) del líquido. El caldo resultante del macerador es identificado como mosto.

Al mosto procedente del macerador se le remueve la cascarilla proveniente de los granos de malta por medio de un filtro, normalmente conocido como lauter. En la olla de cocimientos se calienta el mosto hasta la temperatura de ebullición y se adiciona el lúpulo. Los principales objetivos del hervido son:

- Precipitar las proteínas coagulables.
- Asegurar estabilidad microbiológica.
- Reducir los compuestos volátiles indeseables procedentes de las materias primas.
- Isomerizar el lúpulo.
- Evaporar el agua hasta el nivel de concentración de azúcares deseado (°P).

El mosto hervido es transferido a un recipiente con entrada tangencial en el fondo (whirlpool), lo cual permite la formación de un remolino, facilitando que los sólidos (trub) se acumulen en el centro y fondo del mismo. Aquí reposa por un breve espacio antes de ser transferido al enfriador de mosto (Fahy y Spencer, 1999).

Enfriado de mosto: Durante el enfriado se reduce la temperatura del mosto de aproximadamente 94 – 100 °C a la temperatura de inoculación, entre 9 y 15°C, para fermentaciones tipo lager.

El mosto debe ser aereado para proporcionarle oxígeno a la levadura al inicio de la fermentación, la aereación se puede realizar inyectando directamente aire estéril u oxígeno.

Fermentación. La fermentación alcohólica es el proceso en el cual la levadura transforma los azúcares en etanol, dióxido de carbono y energía. La fermentación ha sido considerada el paso más importante y complejo de las operaciones del proceso cervecero. Siempre es un reto controlar los cambios de sabor y aroma procedentes del desempeño de la levadura (Carey y Grossman, 2006). Los productos desarrollados durante la fermentación impactan el sabor final de la cerveza.

Reposo y acabado. Esta etapa comprende los pasos de maduración, carbonatación, estabilización en frío, clarificación y estandarización. Terminado el proceso de reposo, la cerveza es enviada al proceso de abrillantado (filtración), donde el líquido es clarificado y carbonatado para enviarlo a las líneas de envasado.

En la Figura 2 se muestra un esquema simplificado de las etapas más importantes en la elaboración de cerveza. Se consideran 3 etapas clave para llegar al producto final, cerveza: elaboración de mosto, inoculación con levadura y fermentación,

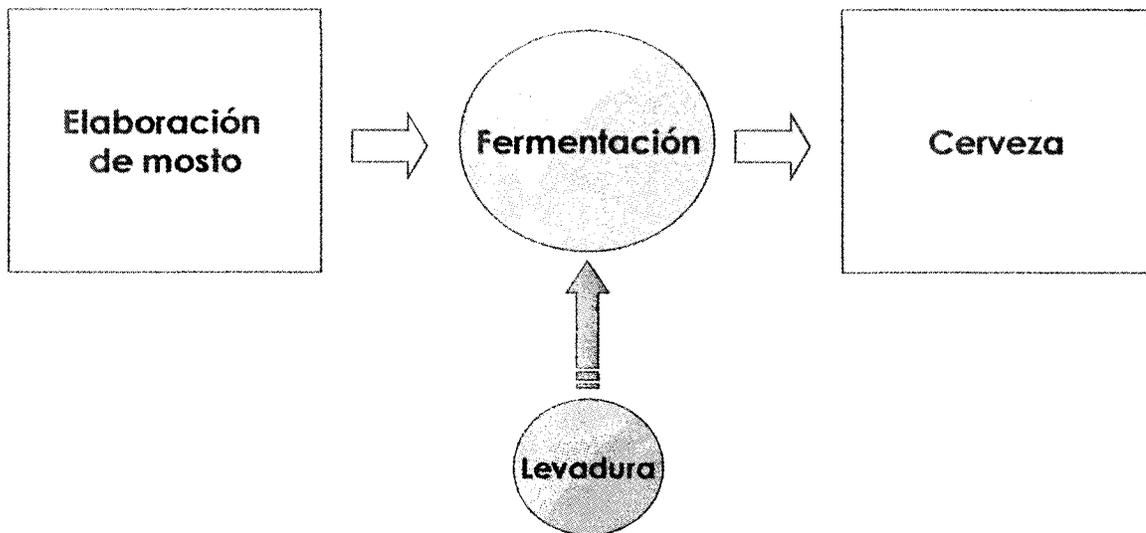


Figura 2. Esquema general para la elaboración de cerveza.

3.4 Nutrientes del mosto

El mosto es un medio de crecimiento consistente en azúcares fermentables (fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa y maltotriosa), componentes nitrogenados (aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros productos procedentes de la degradación del endospermo de la malta), vitaminas, iones, sales minerales, elementos traza y otros componentes (Bamforth, 2003).

La mayoría de los cerveceros han basado el criterio principal de calidad del mosto en la gravedad específica del mismo, asumiendo que el balance relativo de carbohidratos, compuestos nitrogenados y otros materiales permanece constante (Bamforth, 2003). Sin embargo, se ha reportado que la composición del mosto forma parte importante de las características finales de la cerveza (Meilgaard, 1999). Aún cuando su composición precisa es desconocida, ha sido

posible establecer relaciones entre la asimilación de los principales nutrientes por parte de la levadura y la generación de compuestos resultado de su actividad metabólica (Boulton y Quain, 2003). Por lo anterior, la manipulación en la composición de los mostos puede ser una estrategia deliberada para producir cambios en la fermentación.

La asimilación de los nutrientes del mosto por parte de la levadura es selectiva y regulada. Cuando se presentan opciones de nutrientes la levadura asimilará aquellos que le resulte más sencillo metabolizar. Sin embargo, no solamente la facilidad de utilización influye, también la presencia de algunos nutrientes puede inhibir la utilización de otros (Boulton y Quain, 2003).

Las levaduras cerveceras son capaces de asimilar una amplia variedad de carbohidratos como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa y trehalosa, aunque puede haber variantes metabólicas entre cepas. El orden de absorción de los azúcares por parte de la levadura generalmente inicia con la glucosa, continúa con la fructosa. Cuando los monosacáridos se agotan, comienza el consumo de la maltosa y finalmente de maltotriosa. Esta secuencia puede ser alterada por la composición inicial de los mostos. En el caso de altas concentraciones de glucosa, en algunas cepas de levadura, se genera una represión en el uso de maltosa, lo cual dejará al final de la fermentación extracto sin ser fermentado por la levadura (Boulton y Quain, 2003; Stewart y Russell, 1993).

Los compuestos nitrogenados presentes en el mosto son variados. Se han encontrado de 19 a 20 aminoácidos, y se ha especulado acerca de la presencia de 400 dipéptidos y más de 8,000 tripéptidos como potenciales fuentes de nitrógeno, asimilable por la levadura (Lekkas et al., 2007). La mayoría de las cepas son capaces de importar péptidos de hasta 3 aminoácidos (Lekkas et al., 2009) por mecanismos distintos a los de aminoácidos (Patterson y Ingledew, 1999). Sin embargo los aminoácidos son considerados la principal fuente de nitrógeno asimilable en el mosto (O'Connor-Cox e Ingledew, 1989).

Al igual que en el caso de los azúcares, la asimilación de compuestos nitrogenados por parte de la levadura es ordenado. Jones y Pierce, (1964) propusieron una clasificación de aminoácidos en 4 grupos en base a su ruta de asimilación (ver Tabla 1). En el grupo A se encuentran los aminoácidos que son asimilados de manera inmediata, en el grupo B aquellos que se asimilan más lentamente, en el grupo C están los que se consumen únicamente después de que se han agotado los grupos A y B, finalmente el grupo D en donde está solamente la prolina (Lekkas et al, 2005). Aunque la prolina es el aminoácido más abundante en el mosto, no cuenta con un grupo amino libre capaz de participar en las reacciones transaminación (O'Connor-Cox e Ingledew, 1989), por lo que prácticamente no se asimila.

La función de los compuestos nitrogenados asimilables en el metabolismo de la levadura es variada, el amino nitrógeno libre (FAN) del mosto lo utiliza la levadura para la síntesis de nuevas estructuras y enzimas (O'Connor-Cox e

Ingledew, 1989) y para la formación de varios compuestos aromáticamente activos como diacetilo, compuestos azufrados, alcoholes superiores y ésteres (Meilgaard, 1999).

Tabla 1. Clasificación de aminoácidos del mosto en base a su velocidad de asimilación por la levadura (Lekkas et al., 2005).

Grupo A Absorción inmediata	Grupo B Absorción intermedia	Grupo C Absorción lenta	Grupo D Absorción escasa o nula
Ácido glutámico	Valina	Glicina	Prolina
Ácido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	Triptofano	
Serina	Histidina	Alanina	
Treonina		Amonio	
Lisina			
Arginina			

Los aminoácidos del mosto son metabolizados en dos maneras. Primeramente son tomados dentro de la célula e incorporados a la formación de proteínas, la otra opción es por la ruta de Ehrlich en donde el grupo amino es transferido por una transaminasa y el esqueleto de carbón es secretado o utilizado para la regeneración de NAD⁺, en este segundo caso el oxo-ácido producido por transaminación es descarboxilado para producir CO₂ y un aldehído. Los aldehídos son reducidos, para dar lugar a alcoholes de fusel (Lewis y Young, 1995).

En la Figura 3 se muestra un esquema que representa de manera general el destino de los nutrientes del mosto cuando son asimilados por la levadura.

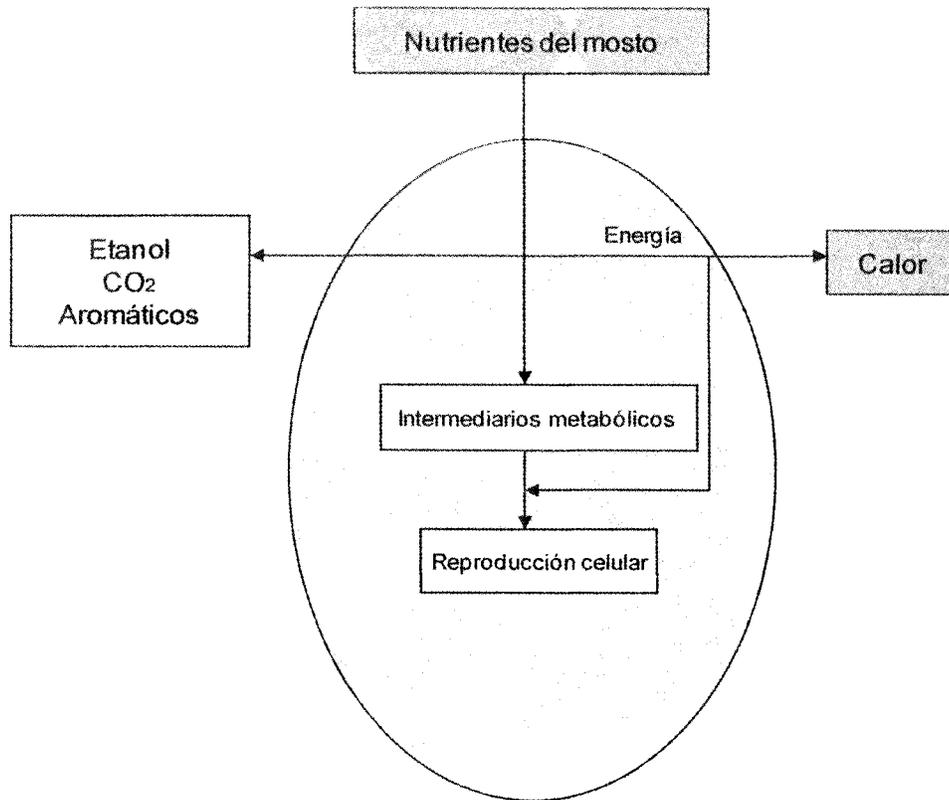


Figura 3. Esquema de asimilación de nutrientes del mosto, en la fermentación para producción de cerveza. Modificación de Carey y Grossman, 2006.

3.5 Levadura

La levadura es un microorganismo unicelular perteneciente al reino Fungi. Dentro del género *Saccharomyces* existen gran variedad de especies, pero las más relevantes para la fermentación alcohólica son *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *S. pastorianus* (Gales, 2007).

Los taxonomistas han modificado la posición y el nombre de algunos de los miembros del género *Saccharomyces*, es por eso que las levaduras tipo lager han sido llamadas de varias maneras *S. carlsbergensis*, *S. uvarum*, *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis* y actualmente clasificadas como *S. pastorianus*. Sin embargo, dicha clasificación no ha sido totalmente aceptada ya que los

análisis de ADN sugieren que las cepas tipo lager en realidad son híbridos de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Gales, 2007).

La levadura, como resultado de su metabolismo, además de producir alcohol (etanol) también genera CO₂ y otros compuestos con efecto en el sabor y aroma: alcoholes de fusel, ésteres, ácidos orgánicos, compuestos de azufre, dicetonas vecinales, entre otros (Boulton y Quain, 2003; Meilgaard, 1981). Es por eso que tiene gran influencia en el perfil y carácter de la cerveza.

El conocimiento de la estructura, composición, metabolismo y crecimiento de la levadura resulta de importancia, ya que existen grandes diferencias entre los tipos y razas de la misma especie (Kunze, 1999). El genotipo de una cepa particular de levadura es crítica para los resultados de la fermentación, así el espectro de metabolitos influyentes en el sabor dependen de la cepa y de las condiciones de fermentación (Boulton y Quain, 2003).

Otro factor importante que impacta en el desempeño de la levadura es su calidad, normalmente evaluado como viabilidad y vitalidad (Gales, 2007). La viabilidad se refiere al porcentaje de células vivas y la vitalidad refleja la salud de las células (actividad metabólica y estado fisiológico). Para que la levadura se mantenga sana, se deben seguir buenas prácticas en el manejo de ésta. Durante el almacenamiento (entre la cosecha de una fermentación y la inoculación siguiente), se recomienda evitar la presencia de oxígeno, altas temperaturas, agitación y largos periodos de espera (Pickerell et al., 1991).

3.6 Compuestos de azufre

Los compuestos de azufre de mayor interés para los cerveceros son aquellos que generan algún efecto en el aroma o sabor de la cerveza, cada uno de éstos presenta diferentes características físico-químicas originando diferentes notas aromáticas.

Ácido Sulhídrico (H₂S). El H₂S se percibe como un aroma a huevo podrido o drenaje. Es producido y consumido por la levadura durante la fermentación. Los niveles de producción de este compuestos se atribuyen a condiciones de proceso como: cepa, oxigenación, trub, entre otras (Laundaud et al., 2008).

Debido a su extrema volatilidad el H₂S puede ser eficientemente arrastrado por el CO₂ y removido del líquido final. Sin embargo su umbral de detección se encuentra entre 5-10 ppb (Meilgaard, 1981) por lo que pequeñas cantidades pueden hacer grandes diferencias en el perfil sensorial.

Adicional al H₂S producido de manera natural en la fermentación, contaminaciones con bacterias gram negativas pueden generar H₂S, contribuyendo a superar el umbral sensorial (Kunze, 1999).

Sulfuros y tioles. Ambos grupos de compuestos presentan umbrales de detección del orden de ppb. Los primeros presentan aromas a vegetales cocidos desde cebolla, ajo, elote, apio y repollo. Los segundos, también conocidos como mercaptanos, se caracterizan por el aroma a vegetales podridos.

Los tioles son considerados de efecto negativo en el aroma de varios alimentos, son extremadamente volátiles y con umbrales de detección en cerveza de 0.5 – 3.0 ppb (Vermeulen et al., 2005).

Dentro de los sulfuros más estudiados está el dimetilsulfuro (DMS), que se estima es benéfico en el aroma de la cerveza a ciertas concentraciones y dependiendo del tipo de cerveza. Su umbral de detección se reporta en 30 ppb (Gales, 2007; Meilgaard, 1981).

En la formación de sulfuros y tioles durante la fermentación, reposo y almacenamiento de la cerveza, se han propuesto varias rutas metabólicas, en donde los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) contenidos en las proteínas de la malta están involucrados (Laundaud et al., 2008).

Tioésteres. El tioéster mayormente identificado en cerveza es el S-metil-tioacetato (MetSAc) percibido como un reminiscente aroma a vegetales podridos (Matsui y Amaha, 1981) y coliflor cocida (Arfi et al., 2002). Su formación durante la fermentación del mosto se atribuye a la reacción de metanotiol y acetil CoA (Laundaud et al., 2008). El umbral de detección de MetSAc se estima en 50 ppb (Miracle et al., 2005).

Dióxido de azufre (SO₂). Es producido durante la fermentación por la levadura como un subproducto en la síntesis de aminoácidos. La concentración típica en cerveza terminada se encuentra en un rango de 0.5 a 10 ppm. El SO₂ es conocido en la industria de alimentos y bebidas como antioxidante.

Debido a que parte de la población es sensible al SO_2 , los niveles de éste en las bebidas es legalmente restringido a 10 ppm (Food and Drug Administration, 2010). En caso de que se exceda dicho nivel se debe declarar en la etiqueta del producto.

La concentración de SO_2 en la cerveza puede ser un importante indicador de la salud de la levadura; una pobre viabilidad y vitalidad de ésta pueden incrementar los niveles de SO_2 (Gales, 2007).

3.7 Rutas de formación de compuestos de azufre

Al tener su origen en una fermentación, es aceptado que ciertos CA (compuestos de azufre) forman parte normal del aroma de la cerveza, pero su contribución positiva depende de las concentraciones en las que éstos se encuentren en la cerveza y del balance con otros volátiles existentes en el líquido. Ligeros aumentos en los niveles de concentración de los CA, en el orden de partes por billón o trillón, crean notas aromáticas desagradables.

Los compuestos de azufre son formados a través de varias rutas que incluyen procesos enzimáticos y no enzimáticos. Entre los procesos enzimáticos se encuentra la bioquímica de la fermentación en la levadura y en los no enzimáticos están las reacciones químicas, fotoquímicas y térmicas ocurridas durante el almacenamiento (Rauhut, 2009). Los compuestos azufrados que son influenciados por el metabolismo de la levadura pueden generarse por dos rutas: 1) por la ruptura de compuestos orgánicos que contengan en su estructura azufre como aminoácidos y vitaminas o 2) por reacciones de

asimilación que integren el azufre inorgánico en nutrientes. (Boulton y Quain, 2003).

En la Figura 4 se muestran las rutas asimilación y reducción de sulfato como principales generadoras de sulfuro y su incorporación en la formación de aminoácidos azufrados. Según estudios realizados por Duan y Roddick (2004), existe una correlación entre el contenido de metionina, la cepa de levadura y el total de nitrógeno del mosto con respecto a la formación de H₂S.

El contenido de otros aminoácidos no azufrados también muestra efecto en la generación de CA. Se ha reportado que la presencia treonina y glutatión en el medio promueven la formación de H₂S, mientras que el contenido de serina, glutamina, aspartato y arginina lo inhiben (Vermeulen et al., 2005).

La regulación de metabolismo del azufre es compleja, ya que involucra inhibición por retroalimentación de actividad enzimática y represión de la expresión génica. Así se puede explicar que la presencia de S-adenosilmetionina reprima la transcripción de todas las enzimas involucradas en la introducción de sulfato y su reducción a sulfuro, y que la treonina favorezca la formación de sulfito debido a la inhibición por retroalimentación de la aspartoquinasa llevando a un bajo contenido de O-acetilhomoserina y por tanto una baja producción de metionina, lo cual libera la ruta de reducción de sulfato (Boulton y Quain, 2003).

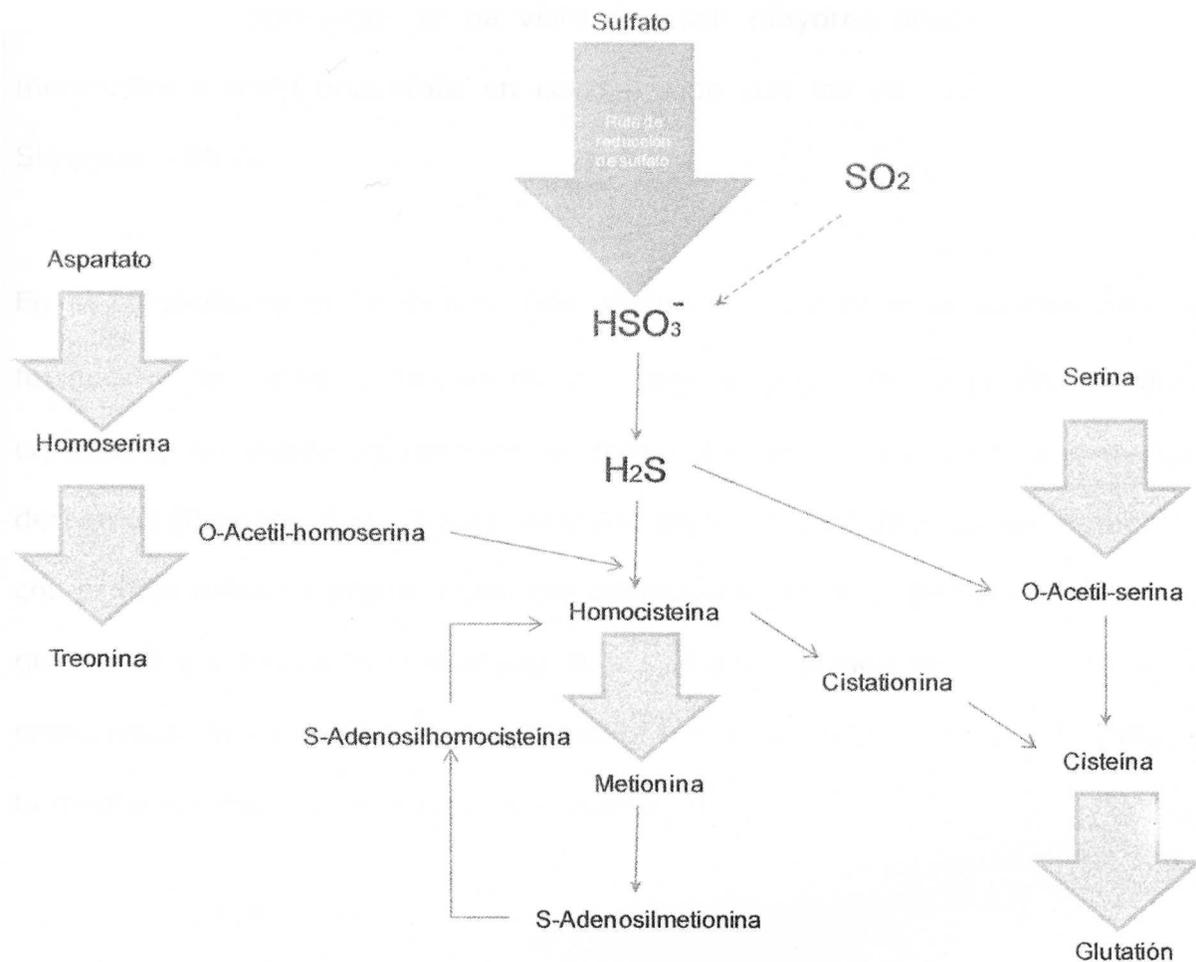


Figura 4. Rutas de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro y su incorporación en aminoácidos de acuerdo con Thomas y Surdin-Kerjan (1997), Vermeulen et al.,(2005) y Rauhut (2009).

Bajo ciertas condiciones, principalmente la insuficiencia o no disponibilidad de una fuente de nitrógeno, un exceso de sulfuro es liberado por la célula. Éste es convertido espontáneamente a ácido sulfhídrico como una consecuencia de las condiciones reductoras de una fermentación anaérobica a bajo pH (Linderholm et al., 2008).

Las levaduras tipo lager se ha visto que son mayores productoras de H₂S, metanotiol y metil-tioacetato en comparación con las de tipo ale (Walker y Simpson, 1993).

En el catabolismo de metionina (ver Figura 5) se aprecia la posible ruta de formación de tioles y tioésteres que siguen algunas cepas de levadura cervecera, en donde se propone la demetiolación de la metionina o de sus derivados (Perpéte et al., 2006) para una posterior esterificación de metanotiol con grupos Acil-CoA provenientes del catabolismo de otros aminoácidos, ácidos grasos libre y azúcares (Laundaud et al., 2008). También se han considerado como rutas de formación de metanotiol la reducción del dimetilsulfuro (DMS) y la metilación del H₂S (Van Haecht y Dufour, 1995).

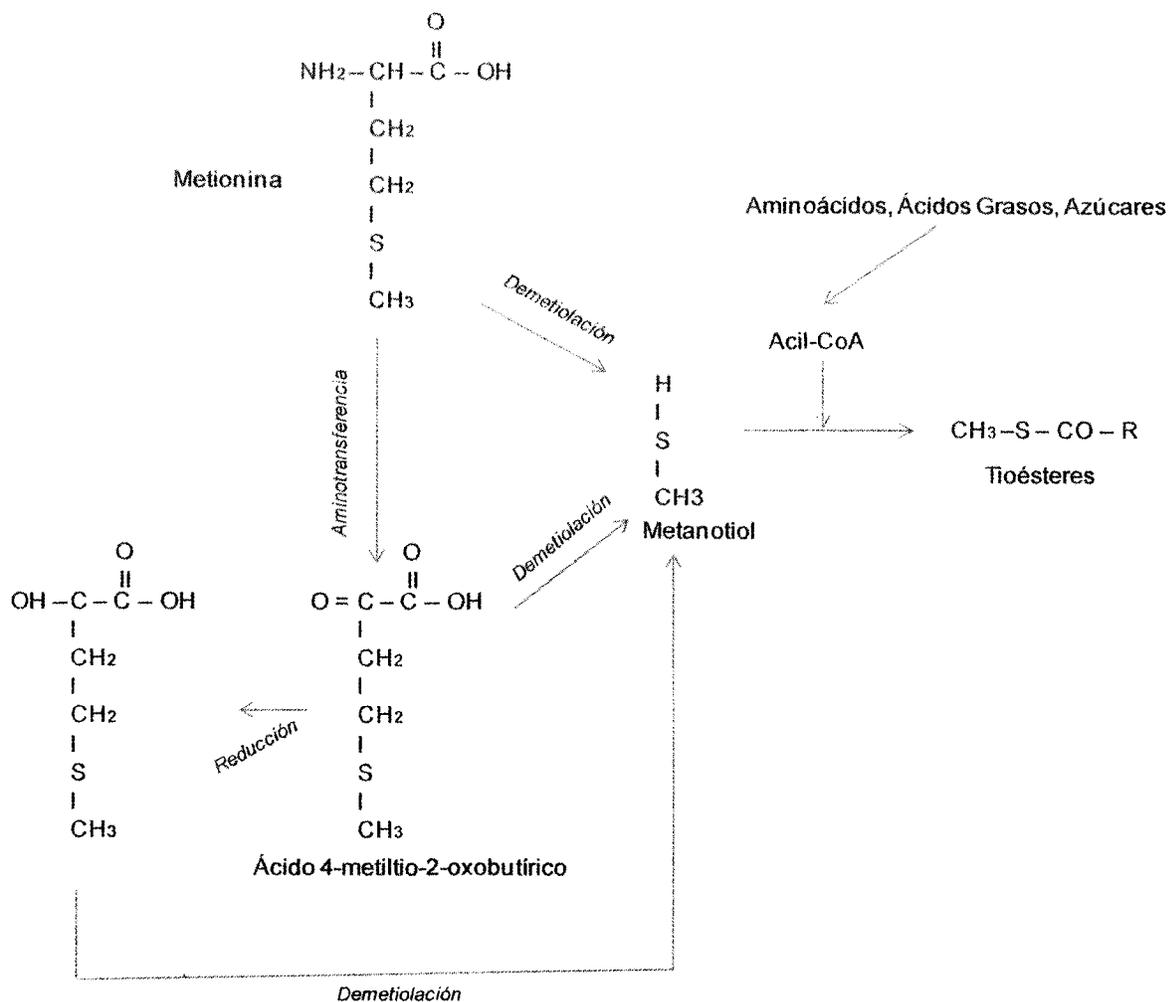


Figura 5. Posibles rutas de generación de metanotiol y su esterificación para formación de tioésteres de acuerdo con Laundaud et al., (2008), Walker y Simpson (1993) y Matsui y Amaha (1981).

3.8 Métodos de determinación de compuestos de azufre

3.8.1 Analíticos

Debido a su baja concentración (en ocasiones trazas) y su alta volatilidad, la medición de compuestos de azufre en cerveza ha sido un reto por varias décadas.

Numerosos han sido los intentos y la variedad de estrategias ensayadas, desde los años cuarenta con la medición espectrofotométrica con desarrollo de color por medio del complejo de p-rosanilina – formaldehído para determinación de dióxido de azufre (Grant, 1947), hasta la cromatografía de gases con detectores selectivos como SCD 355 Sulfur Chemiluminescence Detector (Burmeister et al., 1992) o PFPD Pulsed Flame Photometric Detector (Li et al., 2008).

Los resultados han sido diversos y su utilidad dependerá de la precisión que se requiera en las determinaciones y de la cantidad de compuestos que se pretenda analizar. Debido a la importancia de los compuestos de azufre en el sabor y aroma de la cerveza, y su posible impacto en generación de notas sensoriales indeseables, un eficiente método para la determinación de éstos compuestos es requerido.

Los métodos cromatográficos son los más adecuados para determinar compuestos de azufre en cerveza ya que permiten la separación de los componentes individuales.

Los análisis por cromatografía se pueden separar en tres grandes pasos: la preparación de la muestra (incluyendo muestreo) e inyección, separación y detección (Gales, 2007).

Para el caso de cerveza la preparación de muestra es mínima, sin embargo debido a que los compuestos que se pretende cuantificar son altamente volátiles y se encuentran en pocas cantidades, extremos cuidados deben tomarse durante el muestreo, para reducir las pérdidas por manejos inadecuados. Para muestras ya embotelladas o enlatadas habrá que mantenerlas a temperatura de refrigeración (4°C) y sin abrir hasta el momento del análisis. Para el caso de muestras de proceso habrá que colocarlas inmediatamente en hielo, con los recipientes cerrados y si es necesario remover sólidos, filtrar o centrifugar en refrigeración (Gales, 2007).

De las estrategias de muestreo más utilizadas están headspace y purga-trampa, también conocido como headspace dinámico. Ambas estrategias han dado resultados, dependiendo de los compuestos que sean de interés, ya que por medio de headspace solo se cuantifican los compuestos más volátiles mientras que purga-trampa puede también atrapar aquellos con menor volatilidad.

En ambos casos hay que ser muy cuidadoso con la reacciones de los analitos durante su manejo, ya que los compuestos de azufre reaccionan con facilidad entre ellos y con metales, por lo que cualquier contacto con superficies metálicas puede alterar los resultados. Se recomienda el uso de líneas de teflón o vidrio (Dercksen et al., 1996) o tratar las superficies y válvulas con Silcosteel o Sulfinert (marcas registradas de Restek Corporation) (Gales, 2007).

Para la separación eficiente de compuestos de azufre se han utilizado columnas capilares (Burmeister et al., 1992) y en algunos casos para lograr una resolución mayor se ha recurrido a combinación de columnas con diferente polaridad (Hill y Smith, 2000).

Aún cuando se cuente con un detector con alta sensibilidad para los compuestos de azufre, también se ha experimentado con accesorios para concentrar la muestra y poder cuantificar a niveles de traza, la microextracción en fase sólida (SPME) ha sido utilizada tanto para muestreo del líquido como para muestreo del headspace (Hill y Smith, 2000).

3.8.2 Sensoriales

Los métodos sensoriales de medición de cualquier compuesto aromático se basan en la habilidad de un grupo de catadores entrenados.

Debido a que los compuestos de azufre son altamente volátiles y pueden ser percibidos por el olfato humano a bajas concentraciones, no resulta extraño que muchos cerveceros sigan confiando en la nariz de catadores calificados para la evaluación de la cerveza (Carey y Grossman, 2006).

Los catadores pueden ser entrenados para identificar la presencia o ausencia de un aroma en particular (análisis cualitativo), para ordenar un grupo de muestras en base a la intensidad percibida de una nota aromática o para determinar la intensidad de un aroma o sabor en una escala cuantitativa (Meilgaard et al., 1999).

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar analítica y sensorialmente el efecto de variables de proceso (mosto, cepa y viabilidad de levadura) en la generación de compuestos de azufre en la producción de cerveza.

4.2 Objetivos específicos

- Elaborar mostos experimentales con diferencias significativas de nutrientes nitrogenados (aminoácidos y amino nitrógeno libres), en base a formulaciones factibles en la industria cervecera.
- Diseñar un experimento factorial, con niveles de evaluación, que generen tratamientos reales en la elaboración de cerveza.
- Cuantificar los compuestos de azufre para cada tratamiento del diseño experimental en F2D (segundo día de fermentación), FF (final de la fermentación) y R3D (tercer día de reposo), por cromatografía de gases con detector de quimiluminiscencia (GC-SCD).
- Determinar las variables de mayor impacto y sus interacciones en la generación de compuestos volátiles de azufre durante la fermentación.
- Ordenar por medio de un panel entrenado de catadores la intensidad percibida de compuestos aromáticos de azufre entre los tratamientos.
- Analizar la relación entre parámetros químico-analíticos y sensoriales.

- Determinar, del espectro de condiciones ensayadas, aquellas que resulten con mayores beneficios en el perfil sensorial respecto a compuestos azufrados.

5 Materiales y Métodos

5.1 Diseño experimental

En base a las condiciones de operación actuales en la industria cervecera, se diseñó un experimento factorial completo con dos niveles de 3 factores (mosto, cepa y viabilidad de levadura) dando por resultado 8 eventos los cuales fueron realizados por duplicado. En la Tabla 2 se observan los niveles de cada factor.

Tabla 2. Factores y niveles del diseño experimental

Factor	Nivel (-)	Nivel (+)
Cepa	820	790
Mosto	1	2
Viabilidad de levadura	Baja	Alta

Posteriormente, con el objetivo de evaluar directamente el efecto de cepa en una misma sesión sensorial se realizó un experimento factorial completo de dos factores (mosto y cepa), dando por resultado 4 eventos los cuales fueron realizados por duplicado. En este diseño la viabilidad de la levadura se mantuvo en el nivel bajo para todos los tratamientos.

5.2 Materiales

5.2.1 Mosto

Los mostos fueron elaborados con una concentración de 17°P, en proceso batch de 5 HI en la planta piloto de Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma (CCM). La estrategia para lograr diferente perfil de nutrientes nitrogenados

consistió en manejar diferentes formulaciones en términos de porcentajes de malta y adjuntos. El uso de adjuntos (maíz, arroz, entre otros) en la elaboración de mosto cervecero no aporta compuestos nitrogenados. Se trata de almidones de alta pureza y aroma neutro. Por tanto son una forma eficiente de modificar los compuestos nitrogenados, sin afectar el total de azúcares fermentables (O'Connor-Cox y Ingledew, 1989). Ver Tabla 3.

Tabla 3. Formulación de mostos cerveceros experimentales.

<i>Materias primas</i>	<i>Mosto 1</i>	<i>Mosto 2</i>
Adjuntos (%)	65.00	50.00
Malta (%)	35.00	50.00

5.2.2 Levadura

La levadura utilizada pertenece al género *Saccharomyces* tipo lager y se obtuvo de la planta propagadora de CCM (cepas 790 y 820). Ambas cepas fueron evaluadas entre la cuarta y quinta generación.

La viabilidad de la levadura se modificó variando el tiempo y la temperatura de almacenamiento de la levadura, desde su cosecha hasta la inoculación de los mostos experimentales.

Para obtener viabilidad baja la levadura se almacenó 18 horas a 18°C y para alta 4 horas a 4°C. Mediante la técnica de microcultivo (Método Yeast-6 ASBC, ver apéndice IV) se determinó el porcentaje de células con capacidad de reproducción para cada caso.

5.3 Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron en probetas de 2 L (ver Figura 6) con los mostos experimentales de 17 °P previamente descritos en la sección 5.2.1. El mosto se oxigenó a una concentración de 1 ppm por grado plato y se inoculó con levadura a razón de 1.2×10^6 cel/mL por grado plato. Durante las primeras 24 horas de fermentación la temperatura se mantuvo a $11 \pm 1^\circ\text{C}$, posteriormente se permitió libre ascenso hasta $16 \pm 1^\circ\text{C}$ manteniendo esta temperatura hasta completar los siete días de fermentación.

Concluida la fermentación la levadura se colectó por decantación del producto y éste último fue reposado a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ por tres días.

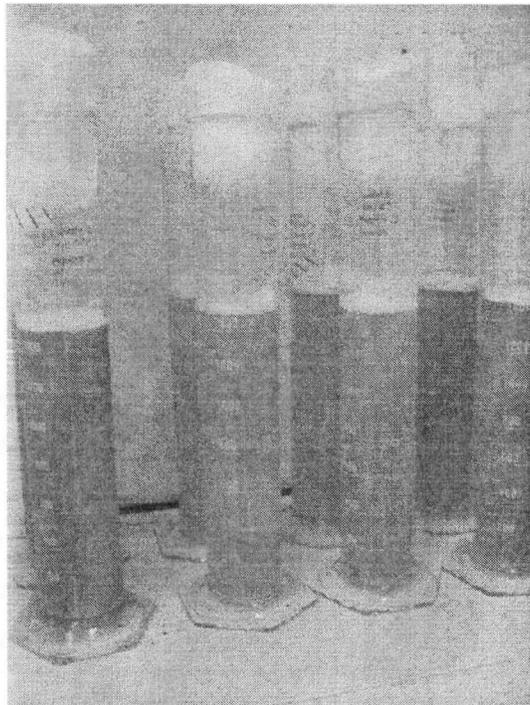


Figura 6. Condiciones experimentales de fermentación en probetas de 2 L, dentro de una incubadora de temperatura controlada.

5.4 Muestreo y frecuencias

5.4.1 Mostos

Para la determinación de amino nitrógeno libre, carbohidratos y aminoácidos libres, los mostos experimentales se muestrearon como mosto frío en condiciones de esterilidad.

5.4.2 Fermentaciones

En el caso de las fermentaciones todos los muestreos se realizaron por decantación del producto en campana de flujo laminar para mantener condiciones de esterilidad, la frecuencia de muestreo se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros evaluados y frecuencias de muestreo durante la fermentación y reposo. Segundo día de fermentación (F2D), tercer día de fermentación (F3D), final de fermentación, séptimo día (FF) y tercer día de reposo (R3D).

<i>Parámetro</i>	<i>F2D</i>	<i>F3D</i>	<i>FF</i>	<i>R3D</i>
Compuestos volátiles de azufre	√		√	√
Compuestos volátiles frutales			√	
% Alcohol			√	
Extracto Aparente			√	
Diacetilo			√	
Aminoácidos libres			√	
Células en suspensión		√	√	
Análisis Sensorial			√	√

Para todas las determinaciones químico-analíticas, las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su análisis. En el caso de Análisis Sensorial y la determinación de células en suspensión las muestras fueron analizadas el mismo día de muestreo.

5.5 Métodos de análisis

5.5.1 Amino nitrógeno libre (FAN)

Para la determinación del contenido de FAN en los mostos, se empleó el protocolo internacional descrito en los métodos de análisis Wort-12 de la ASBC (American Society of Brewing Chemists, 1992). Este método determina aminoácidos, amoníaco y en algún grado α -amino nitrógeno en grupos terminales de péptidos y proteínas. La prolina no es cuantificada en ningún grado a la longitud de onda usada. La metodología se describe en el Apéndice I.

5.5.2 Aminoácidos libres

Los aminoácidos libres del mosto y de final de fermentación se determinaron por el método AccQ Tag Waters, el cual consiste en una técnica de derivatización usando reactivo AccQ Flour (6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamato, AQC), separación de derivados por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) fase reversa y cuantificación por detector de fluorescencia.

El reactivo AccQ Flour convierte los aminoácidos en derivados estables y fluorescentes a 395 nm (Waters AccQ Tag Chemistry Package Instruction Manual, 1993). Los detalles de la técnica se incluyen en el Apéndice II.

5.5.3 Carbohidratos

Los carbohidratos de los mostos experimentales fueron determinados por cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés), metodología adaptada del método internacional descrito en Wort-14 de los Métodos de Análisis de la American Society of Brewing Chemists (Methods of Analysis ASBC, 1992), la técnica completa se incluye en el Apéndice III.

5.5.4 Viabilidad de Levadura

La viabilidad de la cepa de levadura se determinó por la técnica de microcultivo del procedimiento Yeast-6 de los Métodos de Análisis de la American Society of Brewing Chemists (Methods of Analysis ASBC, 1992). Esta técnica determina la cantidad de células viables, evaluando la habilidad de reproducción de la levadura, la descripción de la metodología se encuentra en el Apéndice IV.

5.5.5 Compuestos de Azufre

La determinación de compuestos de azufre se realizó por el método cromatográfico de headspace con detector de quimiluminiscencia para compuestos azufrados (SCD, por sus siglas en inglés). La metodología consiste en una adecuación de lo propuesto por Burmeister et al. (1992) y Métodos de Análisis de American Society of Brewing Chemists (Methods of Analysis ASBC, 1992). En el Apéndice V se describe la técnica a detalle.

5.5.6 Análisis Sensorial

El análisis sensorial se realizó con un panel de 8 catadores entrenados en la detección de compuestos de azufre. Por medio de una prueba de ordenamiento de intensidad percibida, los catadores otorgaron la primera posición a la muestra que percibieran con mayor intensidad de compuestos de azufre, la segunda a la siguiente y así sucesivamente (Meilgaard et al., 1999).

Se evaluaron 3 lotes de 4 muestras. Un primer lote para la cepa 790, el segundo para cepa 820 y el tercero resultado del segundo experimento en donde se evaluaron las cepas y los mostos dejando constante la vitalidad de levadura.

En todos los casos la prueba sensorial se realizó por duplicado. El servido se apegó a las buenas prácticas sensoriales de orden de presentación aleatorio con identificación de vasos usando números aleatorios de tres dígitos (Pedrero y Pangborn, 1989).

5.5.7 Parámetros Fermentativos

Existen parámetros que de forma habitual se monitorean en una fermentación cervecera (conteo de células en suspensión, diacetilo, porcentaje alcohol, extracto aparente, ésteres y alcoholes de fusel) por lo que se consideró importante determinarlos para asegurar el buen desempeño de las fermentaciones, las técnicas utilizadas se detallan en el Apéndice VI.

5.5.8 Control Microbiológico

Al final de la fermentación, cada tratamiento fue analizado en los medios DUBA y MRS (Methods of Analysis ASBC, 1992) para asegurarnos que las fermentaciones se llevaron a cabo libre de contaminación microbiológica, ya que la presencia de bacterias ajenas puede causar interferencia en la generación de los compuestos aromáticos propios de la fermentación.

5.5.9 Análisis Estadísticos

Para determinar diferencias significativas entre los mostos se realizó una prueba t-Student para cada aminoácido y se aplicó el método para múltiples pruebas de Benjamin-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995).

Los resultados químico analíticos de compuestos de azufre y volátiles provenientes del diseño factorial 2^3 y 2^2 fueron analizados usando el software Minitab™ versión 14.

Los resultados de las pruebas sensoriales de ordenamiento y su relación con los resultados químico analíticos se analizaron por medio del paquete BradleyTerry2 versión 0.9-1 y qvcalc versión 2.10.0 para la implementación del modelo de Mallows-Bradley-Terry (MBT) en el programa estadístico R versión 2.10.0 (Firth, 2005).

El modelo Bradley Terry (BT) calcula habilidades para construir probabilidades de ganar en una competencia de pares. Mallows extendió el modelo para

incluir rankings (Critchlow y Fligner, 1991), conformando el modelo MBT. En el modelo MBT se propone descomponer el ranking en comparaciones por pares y se asume que cada comparación es independiente. En base a las habilidades estimadas, es posible determinar un ranking verdadero. El modelo MBT, como un modelo lineal generalizado puede utilizarse para analizar un diseño factorial y una relación lineal entre covariables específicas.

6 Resultados y Discusión

6.1 Nutrientes del mosto

Los mostos experimentales fueron analizados para determinar sus niveles de nutrientes nitrogenados (FAN y aminoácidos libres) y algunos otros análisis de rutina. Para los parámetros de interés en esta investigación los análisis se realizaron por duplicado. Se encontraron diferencias significativas de FAN y aminoácidos libres totales, como se puede ver en la Tablas 5 y 6.

El resto de los parámetros cumplió con los niveles típicos, para llevar a cabo una fermentación cervecera.

Tabla 5. Resultados analíticos generales de los mostos experimentales.

<i>Parámetro</i>	<i>Mosto 1</i>	<i>Mosto 2</i>
Unidades de amargo	15	16
Color (°SRM)	2.5	4.3
FAN (mg/L)*	150 ± 2.8	204 ± 7.07
Zinc (mg/L)	0.93	1.02
Calcio (mg/L)	47.72	42.42
Sulfato como SO ₄ (mg/L)	18.04	18.96
Maltosa (%)	9.30	9.45
Glucosa (%)	0.95	1.40
Fructosa (%)	0.16	0.22
Maltotriosa (%)	2.45	2.57

*valor $p \leq 0.05$

Tabla 6. Perfil de aminoácidos de mostos experimentales.

<i>Aminoácidos</i>	<i>Mosto 1 (mg/mL)</i>	<i>Mosto 2 (mg/mL)</i>	<i>Valor p*</i>
Aspártico	0.85 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.0332
Serina	0.29 ± 0.08	3.50 ± 0.07	0.0007
Glutámico	5.04 ± 0.38	0.78 ± 0.15	0.0212
Glicina	1.20 ± 0.01	1.38 ± 0.01	0.0061
Histidina	4.70 ± 0.54	5.45 ± 0.63	0.3328
Arginina	4.25 ± 0.08	4.18 ± 0.08	0.4547
Treonina	4.01 ± 0.06	7.63 ± 0.01	0.0054
Alanina	20.34 ± 1.11	29.18 ± 2.89	0.1106
Prolina	38.45 ± 1.04	44.45 ± 1.77	0.0726
Tirosina	19.84 ± 1.20	32.39 ± 4.22	0.1273
Valina	22.15 ± 0.38	31.69 ± 0.45	0.0021
Metionina	7.12 ± 0.56	9.81 ± 0.69	0.0545
Lisina	4.57 ± 0.02	4.34 ± 0.31	0.4923
Isoleucina	17.70 ± 0.15	25.92 ± 1.29	0.0675
Leucina	41.38 ± 3.24	59.91 ± 2.96	0.0274
Fenilalanina	37.76 ± 3.52	57.96 ± 3.54	0.0292
Total	229.65 ± 0.03	319.16 ± 9.04	0.0454

*Valor obtenido de la prueba t-Student por aminoácido.

El FAN es considerado una medición general para determinar el nitrógeno disponible para la levadura. Debido a que se trata de un análisis sencillo se recurre a él frecuentemente. Sin embargo debe tomarse con precaución ya que los niveles de FAN no definen las cantidades individuales de aminoácidos del mosto, lo cual afecta la fermentación y el sabor de la cerveza (Carey y Grossman, 2006). Se ha reportado que niveles de mínimo 100 mg/L de FAN en el mosto, son necesarios para mantener saludable a la levadura y lograr velocidades de fermentación típicas (O'Connor-Cox y Ingledew, 1989). Sin embargo estudios realizados por Cañamar, (2007) demuestran que para mostos de 17°P, se requieren niveles mayores a 131 mg/L de FAN. Concentraciones iguales o menores a dicho nivel generan un incremento en la

producción de dicetonas vecinales. Una dicetona vecinal, es el diacetilo. Su típico aroma a mantequilla causa afectaciones en el aroma y sabor de la cerveza (Meilgaard, 1981).

Los niveles de FAN logrados en los mostos experimentales se ubican en rangos adecuados para cumplir con los parámetros básicos de la fermentación. También se confirmó que diferencias en los perfiles de aminoácidos no presentan efecto en la fermentabilidad de los mostos, lo cual es consistente con reportes de otros autores (Edney y Langrell, 2005). Los valores obtenidos de extracto aparente en este estudio oscilaron entre 4.2 y 4.5 % en peso sin diferencia significativa entre tratamientos. Por tanto la atenuación de extracto para generación de alcohol no sufrió cambios debido al mosto. Por dicha razón, evaluar el desempeño de la fermentación únicamente en abatimiento de °P no es suficiente para explicar cambios de perfiles de sabor (Bamforth, 2003).

Para aminoácidos libres, la prueba t-Student resultó significativa al 95 % de confianza, para la mitad de los aminoácidos evaluados y para el contenido total (ver Tabla 6). Para determinar diferencias en los porcentajes de cada aminoácido con respecto al total, se aplicó la prueba de Benjamini-Hochberg, con el objetivo de minimizar los falsos positivos entre los positivos detectados (Urrea, 2009). De esta manera los aminoácidos con diferencia estadísticamente significativa entre los mostos fueron: arginina, ácido aspártico, glicina, ácido glutámico, serina y treonina, ver Figura 7.

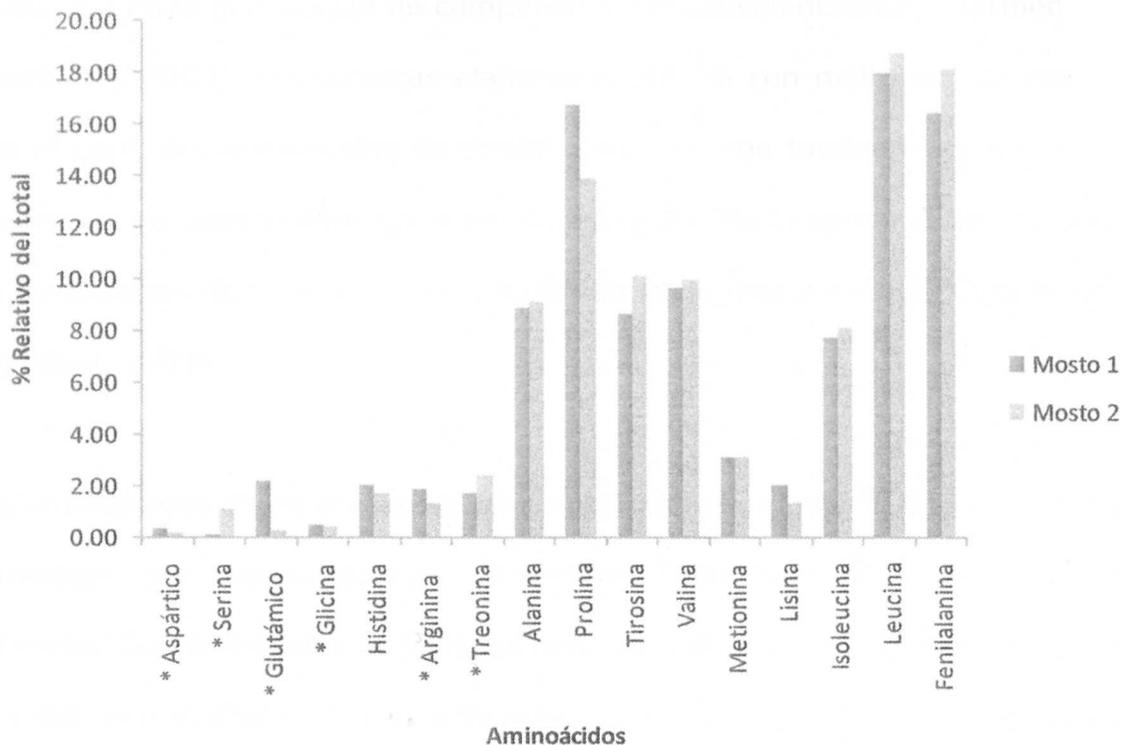


Figura 7. Comparación de perfil de aminoácidos libres de mostos experimentales, expresados como porcentajes del total. Los aminoácidos con asterisco (*) son los que presentan diferencias significativas entre los mostos de acuerdo a la prueba de Benjamini-Hochberg, $\alpha = 0.05$.

Los aminoácidos de interés, en la ruta de compuestos azufrados, que resultaron con diferencia significativa en ambas pruebas (t-Student y Benjamini-Hochberg) fueron ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina y treonina.

En esta investigación, la estrategia utilizada para la generación de mostos diferenciados en nivel de nutrientes nitrogenados implicó el uso de adjuntos y la reducción de porcentaje de malta en la formulación. Esto generó una perturbación en el balance de aminoácidos. Por tanto, se puede esperar una

afectación en la generación de compuestos aromáticos durante la fermentación (Bamforth, 2003). En cervezas elaboradas 100 % con malta se ha reportado que el perfil de aminoácidos es similar. Sin embargo también se ha visto que los niveles de aminoácidos en el mosto dependen de la variedad de cebada, de las condiciones de malteo y de los parámetros de maceración (O'Connor-Cox y Ingledew, 1989).

Los aminoácidos libres presentes en el mosto son la mayor fuente de nitrógeno asimilable por las levaduras cerveceras (Patterson e Ingledew, 1999; O'Connor-Cox e Ingledew, 1989). El perfil de éstos y sus rutas de asimilación han sido estudiados en varios experimentos (Perpète et al., 2005). En general pueden referirse cuatro grupos de asimilación. Los aminoácidos correspondientes al grupo A se absorben de manera inmediata y son casi totalmente consumidos, mientras que los del grupo D son absorbidos muy ligeramente. Sin embargo se ha visto que esos cuatro grupos pueden tener cambios atribuidos a cepa, condiciones de fermentación y manejo de la levadura previo a la inoculación (Gibson et al., 2009). Por ejemplo serina y treonina son consistentemente considerados en el grupo A, pero la metionina algunos la ubican en el grupo A y otros en el grupo B (Perpète et al., 2005).

La evaluación de aminoácidos libres al final de la fermentación demostró que los aminoácidos de los grupos A y B son prácticamente agotados por la levadura; reportándose valores traza o no detectables (datos no mostrados), para todos los tratamientos. Los aminoácidos con mayor cantidad residual al

final de la fermentación fueron alanina y tirosina (ambos del grupo C) y prolina (grupo D).

Se ha documentado que el enriquecimiento del mosto con aminoácidos específicos puede alterar la formación de compuestos azufrados. Se han encontrado resultados diversos y en ocasiones contradictorios. Generalmente el exceso de cisteína incrementa la producción de H₂S (Vermeulen et al., 2005). En algunas cepas la adición de metionina disminuye la generación de H₂S, pero en otras la aumenta (Duan y Roddick, 2004). Los aminoácidos que no contienen azufre en su estructura, pero que forman parte de la ruta metabólica de aminoácidos azufrados como serina y treonina, influyen en los niveles de H₂S. La serina es considerada una buena fuente de nitrógeno y por ser precursor de metionina contribuye a la inhibición de la ruta de reducción de sulfato (Vermeulen et al., 2005). La treonina participa en la disminución de homoserina por medio de la represión por retroalimentación de la aspartoquinasa lo cual libera la ruta de formación de metionina y por ende el aumento de H₂S (Vermeulen et al., 2005; Boulton y Quain, 2003).

Serina y treonina, son aminoácidos con efecto en la generación de compuestos de azufre, que resultaron con diferencias estadísticamente significativas, entre los mostos experimentales. El mosto 2 presentó mayor concentración de ambos. Estudios previos (Vermeulen et al., 2005) indican que la serina reduce la generación de H₂S, mientras la treonina tiende a favorecer su aumento (Vermeulen et al., 2005; Boulton y Quain, 2003). La diferencia de serina entre

los mostos, es proporcionalmente mayor con respecto a la diferencia de treonina. Lo cual puede explicar el efecto favorable de la serina, en la disminución de compuestos azufrados, que se detallará en la sección 6.2 (Evaluación químico-analítica). Los estudios realizados con mostos enriquecidos (Duan y Roddick, 2004) elevan la cantidad de aminoácidos a concentraciones prácticamente imposibles de lograr de manera natural, lo cual complica la generación de conclusiones contundentes sobre las concentraciones individuales de aminoácidos libres necesarias para optimizar el resultado aromático de una fermentación.

6.2 Evaluación químico analítica

En la determinación de compuestos de azufre se lograron cuantificar cuatro compuestos: ácidos sulfhídrico (H_2S), metanotiol (CH_3SH), dimetilsulfuro (DMS) y metil tioacetato (MetSAc). En las diferentes etapas evaluadas y tratamientos, solamente se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de H_2S y MetSAc. En las Figuras 8 y 9 se aprecia la producción de H_2S y MetSAc. Ambas cepas para todos los tratamientos, en las tres etapas de proceso evaluadas: segundo día de fermentación (F2D), final de fermentación (FF) y tercer día de reposo (R3D).

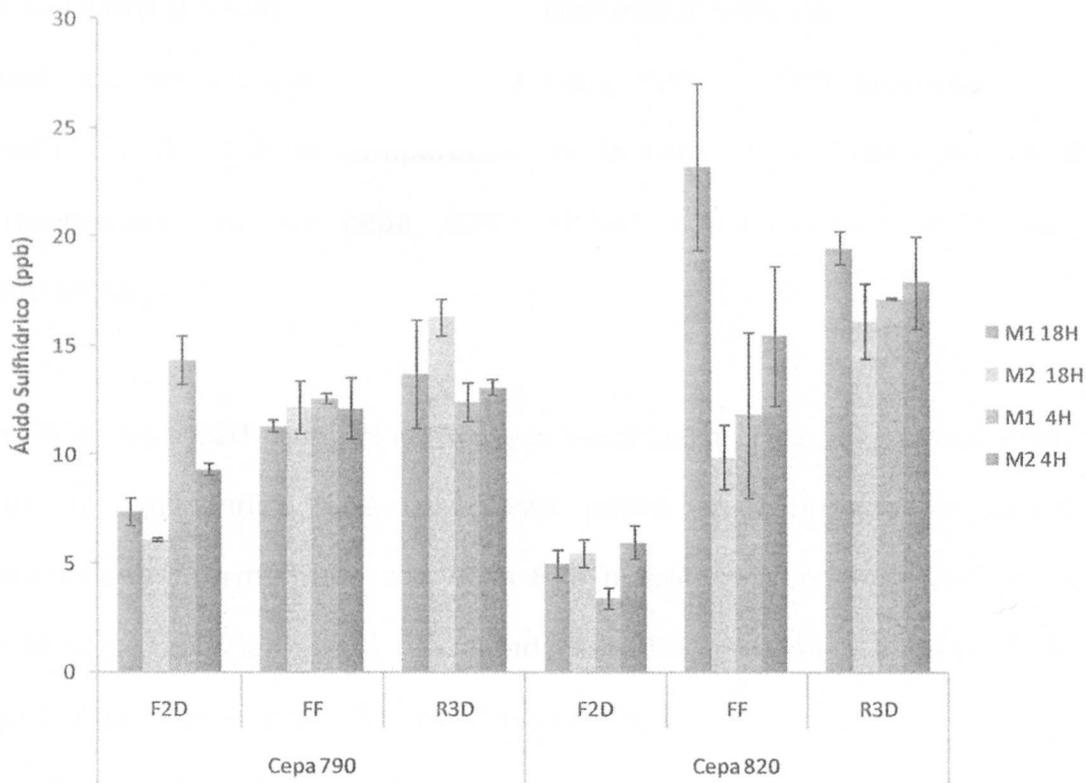


Figura 8. Concentración de ácido sulfhídrico medido en F2D, FF y R3D para ambas cepas todos los tratamientos: M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C – 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C – 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C – 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C – 4 horas).

Al analizar los datos como un análisis factorial 2^3 para la variable de salida H_2S , se observó que los tres factores principales evaluados, y las interacciones donde se involucra la cepa, presentaron efecto significativo en F2D. Para el caso de FF, el factor principal de cepa, resultó significativo además de dos interacciones. En R3D solamente se aprecia a la cepa como factor con efecto significativo (ver en Tabla 7 valores-p obtenidos). Se ha reportado que algunas cepas son constantemente mayores productoras de sulfuros con respecto a otras (Rauhut, 2009; Walker y Simpson, 1993; Owades y Plam, 1988).

En la Figura 8 se puede observar las concentraciones de H₂S para cada cepa y cada uno de los tratamientos. La cepa 820 en F2D presenta una pobre producción de H₂S en comparación de la cepa 790. Finalmente, en R3D la fermentación con la cepa 820 exhibe mayor concentración de dicho compuesto.

En FF la cepa 820 aparece con mayor cantidad de H₂S para el tratamiento M1 18H, lo cual indica que un mosto pobre en contenido de compuestos nitrogenados, fermentado con cepa 820 nos lleva a concentraciones mayores de H₂S. Lo anterior se ve respaldado estadísticamente por los p-valores del factor cepa y la interacción cepa*mosto*viabilidad. De acuerdo a lo reportado por Rauhut, (2009) y Linderholm, et al. (2008), bajo ciertas condiciones, especialmente la insuficiente cantidad de fuentes de nitrógeno, se genera un exceso de sulfito el cual es liberado y convertido espontáneamente a sulfuro debido a las condiciones reductoras de una fermentación a bajo pH. Adicionalmente, la formación de H₂S se relaciona con el metabolismo de azufre y nitrógeno de la levadura. Cuando suficiente nitrógeno está presente en el mosto, los precursores de metionina y cisteína (*O*-acetil serina y *O*-acetil homoserina) estarán disponibles para secuestrar el ion HS⁻. Si el nitrógeno es limitado, insuficientes precursores están disponibles y el H₂S libre se acumula en la célula y se libera al medio (Laundaud et al., 2008).

Tabla 7. Valor-p para los efectos principales e interacciones para H₂S y MetSAc.

<i>Factor</i>	Ácido sulfhídrico (H₂S)			Metil tioacetato (MetSAc)		
	F2D	FF	R3D	F2D	FF	R3D
Mosto	0.040	0.086	0.814	0.026	<0.001	<0.001
Viabilidad	<0.001	0.361	0.113	0.241	0.695	0.040
Cepa	<0.001	0.033	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mosto*Viabilidad	0.257	0.011	0.470	0.108	0.695	0.856
Mosto*Cepa	<0.001	0.066	0.069	0.002	0.011	0.009
Viabilidad*Cepa	<0.001	0.179	0.192	0.392	0.518	0.049
Mosto*Viabilidad*Cepa	0.002	0.005	0.061	0.185	0.574	0.129
R ²	97.92	84.58	84.80	95.90	98.34	99.18

Valores ≤ 0.05 son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

El efecto de cepa en la producción de H₂S, fue el de mayor impacto, debido a que presentó valores significativos en las tres etapas evaluadas (F2D, F7D y R3D), lo anterior se respalda con los estudios de expresión génica realizados a la levadura en un estudio paralelo a esta investigación. Se demostró una diferencia significativa entre cepas, en los niveles de expresión de varios genes involucrados en la ruta de asimilación del sulfato (Leal, 2010).

La cepa 790 cuando fermenta con Mosto 1 mostró mayor expresión del gen MET4, el cual regula a nivel transcripcional la maquinaria de asimilación de sulfato. Los genes que se sobre expresaron en la ruta fueron aquellos que se encuentran posterior a la generación del sulfuro (MET25, MET13, MET6 y MHT1) y MET2 que participa en la formación de O-acetil- homoserina (ver

Figura 9) prerequisite for formation of homocysteine (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997).

Lo anterior sugiere que dicha cepa, se adapta con facilidad a los niveles de nutrientes del mosto. Activa su maquinaria genética para generar enzimas que contribuyan a la incorporación de esqueletos carbonados, capaces de absorber el sulfuro, de tal manera que éste no se acumule en el medio (Leal, 2010).

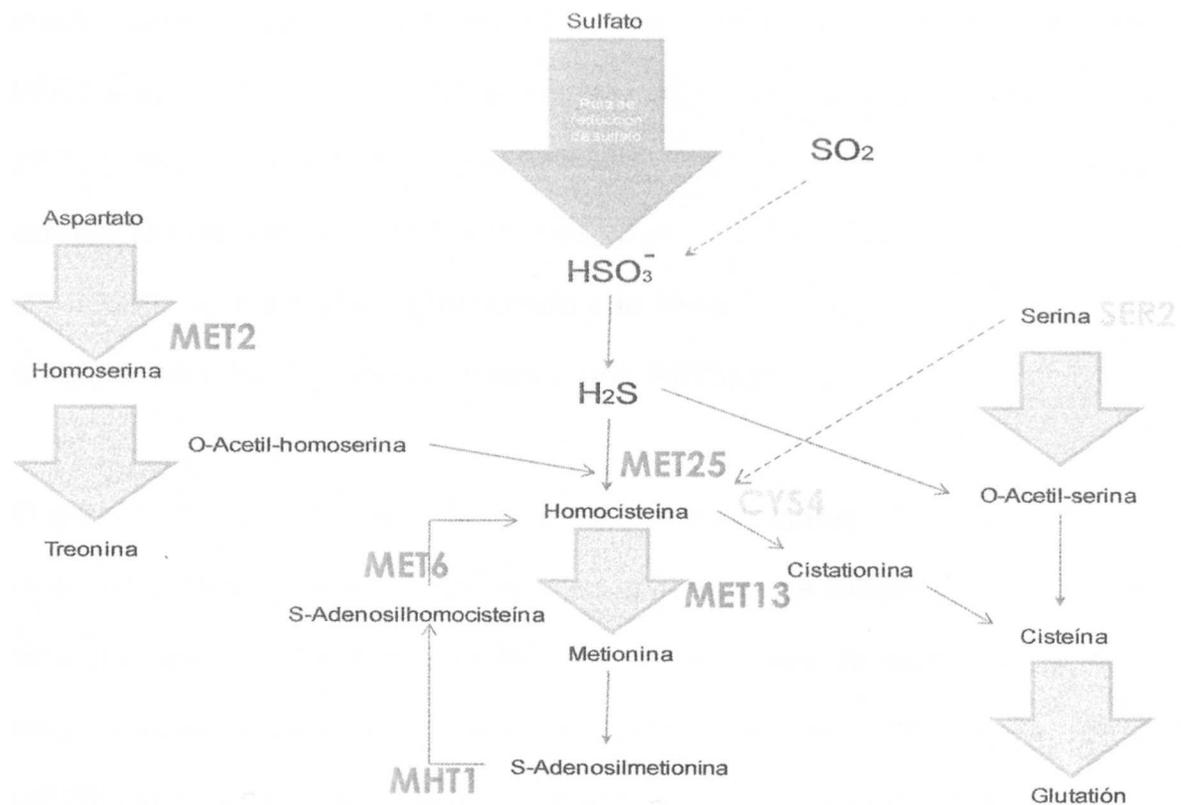


Figura 9. Esquema con incorporación de los genes con diferencias de expresión, según estudio de Leal (2010). Rutas de asimilación de sulfato, reducción a sulfito y sulfuro y su incorporación en aminoácidos de acuerdo con Thomas y Surdin-Kerjan (1997), Vermeulen et al.,(2005) y Rauhut (2009).

La cepa 820 en el tercer día de fermentación introduce en mayor cantidad sulfato a la ruta debido a la sobreexpresión del gen MET3, el cual genera la enzima que cataliza el primer paso para la activación del sulfato intracelular. A

diferencia de la cepa 790, no es capaz de sobre expresar genes que eviten la acumulación de H₂S (Leal, 2010)

Adicional al efecto de cepa; Leal, (2010) reportó una interacción cepa*mosto en la expresión de algunos genes. La cepa 820 fermentando con Mosto 2 mostró una expresión mayor de los genes SER2 y CYS4 (ver Figura 9), ambos involucrados en la ruta para formación de cisteína (Linderholm et al., 2008), MHT1 responsable de la remetilación en el equilibrio de S-adenosil metionina y MET31 involucrado en la regulación transcripcional de genes de la ruta de asimilación de sulfato (MET3 y MET14) y permeasas de metionina (Blaiseau et al., 1997). La cepa 790 fermentando con Mosto 1 expresa en mayor cantidad SER2, CYS4 y MET32 (misma función que MET31).

El gen CYS4 codifica para la enzima cistationina B sintasa y se ha sugerido que la serina actúa como un controlador en la síntesis de S-adenosil metionina; de esta manera, la diferencia significativa de contenido de serina en el Mosto 2 muy probablemente promueve la activación de CYS4 para producir cistationina, algunos autores han mencionado que la sobre expresión de CYS4 disminuye el contenido de H₂S en la fermentación de cepas cerveceras (Linderholm et al., 2008).

En estudios anteriores, realizados con la cepa de levadura 820, se demostró que en condiciones de estrés por restricción calórica, dicha cepa expresa en mayor cantidad genes involucrados en la generación de compuestos de azufre

(Damas, 2008). Queda de manifiesto que las variables cepa y mosto resultan de alto impacto en la expresión génica para la regulación en el metabolismo de azufre (Boulton y Quain, 2003).

Para el caso de MetSAc, en F2D los factores principales de mosto y cepa, además de la interacción Mosto*Cepa resultan significativos. Esto se mantiene para FF. Finalmente en R3D los factores altamente significativos son mosto y cepa, aunque se observa un valor con efecto significativo en la vitalidad y en la interacciones de Mosto*Cepa y Vitalidad*Cepa (ver Tabla 7 para los valores-p obtenidos).

En la Figura 10 se observa claramente que los tratamientos con Mosto 1 generaron mayor cantidad de MetSAc para ambas cepas, y la cepa 820 es evidentemente la mayor productora.

Según estudios de Walker y Simpson (1993), las cepas tipo lager son significativamente mayores productoras de H_2S , CH_3SH y MetSAc en comparación con las tipo ale, adicionalmente se cuenta con la teoría respecto a la producción en tándem de los tres compuestos mencionados (Casey, 2007).

El CH_3SH requerido para la formación de MetSAc puede generarse directamente de la metilación de H_2S , por la reducción de DMS (Van Haecht y Dufour, 1995), o por la ruta catabólica de metionina en donde puede ocurrir una demetilación directamente de metionina, o de los compuestos derivados como el ácido 4-metiltio-2-oxibutírico (Laundaud et al., 2008; Perpéte et al., 2006).

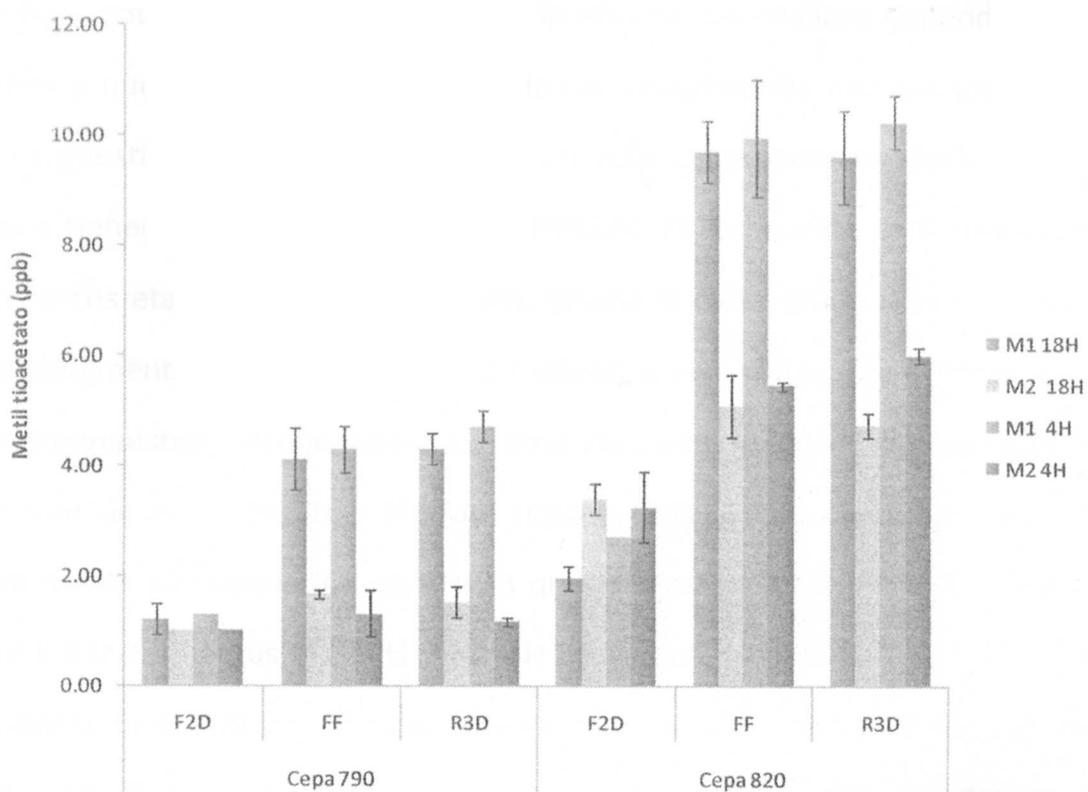


Figura 10. Concentración de metil-tioacetato medido a F2D, FF y R3D para ambas cepas, todos los tratamientos: M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C – 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C – 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C – 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C – 4 horas).

Se ha demostrado que el MetSAc se sintetiza durante la fermentación por acción de la levadura (Walker y Simpson, 1993), y al ser químicamente un tioéster, se presume que proviene de una reacción enzimática entre un tiol, como el CH_3SH , con acetil CoA. Dicha reacción ocurre como un mecanismo de defensa hacia la toxicidad de los tioles, que afecta la viabilidad de la levadura (Matsui y Amaha, 1981).

Algunos grupos de investigación han realizado esfuerzos por identificar específicamente el gen responsable de la demetilación, por medio de la clonación de varios genes mutantes y putativos, desafortunadamente sin éxito.

Se ha propuesto que la formación de la enzima demetilolasa depende de varios genes y que quizás la construcción de cepas con varias mutaciones pueda dar la respuesta (Perpéte et al., 2006). En este caso podemos decir que ambas cepas tienen la habilidad de producir MetSAc. El compuesto es detectado en las diferentes etapas de la fermentación, siendo la cepa 820 la mayor productora, principalmente en los tratamientos realizados con el mosto de menor cantidad de compuestos nitrogenados. Lo cual respalda la teoría de producción en tándem de H₂S, CH₃SH y MetSAc (Casey, 2007). Sin embargo, debe existir otra fuente de producción de CH₃SH que promueva la formación de MetSAc ya que los tratamientos M1 18H y M1 4H presentan cantidades significativamente diferentes de H₂S en FF. Los niveles de MetSAc prácticamente son iguales tanto en FF como en R3D, lo cual nos lleva a pensar que el catabolismo de metionina es una ruta que contribuye a la formación de CH₃SH debido al requerimiento de ácido α -cetobutírico, el cual es un importante esqueleto de carbono para producción de otros aminoácidos (Laundaud et al., 2008). Adicionalmente, debido a que la demetilación es altamente dependiente de cepa (Perpéte et al., 2006) se presume que la cepa 820 expresa en mayor proporción los genes responsables de dicha reacción.

El CH₃SH fue evaluado en F2D, FF y R3D manteniendo valores entre 0.9 y 1.2 ppb sin diferencia significativa entre los tratamientos. Aparentemente el contenido de este compuesto en el líquido es constante. Sin embargo, dichos valores también podrían explicarse por la alta volatilidad del compuesto, que resulta arrastrado fácilmente por el CO₂, además de ser consumido en la

reacción enzimática de esterificación para formar MetSAc (Walker y Simpson, 1993).

Similarmente Miracle, et al (2005), reporta concentraciones de CH₃SH entre 0.5 – 1.0 ppb al evaluar fermentaciones cada 24 horas hasta el séptimo día de proceso, mientras que el MetSAc comienza como no detectable y va aumentando durante el proceso.

Para el caso del experimento factorial 2², la medición de H₂S y MetSAc se realizó al final de la fermentación y al tercer día de reposo. Esto corresponde también a la frecuencia de las evaluaciones sensoriales. En la Figura 11 se observa el comportamiento para ambas cepas. Para el caso de H₂S las diferencias no son evidentes aunque si existen algunos factores estadísticamente significativos (ver Tabla 8). Sin embargo para el caso de MetSAc los factores de mayor impacto se confirman como el mosto y la cepa con valores-p altamente significativos.

Tabla 8. Valor-p para efectos principales e interacciones de experimento 2², para H₂S y MetSAc al FF y R3D.

<i>Factor</i>	Ácido Sulhídrico (H₂S)		Metil tioacetato	
	FF	R3D	FF	R3D
Cepa	0.032	0.094	0.002	<0.001
Mosto	0.395	0.046	0.003	<0.001
Mosto*Cepa	0.023	0.307	0.900	0.001
R ²	93.28	86.43	98.84	99.87

Valores ≤ 0.05 son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

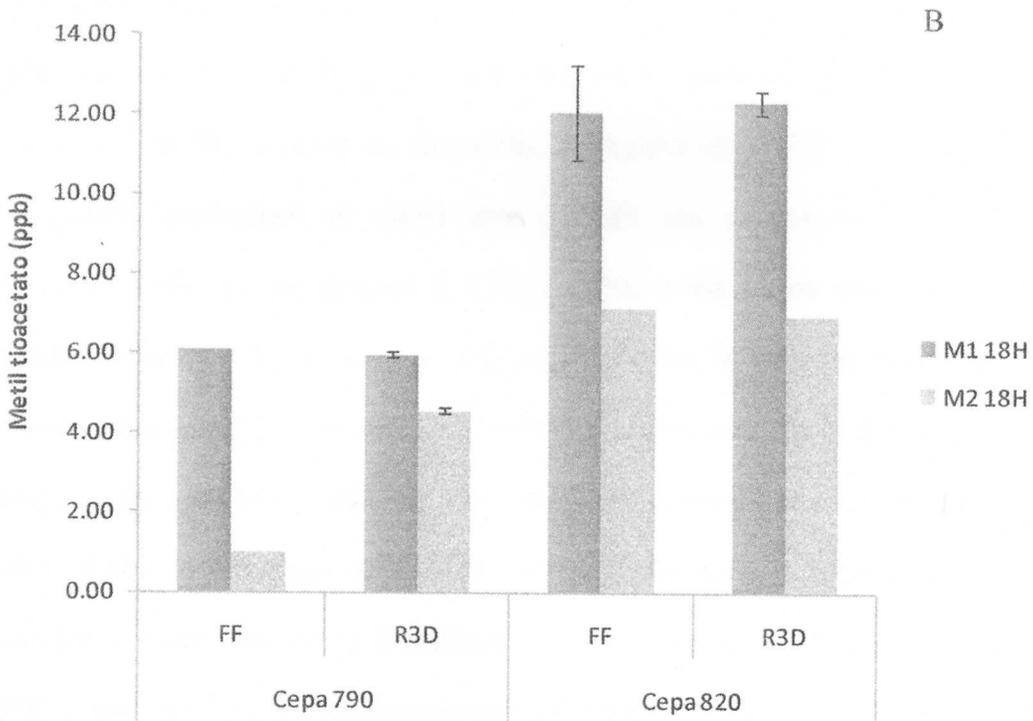
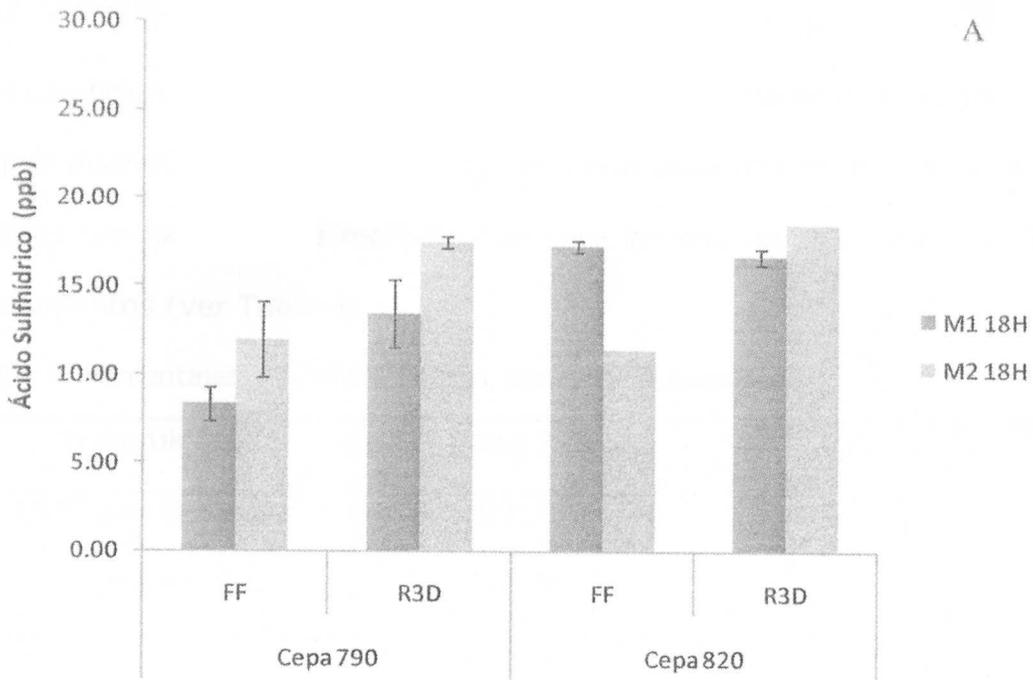


Figura 11. Concentración de H_2S (A) y MetSAc (B) al FF y R3D para ambas cepas en el experimento 2², M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C - 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C - 18 horas).

6.3 Viabilidad de levadura

Las condiciones de almacenamiento de la levadura previo a la inoculación, para lograr diferentes grados de viabilidad, generaron niveles mayores al 90% de células con habilidad de reproducción para las dos cepas de levadura y ambos tratamientos (ver Tabla 9).

Tabla 9. Porcentajes de células viables, posterior al tratamiento.

Tratamiento	Cepa 790	Cepa 820
18°C por 18 horas	93.74	94.10
4°C por 4 horas	97.70	98.15

Se ha observado que una reducción en la viabilidad y vitalidad de la levadura puede ocasionar que algunos parámetros de la fermentación como: floculación, atenuación de °P, niveles de diacetilo, acetaldehído y SO₂, se vean afectados. Esto puede atribuirse al daño que sufren las permeasas de aminoácidos (principalmente de los grupos B y D) debido a los bajos niveles de glicógeno. Considerando que la metionina algunos autores la indican como del grupo B (Perpète et al., 2005), la complicación de la entrada de dicho aminoácido a la célula puede activar la ruta de reducción de sulfato generando compuestos de azufre. Cabe mencionar que las condiciones para lograr diferencias en la viabilidad reportadas en la literatura (Pickerell et al., 1991) son más agresivas (25°C y tiempos de almacenamiento de hasta 24 horas) que la ensayadas en este estudio. Por lo tanto resulta coherente que los efectos atribuidos a la viabilidad, en la generación de compuestos azufrados hayan sido de bajo impacto.

La levadura, al finalizar la fermentación, presentó valores de viabilidad superiores al 90% de células viables. lo cual se considera un valor aceptable en la industria cervecera (Gales, 2007). No se detectaron diferencias significativas de viabilidad entre las fermentaciones realizadas con mosto 1 en comparación con las de mosto 2 (datos no mostrados). Lo anterior confirma que los niveles de compuestos nitrogenados en los mostos fueron suficientes; para el adecuado desempeño de la levadura, en los parámetros básicos de la fermentación (porcentaje de alcohol y extracto aparente).

6.4 Evaluación Sensorial

Las pruebas de ordenamiento por intensidad de aroma de compuestos de azufre se realizaron para cada cepa por separado. Se realizó el cálculo de habilidades utilizando el modelo MBT, una habilidad es un componente utilizado para predecir la probabilidad de ganar una posición en el ranking.

Los catadores fueron entrenados para evaluar como compuestos de azufre los aromas de huevo podrido, drenaje, vegetales podridos, hule quemado y cebolla (Laundaud et al., 2008; Meilgaard, 1981).

En la Figura 12 se muestran las habilidades calculadas para la cepa 790, para cada tratamiento con sus respectivos cuasi intervalos simultáneos de confianza al 95%. Los resultados sugieren que no existe diferencia significativa en la intensidad percibida de compuestos de azufre de las muestras evaluadas.

Para la cepa 820, en la Figura 13, se observan diferencias significativas en las habilidades estimadas con los cuasi-intervalos de confianza simultáneos al 95% de confianza. El tratamiento M1 18H fue el que obtuvo una mayor habilidad seguida de M1 4H con habilidades similares para M2 4H y M2 18H. Lo anterior se interpreta como que el mosto 1 fermentando, con levadura almacenada a 18°C por 18 horas y levadura 820, produce significativamente una mayor cantidad de compuestos azufrados, lo cual es claramente distinguido por los catadores.

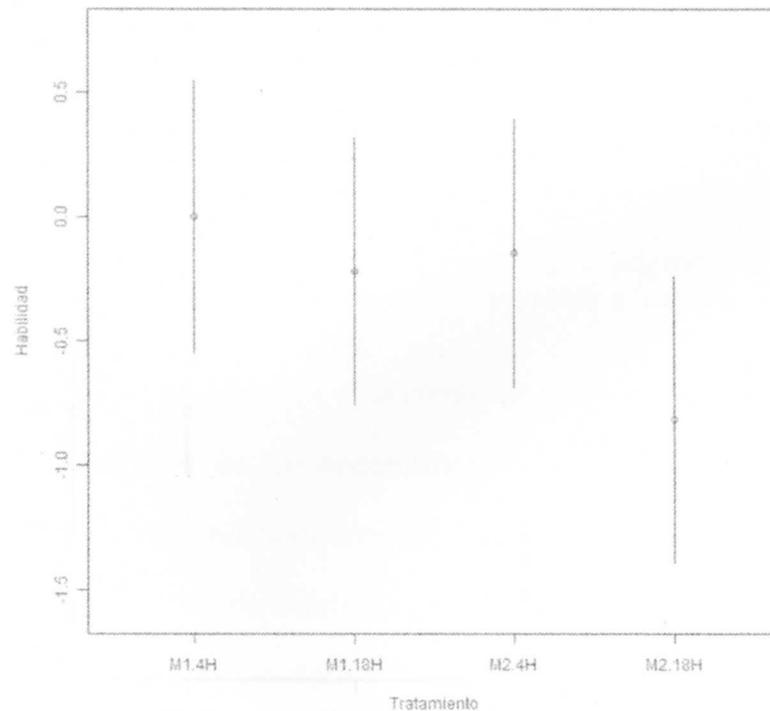


Figura 12. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos tomando como inicial M1 4H (centrado en cero), para cepa 790 en FF. M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C - 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C - 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C - 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C - 4 horas).

Para el tercer día de reposo, los resultados de las pruebas de ordenamiento presentan comportamiento similar a FF. Para la cepa 790 no es posible determinar un ranking significativo, lo cual indica que los catadores no perciben diferencias claras de intensidad de compuestos azufrados entre las muestras evaluadas. Caso diferente a la cepa 820, en donde resulta significativa la diferencia entre muestras, siendo la M1 18H la de mayor intensidad percibida de compuestos azufrados (ver Figuras 14 y 15).

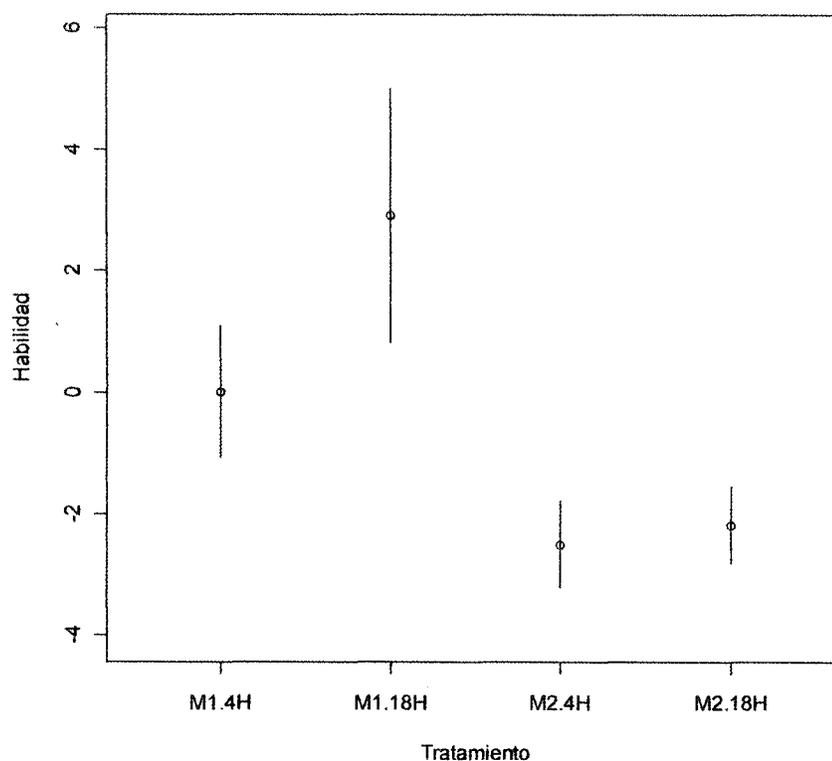


Figura 13. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos tomando como inicial M1 4H (centrado en cero), para cepa 820 en FF. M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C - 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C - 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C - 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C - 4 horas).

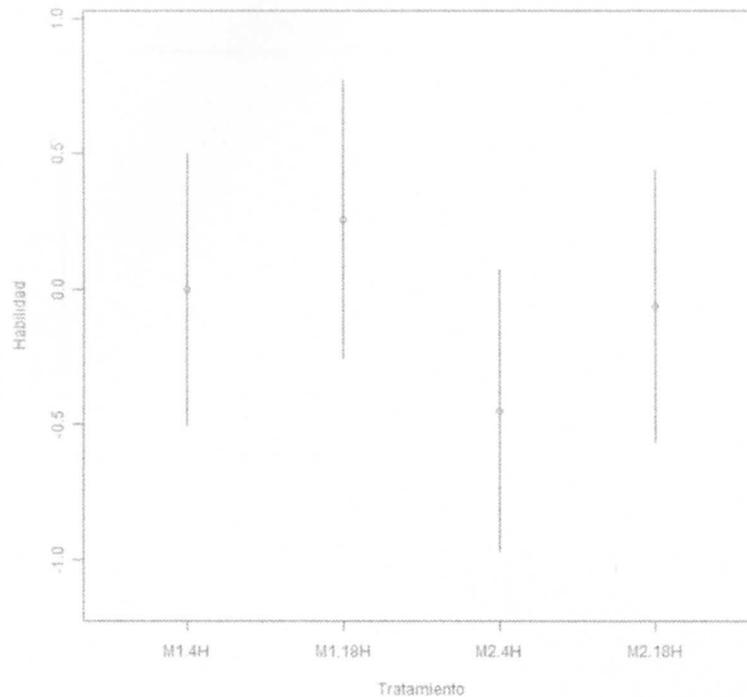


Figura 14. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos tomando como inicial M1 4H (centrado en cero), para cepa 790 en R3D. M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C – 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C – 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C – 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C – 4 horas).

Debido a que el catador se fatiga y con ello puede reducir considerablemente su desempeño, las pruebas de ordenamiento no se consideraron adecuadas para más de 4 muestras. Adicionalmente, los métodos de ordenamiento tienen la limitación de que no puede medir el grado de diferencia entre las muestras. Tampoco se puede comparar datos de un ensayo a otro, a menos que se hayan utilizado las mismas muestras (Pedrero y Pangborn, 1989). Por las razones anteriores, se prosiguió a otra prueba de ordenamiento con enfrentamiento de cuatro tratamientos, en donde los factores principales fueron mosto y cepa manteniendo la vitalidad de la levadura constante (experimento factorial 2²).

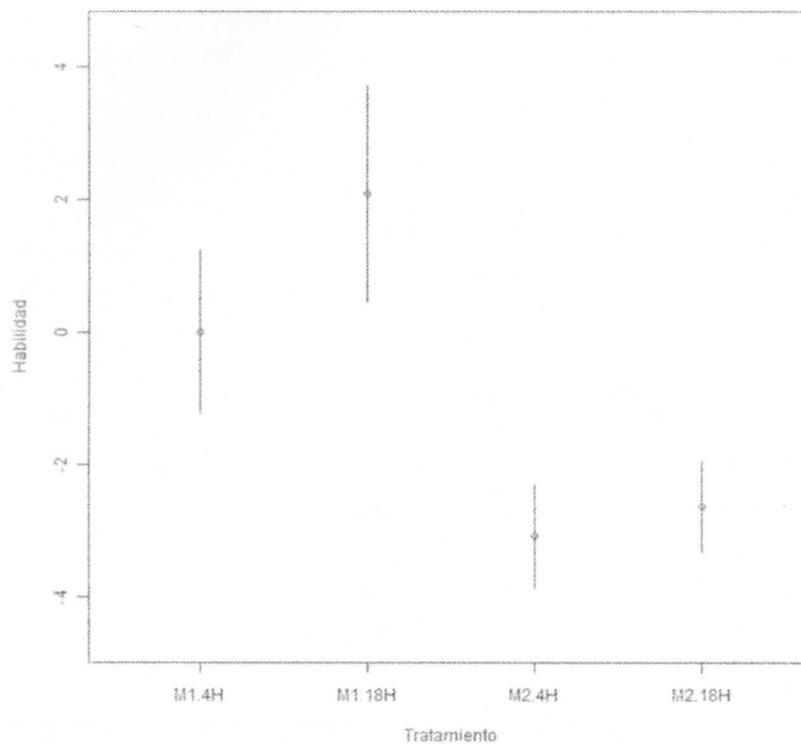


Figura 15. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos tomando como inicial M1 4H (centrado en cero), para cepa 820 en R3D. M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C – 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C – 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C – 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C – 4 horas).

En la Figura 16 se pueden apreciar los cuasi-intervalos de confianza en donde los catadores demostraron mayor habilidad para la muestra M1 820 (Mosto 1 Cepa 820) y prácticamente un empate para el resto de los tratamientos. Claramente la combinación mosto 1 con cepa 820 es la condición en la que los catadores perciben mayor intensidad de compuestos de azufre. Así mismo, la cepa 820 puede disminuir su producción de compuestos azufrados cuando fermenta un mosto con mayor contenido de nutrientes nitrogenados; de esta manera se refuerza la interacción cepa*mosto en la expresión de algunos

genes, en donde como se comentó anteriormente, las cepa 820 tiene comportamiento diferente, dependiendo del medio donde fermente (Leal, 2010).

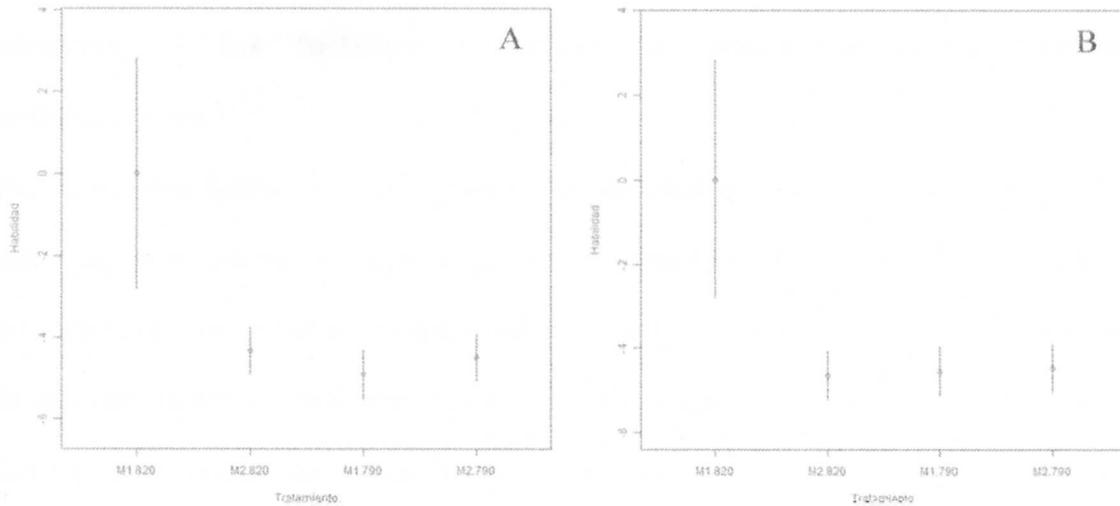


Figura 16. Habilidades de ordenamiento con cuasi-intervalos de confianza simultáneos tomando como inicial M1 820 (centrado en cero), en FF (A) y R3D (B).

6.5 Relación entre evaluaciones químico-analíticas y sensoriales

La relación entre al análisis sensorial y el análisis instrumental es de alto valor ya que nos lleva a conocer cuáles son los compuestos que generan notas deseables o indeseables en los productos. Desafortunadamente realizar esta correlación no siempre es posible, debido a la interacción compleja de los compuestos, que en algunos casos enmascaran o resaltan notas sensoriales que no son detectadas por un equipo o viceversa (Marsili, 2007).

Con el modelo MBT se procedió al análisis factorial para cada cepa, con el objetivo de encontrar alguna relación entre factores evaluados y el

ordenamiento otorgado por los catadores. Los valores-p encontrados (ver Tabla 10) nos indican que para la cepa 820 los factores principales de mosto y viabilidad además de la interacción mosto*viabilidad son significativos y pueden predecir el ranking sensorial, para la cepa 790 los números indican que ninguno de los factores evaluados es significativo para predecir el ordenamiento.

En la misma tabla se reporta el valor de *Null deviance* lo cual nos indica la cantidad de variación por explicar y *Residual deviance* es un valor que justamente nos informa el residual al aplicar el modelo, entre más grande sea la diferencia entre *Null deviance* y *Residual deviance*, y los p-value tanto de los factores como del modelo sean significativos (menor a 0.05) se considera un mejor ajuste.

Tabla 10. Valor-p para los factores evaluados en la predicción del ranking y del modelo general.

Factor	Cepa 790		Cepa 820	
	FF	R3D	FF	R3D
Mosto	0.701	0.215	<0.001	<0.001
Viabilidad	0.566	0.475	0.004	0.005
Mosto*viabilidad	0.414	0.800	0.022	0.067
Null deviance	6.173	4.828	88.71	87.04
Residual deviance	1.072	0.903	5.102	2.872
p-value del modelo	0.165	0.269	<0.001	<0.001

Valores de $p \leq 0.05$ son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

Posteriormente se aplicó el modelo MBT para tratar de encontrar una relación con cada una de las covariables (con diferencia significativa en determinaciones químico-analíticas) respecto al ranking sensorial.

De acuerdo a los valores-p obtenidos se puede decir que el ordenamiento proporcionado por los catadores en FF y R3D presenta una relación positiva significativa, con el contenido de MetSAc, en las fermentaciones realizadas con la cepa 820, mientras que para la cepa 790 no es posible realizar una predicción bajo ninguna covariable (ver Tabla 11).

Tabla 11. Valor-p para el modelo de covariables en la predicción del ranking sensorial.

Covariable	<i>Cepa 790</i>		<i>Cepa 820</i>	
	FF	R3D	FF	R3D
Ácido Sulfhídrico	0.831	0.247	0.114	0.194
Metil tioacetato	0.500	0.062	0.023	0.026

Valores de $p \leq 0.05$ son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

En la Figura 17 se puede apreciar gráficamente que para la cepa 790 ninguno de los compuestos azufrados es capaz de modelar o predecir las habilidades de los catadores. Las concentraciones de cada compuesto de azufre son muy cercanas entre los tratamientos (1-2 ppb de H₂S y de 0.5-4.0 ppb de MetSAc) por lo que los catadores no fueron capaces de ordenar las muestras correctamente, considerando como base la concentración analíticamente reportada.

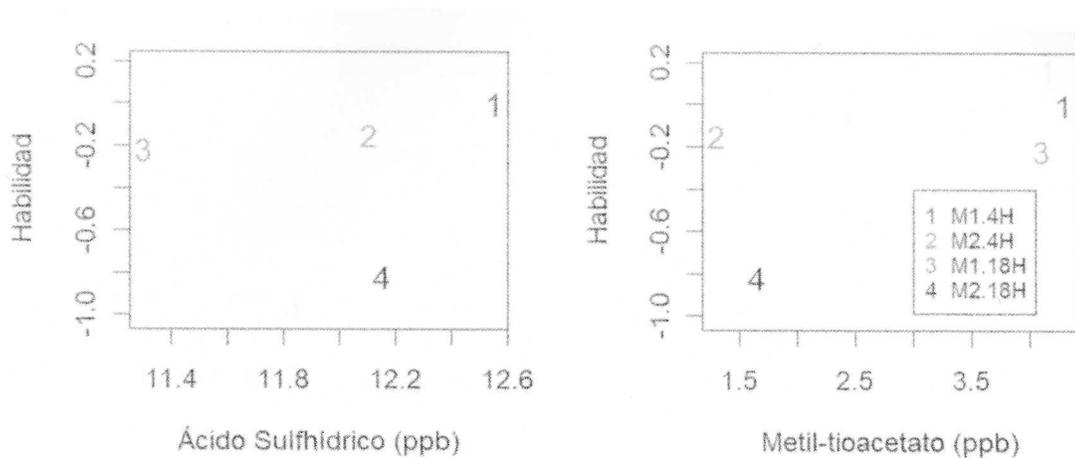


Figura 17. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 en FF.

En el caso de la cepa 820, se observa una mayor diferencia en el contenido de compuestos azufrados entre tratamientos. Es evidente que la concentración de 23 – 24 ppb de H_2S y las casi 10 ppb de MetSAc en el tratamiento M1 18H contribuyen para que los catadores lo ubiquen como el tratamiento con mayor intensidad de compuestos azufrados. El segundo lugar en la habilidad de los catadores corresponde al tratamiento M1 4H, el cual presenta una cantidad similar de MetSAc que el tratamiento M1 18H, pero su contenido de H_2S es menor. Esto indica que el MetSAc tiene un efecto aromático mayor en la percepción de los catadores (ver Figura 18).

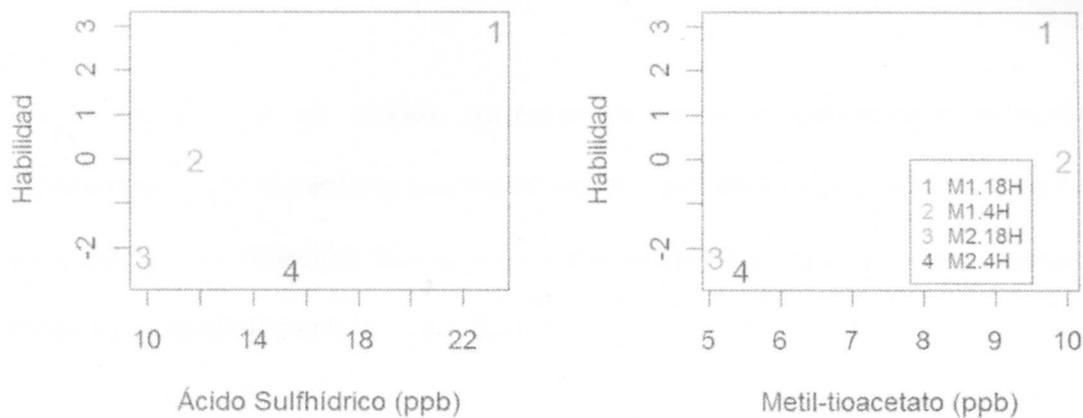


Figura 18. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 820 en FF.

Las variaciones en la apreciación de intensidades de aromas y sabores son amplias. Se ha encontrado que en un grupo de individuos, generalmente el 10% cuenta con una percepción limitada y otro 10% posee un sensibilidad extraordinaria. El umbral de detección de algún compuesto en específico puede presentar diferencias de hasta 20 veces entre los más y menos hábiles (Meilgaard, 1982). Debido a estas diferencias se puede explicar la gran cantidad de umbrales de detección reportados para un mismo compuesto. En el caso del MetSAc se cuenta con umbrales desde 3 ppb determinado en agua (Laundaud et al., 2008) hasta valores de 50 ppb evaluado en cerveza (Miracle et al., 2005). Adicionalmente habrá que considerar el tipo de cerveza utilizado como base.

En pruebas realizadas durante el entrenamiento de los catadores participantes en este estudio se determinó que diferencias de 4-5 ppb de MeSAc son identificadas claramente por los catadores (datos sin publicar), por lo que

resultan coherentes los resultados reportados en los ordenamientos para ambas cepas evaluadas.

En la Figura 19 se puede apreciar la poca o inexistente relación de la covariables con el ranking sensorial en el caso de la cepa 790 y en la Figura 20 se observa la relación lineal existente entre los compuestos azufrados y el ranking sensorial para la cepa 820.

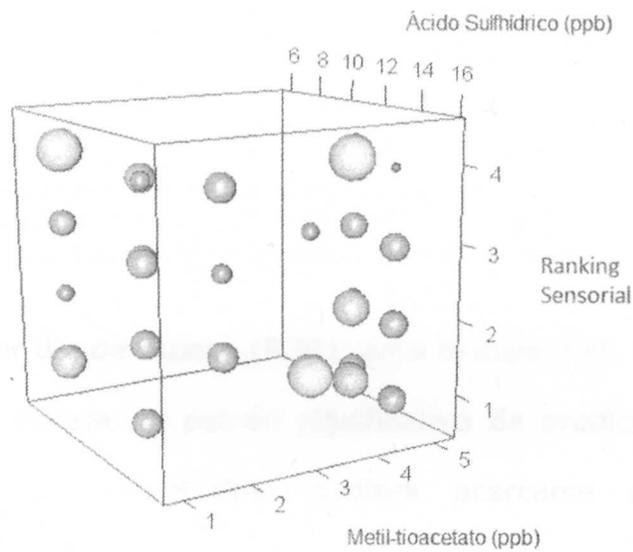


Figura 19. Relación entre el ranking sensorial con la concentración de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 en FF. El tamaño de la esfera es proporcional al número de catadores que se ubicaron en cada posición.

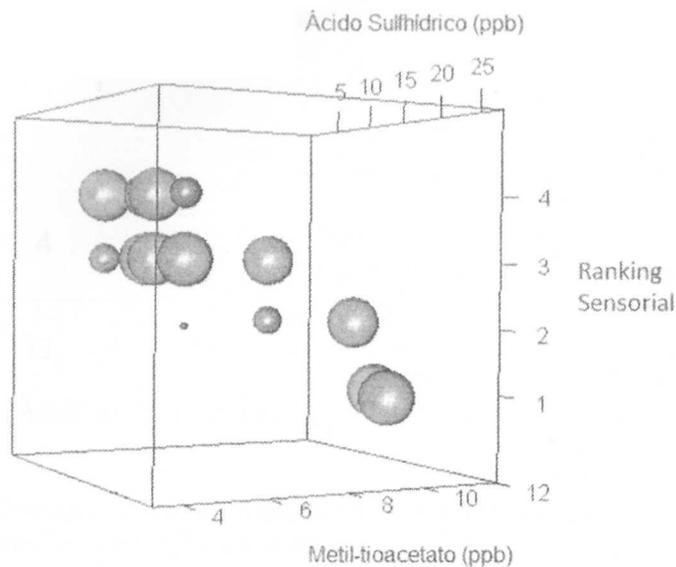


Figura 20. Relación entre el ranking sensorial con la concentración de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 820 en FF. El tamaño de la esfera es proporcional al número de catadores que se ubicaron en cada posición.

En el tercer día de reposo (R3D), para la cepa 790, ninguno de los compuestos evaluados refleja un patrón significativo de predicción del ranking sensorial. Sin embargo, el MetSAc pudiera acercarse a una predicción donde concentraciones de 4.5 ppb ubican a los tratamientos elaborados con mosto 1 en los primeros lugares de la prueba de ordenamiento, ver Figura 21.

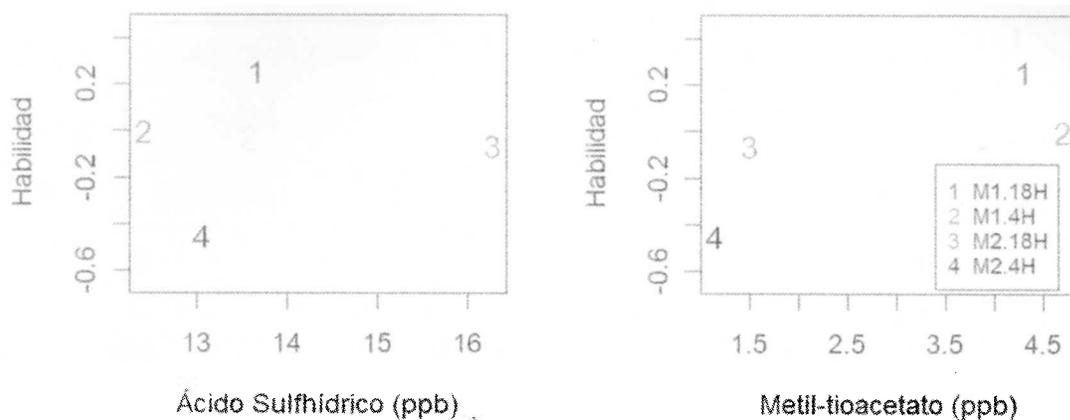


Figura 21. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 en R3D.

El comportamiento de la cepa 820 en R3D es similar a lo observado hasta el final de fermentación. Claramente la concentración de MetSAc explica mejor que la concentración de H_2S el ranking sensorial (ver Figura 22).

La concentración de H_2S por sí misma no explica el ordenamiento sensorial en ninguna de las cepas, pero al visualizarlo de manera conjunta con MetSAc, se logra una mejor aproximación en el caso de la cepa 820, aunque la relación lineal se ve disminuida respecto a lo observado en FF (ver Figura 23).

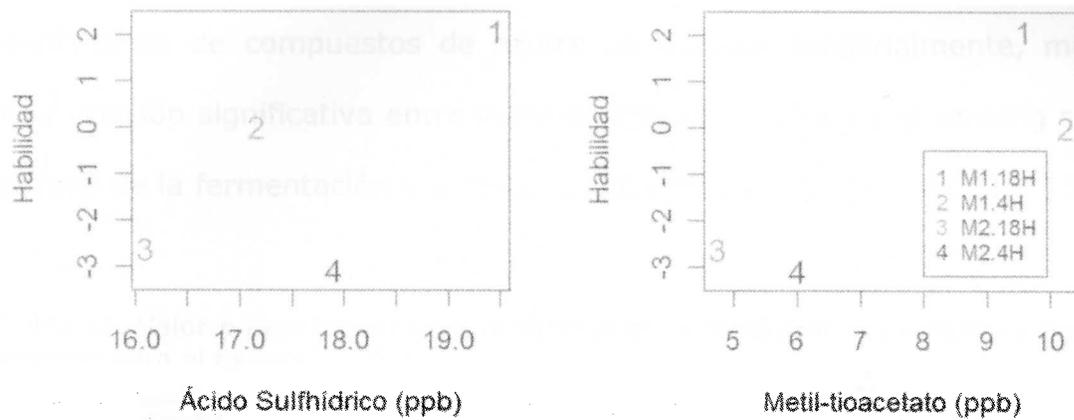


Figura 22. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 820 en R3D.

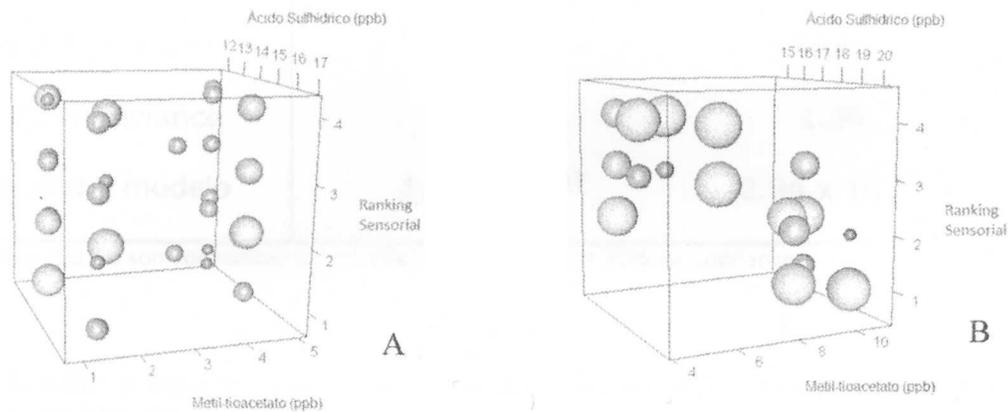


Figura 23. Relación entre el ranking sensorial con la concentración de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para la cepa 790 (A) y 820 (B) en R3D. El tamaño de la esfera es proporcional al número de catadores que se ubicaron en cada posición.

Para el diseño factorial 2^2 (cepa y mosto), los resultados confirman que el factor principal de mayor impacto fue la cepa, además de ser significativa la interacción Cepa*Mosto (ver Tabla 12). Al realizar el análisis de covariables solamente el MetSAc fue capaz de predecir el ranking sensorial en R3D (ver Tabla 13).

Destacablemente la combinación de mosto 1 con cepa 820 resultó ser la mayor generadora de compuestos de azufre apreciables sensorialmente, marcando una relación significativa entre la concentración analítica y el ranking sensorial al final de la fermentación y al tercer día de reposo (ver Figuras 24 y 25).

Tabla 12. Valor-p para los factores evaluados en la predicción del ranking y del modelo general para el experimento 2².

Factor	FF	R3D
Cepa	0.0006	0.0015
Mosto	0.3239	0.8435
Cepa*Mosto	0.0015	0.0016
Null deviance	64.46	62.50
Residual deviance	1.09	1.09
p value del modelo	1.12×10^{-13}	2.94×10^{-13}

Valores de $p \leq 0.05$ son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

Tabla 13. Valor-p para el modelo de covariables en la predicción del ranking sensorial para el experimento 2².

Covariable	FF	R3D
Ácido Sulfhídrico	0.0766	0.8380
Metiltioacetato	0.1520	0.0102

Valores de $p \leq 0.05$ son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

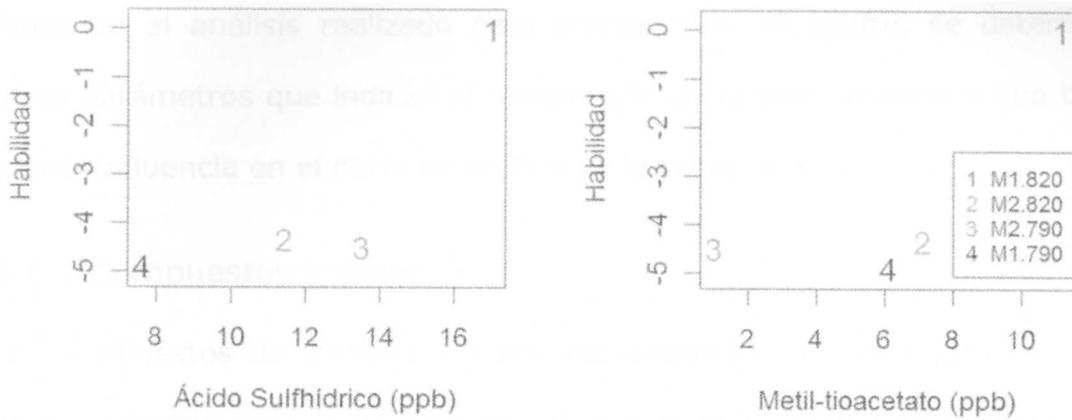


Figura 24. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para experimento 2^2 en FF.

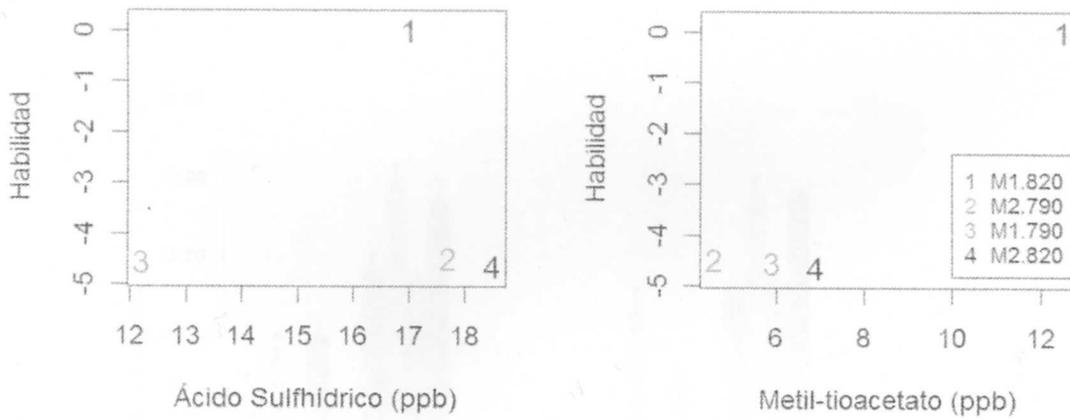


Figura 25. Habilidades de ordenamiento y contenido de ácido sulfhídrico y metil-tioacetato para experimento 2^2 en R3D.

6.6 Otros parámetros de la fermentación

Adicional al análisis realizado para compuestos de azufre, se determinaron otros parámetros que indican el desempeño de la fermentación y que también tienen influencia en el perfil aromático de la cerveza.

6.6.1 Compuestos frutales

Los compuestos con aromas frutales que presentaron diferencias significativas en las determinaciones químico analíticas fueron acetaldehído, acetato de etilo y acetato de isoamilo (ver Figura 26). En el análisis factorial, el mosto y la cepa resultan ser los factores de mayor impacto en la generación de compuestos aromáticos (ver Tabla 14).

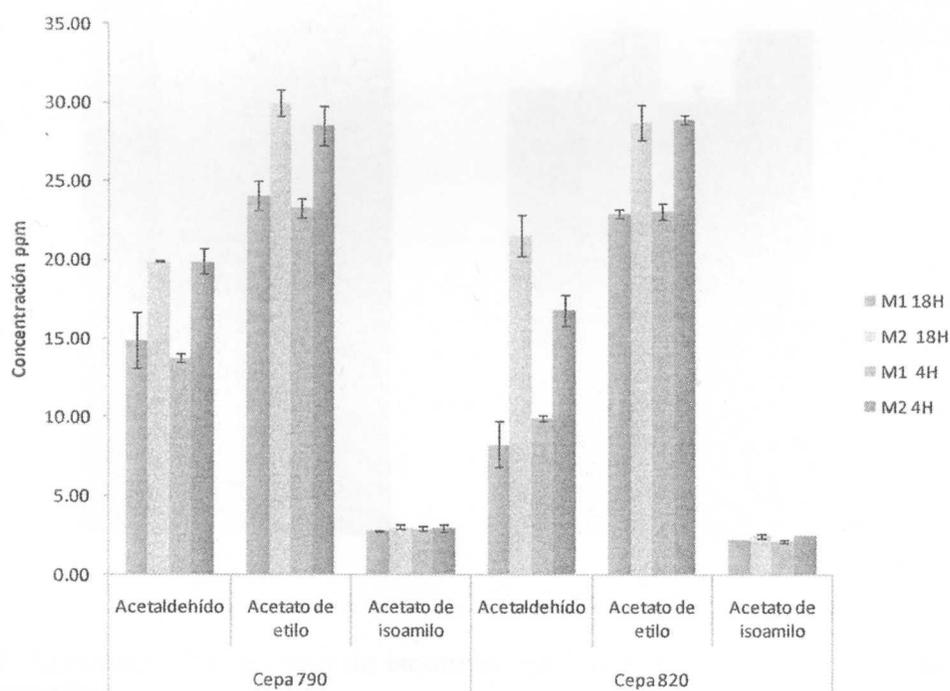


Figura 26. Concentración de acetaldehído, acetato de etilo y acetato de isoamilo medido en FF para ambas cepas y todos los tratamientos.

Para el caso de acetaldehído y acetato de etilo, se observa un impacto altamente significativo debido al mosto, mientras que para el acetato de isoamilo el factor más importante es la cepa.

La cepa 790, para todos los tratamientos presenta mayor producción de acetato de isoamilo (ver Figura 27).

Para acetaldehído y acetato de etilo se presenta mayor cantidad de estos compuestos con los tratamientos que contienen mosto 2.

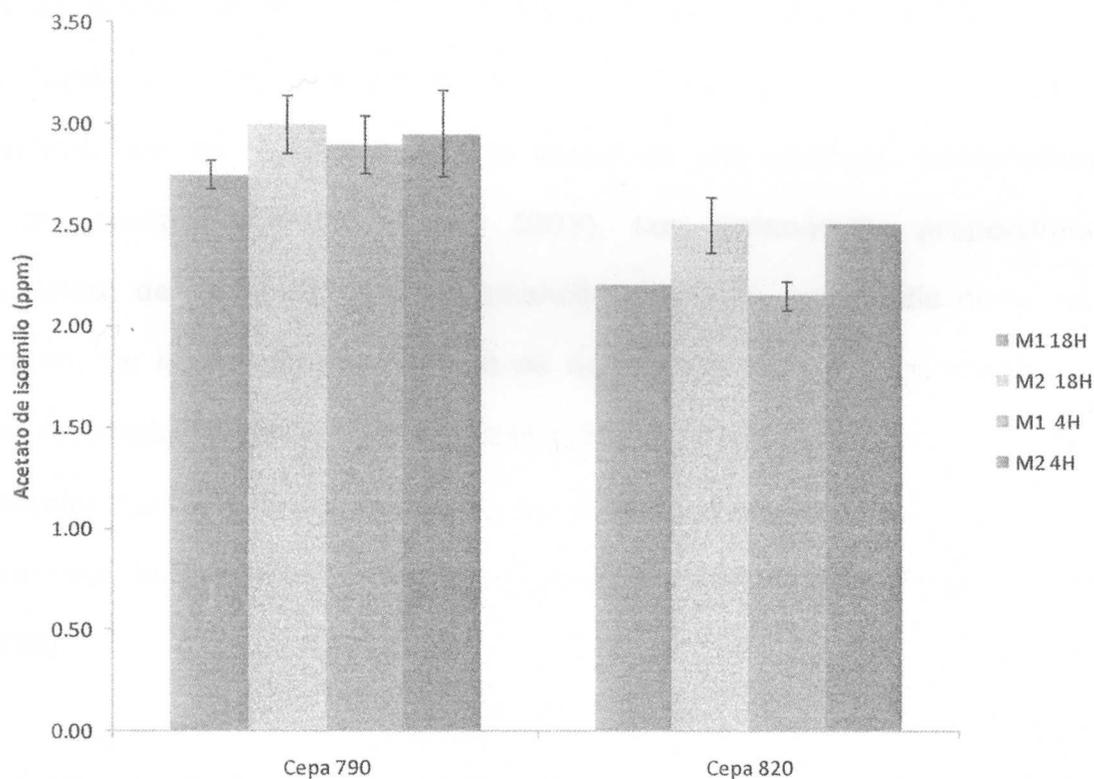


Figura 27. Concentración acetato de isoamilo medido en FF para ambas cepas y todos los tratamientos.

Los ésteres son, de los compuestos generados durante la fermentación por acción de la levadura, de alto impacto aromático. El acetato de etilo, con su característico aroma solvente-frutal, y el acetato de isoamilo, que confiere notas de plátano, son los ésteres con mayor importancia en el perfil sensorial de la cerveza (Boulton y Quain, 2003). Se reportan otros ésteres como caproato de etilo (manzana-anís), butirato de etilo (piña-papaya) y hexanoato de etilo (manzana), que pueden generar identidades aromáticas en algunas marcas de cerveza (Meilgaard, 1981).

La síntesis de ésteres requiere de dos sustratos: alcoholes (etanol y alcoholes de fusel) y ácidos carboxílicos. La ruta de formación más aceptada en la fermentación de cerveza es por la acción de dos enzimas: aciltransferasa y éster sintetasa (Dufour et al., 2003). Los aminoácidos proporcionan el esqueleto de carbonos para los alcoholes de fusel por medio de la ruta de Ehrlich. Se han realizado pruebas de adición de leucina a los mostos dando por resultado cervezas con alto contenido de alcohol isoamílico y acetato de isoamilo. Con treonina e isoleucina se produce alcohol amílico y con valina se promueve la formación de alcohol isobutílico y acetato de isobutilo (Meilgaard, 1999).

La formación de ésteres se ve influenciada por varios factores entre los que se destacan: 1) levadura (cepa y condiciones fisiológicas), 2) composición del mosto (aereación, lípidos, FAN, aminoácidos y extracto) y 3) condiciones de fermentación (temperatura, presión, diseño geométrico de fermentadores)

(Dufour et al., 2003). En esta investigación, los factores que se evaluaron con posible efecto en ésteres fueron levadura (cepa y viabilidad) y mosto. Se confirmó que el éster de mayor concentración en cerveza es el acetato de etilo, debido a que el etanol es un sustrato muy abundante en el medio. También se comprobó que la cepa 790 es capaz de producir mayor cantidad de acetato de isoamilo en comparación con la 820. La cantidad de compuestos nitrogenados del mosto también influyó en la generación de ésteres, ya que para ambas cepas las fermentaciones con mosto 2 fueron las que resultaron con mayor concentración de ésteres.

Tabla 14. Valor-p para los efectos principales e interacciones los compuestos volátiles frutales evaluados al FF

<i>Factor</i>	<i>Acetaldehído</i>	<i>Acetato de isoamilo</i>	<i>Acetato de etilo</i>	<i>Alcoholes isoamílicos</i>
Mosto	<0.001	0.004	<0.001	<0.001
Viabilidad	0.078	0.840	0.288	0.096
Cepa	<0.001	<0.001	0.222	<0.001
Mosto*Viabilidad	0.037	0.549	0.744	0.380
Mosto*Cepa	0.003	0.183	0.744	0.961
Viabilidad*Cepa	0.387	0.549	0.155	0.915
Mosto*Viabilidad*Cepa	0.007	0.328	0.699	0.006
R ²	97.42	93.09	96.19	98.04

Valores ≤ 0.05 son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

El resultado del ranking sensorial indica que, para ambas cepas, el tratamiento que fue percibido con mayor intensidad de notas frutales corresponde a Mosto 2 con vitalidad de levadura de 18°C por 18 horas (M2 18H) (ver Figura 28).

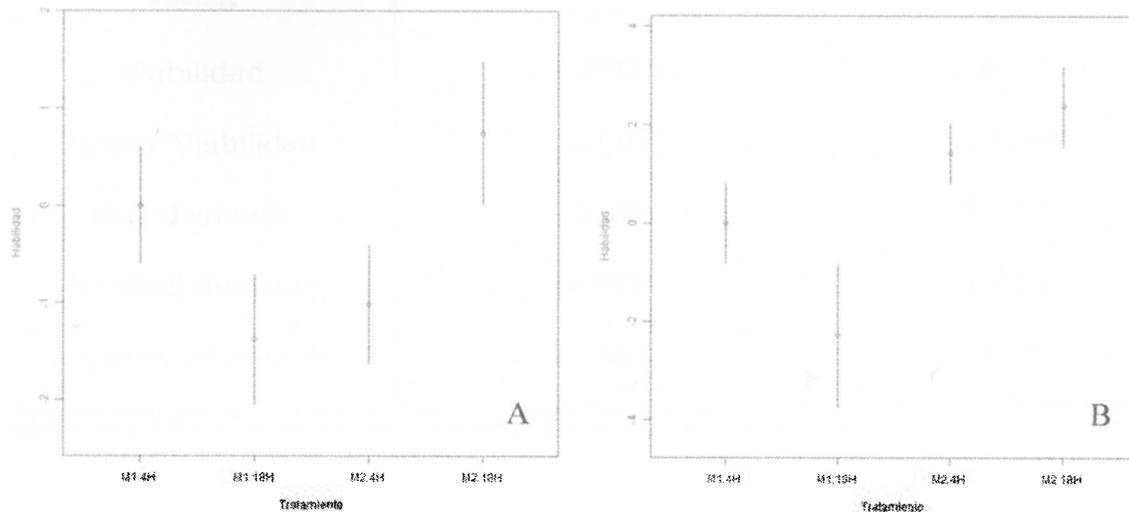


Figura 28. Habilidades de ordenamiento para compuestos frutales, con cuasi-intervalos de confianza simultáneos tomando como inicial M1 4H (centrado en cero), para cepa 790 (A) y 820 (B) en FF. M1 18H (Mosto 1 Viabilidad 18°C – 18 horas), M2 18H (Mosto 2 Viabilidad 18°C – 18 horas), M1 4H (Mosto 1 Viabilidad 4°C – 4 horas) y M2 4H (Mosto 2 Viabilidad 4°C – 4 horas).

Al aplicar el modelo MBT para un análisis factorial se encontró que mosto, viabilidad y su interacción, pueden predecir el ranking sensorial de compuestos frutales al final de la fermentación para ambas cepas, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Valor-p para los factores evaluados en la predicción del ranking sensorial de aroma frutal y del modelo general.

<i>Factor</i>	<i>Cepa 790</i>	<i>Cepa 820</i>
Mosto	0.019	0.0059
Viabilidad	0.002	0.0021
Mosto*Viabilidad	<0.001	0.0030
Null deviance	29.09	75.32
Residual deviance	0.345	1.410
p-value del modelo	<0.001	<0.001

Valores de $p \leq 0.05$ son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

Al tratar de relacionar las covariables químico-analíticas a las que se les atribuye propiedades aromáticas frutales (acetato de isoamilo y acetato de etilo) con la apreciación sensorial, no fue posible ajustar un modelo para predecir el ranking con cada uno de los compuestos evaluados de forma individual (ver Tabla 16)

Tabla 16. Valor-p para el modelo de covariables de compuestos frutales en la predicción del ranking sensorial.

<i>Covariable</i>	<i>Cepa 790</i>	<i>Cepa 820</i>
Acetato de isoamilo	0.136	0.055
Acetato de etilo	0.550	0.178
Acetaldehído	0.729	<0.001

Valores de $p \leq 0.05$ son considerados con efecto significativo al 95% de confianza.

En el caso del acetaldehído, para la cepa 820, si se detecta un efecto significativo capaz de predecir el ranking sensorial (ver Figura 29). La posible relación con notas frutales se debe a las características aromáticas de manzana verde, que confiere el acetaldehído (Meilgaard, 1981).

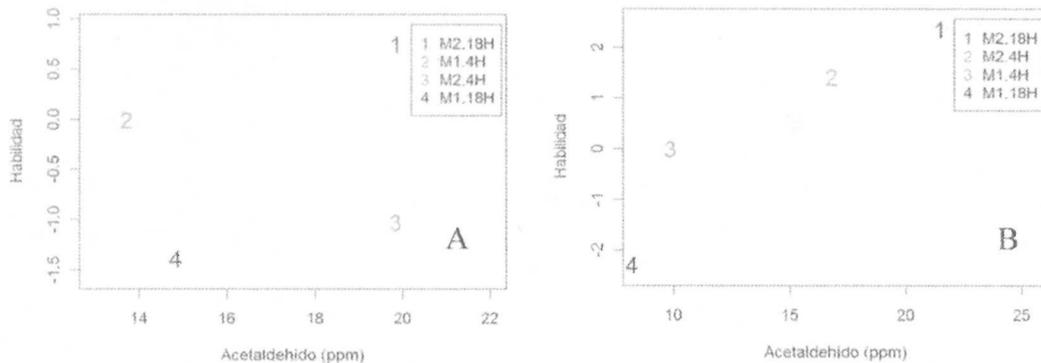


Figura 29. Habilidad de ordenamiento y contenido de acetaldehído para la cepa 790 (A) y 820 (B) en FF.

6.6.2 Diacetilo, porcentaje de alcohol y células en suspensión

Con respecto a reducción de diacetilo, los valores oscilaron entre 0.3 y 0.7 ppm, sin diferencia significativa entre los tratamientos. El porcentaje de alcohol no resultó afectado. En las células en suspensión se observa, que la cepa 790 floculó más intensamente que la cepa 820, ya que se reporta una menor cantidad de células en suspensión al finalizar la fermentación (ver Tabla 17).

Tabla 17. Células en suspensión al final de la fermentación (FF) en millones cel / mL.

<i>Tratamiento</i>	<i>Cepa 790</i>	<i>Cepa 820</i>
M1 18H	0.105	3.785
M2 18H	0.017	2.795
M1 4H	0.050	3.465
M2 4H	0.063	2.800

7 Conclusiones y recomendaciones

La estrategia de modificar porcentajes de malta y adjuntos en la elaboración de los mostos experimentales, generó dos mostos con diferencia significativa en la concentración de compuestos nitrogenados (aminoácidos libres y amino nitrógeno libre) sin afectación en otros parámetros básicos del mosto. El mosto 1 presentó menor cantidad de compuestos nitrogenados respecto a mosto 2.

Los aminoácidos evaluados, con efecto en la ruta metabólica de compuestos azufrados, que presentaron diferencia significativa en su concentración entre los mostos experimentales (mayor en mosto 2) fueron serina y treonina. La fermentación con cepa 820 y Mosto 1 (menor concentración de nutrientes nitrogenados) fue la que presentó mayor cantidad de compuestos azufrados, lo anterior indica que dicha cepa genera mayor cantidad de compuestos de azufre cuando fermenta un mosto con bajo contenido de alfa amino nitrógeno y aminoácidos libres.

Las diferencias de viabilidad de la levadura evaluadas en este estudio no resultaron de alto impacto. Las condiciones de almacenamiento y temperatura ensayadas no contribuyeron de manera significativa en la generación de compuestos de azufre. Posiblemente se requieren condiciones más severas de tiempo y almacenamiento de la levadura, para generar cambios en la producción de compuestos azufrados.

La producción de compuestos de azufre, en la fermentación para producción de cerveza, resultó significativamente relacionada con la cepa y la concentración de compuestos nitrogenados del mosto. Los compuestos de azufre producidos con diferencia significativa entre los tratamientos ensayados fueron H₂S y metil-tioacetato.

La cepa 790 es capaz de compensar la disminución de compuestos nitrogenados en el mosto, con un ajuste en su metabolismo, lo cual es congruente con los análisis de expresión génica realizados en un estudio paralelo a la levadura de los tratamientos de esta investigación.

El metil-tioacetato resultó ser el compuesto de azufre con mayor impacto en la relación sensorial – analítica, siendo los tratamientos con Mosto 1 los de mayor concentración de dicho compuesto y también los ordenados por los catadores en la primera posición de intensidad de compuestos azufrados.

Tanto analítica como sensorialmente se determinaron interacciones cepa*mosto, lo cual respalda la conclusión de que cada cepa evaluada, reacciona diferente a la concentraciones de nutrientes del mosto.

De los tratamientos ensayados, aquellos donde se involucra la cepa 790 y el mosto 2 son los que menor intensidad de compuestos azufrados generan, resulta evidente que la cepa 820 con mosto pobre en compuestos nitrogenados no es la mejor alternativa en la disminución de compuestos de azufre en la

fermentación para la producción de cerveza. Sin embargo, la cepa 820 fue capaz de disminuir los compuestos de azufre cuando fermenta con el mosto 2 (mayor cantidad de compuestos nitrogenados). De ésta manera se demuestra, que las cepas de levadura pueden modificar su comportamiento, dependiendo de los nutrientes que les sean proporcionados en el mosto.

Respecto a la producción de compuestos frutales, se concluye que existe efecto de cepa y mosto, siendo la cepa 790 la mayor productora de acetato de isoamilo y el Mosto 2 el que más contribuye en la generación de ésteres, sin embargo no fue posible ajustar un modelo para predecir el ranking sensorial en base a las concentraciones de compuestos frutales.

Se considera de alto valor la relación analítica y sensorial encontrada en este estudio. Permite identificar el compuesto de azufre (metil-tioacetato) de mayor impacto en la percepción sensorial. Es factible establecer estándares respecto a la concentración de metil-tioacetato en la cerveza, para evitar afectaciones en el perfil de sabor.

La industria cervecera podrá diseñar mostos (por ejemplo, modificando porcentajes de malta) con la concentración de compuestos nitrogenados necesaria para controlar la generación de compuestos azufrados en la fermentación y decidir cual cepa será la apropiada para obtener el perfil sensorial deseado.

8 Futuras investigaciones

Evaluar sensorial, analítica y genéticamente la formación de compuestos de azufre, en fermentaciones de mostos enriquecidos con serina. El objetivo será determinar concentraciones óptimas de dicho aminoácido, para las diferentes cepas de levadura, de tal manera que generen menos compuestos de azufre en la cerveza.

Realizar recombinación genética de las cepas de levadura, para ampliar el conocimiento respecto a los genes de mayor impacto en la generación de compuestos de azufre y quizás descubrir otros genes involucrados.

Determinar el umbral de percepción para metil-tioacetato en cerveza tipo lager de baja intensidad aromática.

Ampliar la cantidad de compuestos de azufre cuantificables analíticamente, mediante la optimización y mejora del método de análisis.

Determinar si existe alguna relación entre la generación de compuestos frutales y compuestos de azufre en la fermentación cervecera.

9 Apéndices

I. Amino nitrógeno libre (FAN)

Reactivos

- **Reactivo colorido de ninhidrina.** Disolver 7.4866 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.0 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de ninhidrina (Baker 4862) y 0.3 g de fructosa en agua destilada y diluir a 100 mL. El pH deberá ser de 6.6 – 6.8, el reactivo es estable por 2 semanas en refrigeración y protegido de la luz.
- **Solución de dilución.** Disolver 2 g de KIO_3 en 600 ml de agua destilada y agregar 400 mL de etanol al 96%.
- **Solución stock de glicina estándar.** Disolver 107.2 mg de glicina (Baker M799) en agua destilada y diluir a 100 mL, el reactivo es estable por un mes a 0°C.
- **Solución estándar de glicina.** Diluir 1 mL de stock de glicina a 100 mL con agua destilada, este estándar contiene 2 mg de amino nitrógeno/1. Prepare cada vez que se utilice.

Material y aparatos

- Tubos de 16x150 mm con tapón de rosca
- Pipetas volumétricas de 1, 2 y 5 mL
- Matraces de aforación de 100 mL
- Baño de agua hirviendo
- Baño de agua a 20°C
- Papel filtro Reeve Angel 202
- Espectrofotómetro UV – VIS Marca Beckman Coulter Modelo DV-650

Método

Estándar de calibración. Preparar el estándar transfiriendo 2 mL de la solución estándar de glicina a tubos de prueba por triplicado.

Preparación de muestra. Agitar la muestra para homogenizar, atemperar de 5-8°C y filtrar con papel Reeve Angel. Diluir 1 mL del filtrado a 100 mL con agua destilada y transferir 2 mL del mosto diluido al tubo de prueba por triplicado. Para el blanco transferir 2 mL de agua destilada a tubos de prueba por triplicado

Reacción colorimétrica. Agregar 1 mL de reactivo colorido de ninhidrina a cada tubo de prueba, tapar todos los tubos y calentarlos por 16 minutos exactamente en un baño de agua en ebullición. Enfriar por 20 minutos en un baño de agua a 20°C.

Medición en espectrofotómetro. Agregar a cada tubo 5 mL de solución de dilución, mezclar perfectamente el contenido de cada tubo y medir la absorbancia a 570 nm contra agua destilada, durante los siguientes 30 minutos después de la adición de la solución de dilución.

Cálculos

Promediar las lecturas de absorbancia obtenidas por triplicado de cada muestra, restar la absorbancia promedio del blanco de las muestras y del estándar de glicina. Calcular las concentraciones de amino nitrógeno libre en las muestras con la siguiente fórmula:

$$\text{Amino nitrógeno libre (mg/L)} = (\text{Abs neta soln prueba} / \text{Abs neta soln glicina}) * 2 * \text{dilución}$$

Recomendaciones

Debido a que las cantidades de amino nitrógeno determinadas por este método son pequeñas, es necesario evitar introducir trazas del ambiente. Todo el material de vidrio debe ser cuidadosamente lavado y manejado solo por el exterior.

Los tiempos y temperaturas son críticas por lo que se recomienda un apego estricto. Un estándar y blanco deben ser incluidos por cada prueba para compensar las variaciones de temperaturas de los baños de agua.

II. Aminoácidos libres

Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC
- AccQ.Fluor Reagent Kit (Buffer de boratos, derivatizante en polvo y solución para dilución del derivatizante)
- Eluente A Waters AccQ.Tag
- Hidrolizado estándar Waters

Materiales y aparatos

- Cromatógrafo de líquidos marca Hewlett Packard modelo 1100 con automuestreador y detector de UV- Fluorescencia.
- Columna Waters AccQ.Tag High Efficiency Nova Pak C₁₈ 4 μm.
- Heating block 55°C
- Tubos de reacción
- Insertos
- Pipetas pasteur
- Viales con septa de silicón

Método

Preparación de muestra. Tomar 400 μL de mosto y añadir 800 μL de acetonitrilo, agitar y centrifugar, del sobrenadante se toman 10 μL para realizar la reacción de derivatización.

Reconstitución del reactivo derivatizante. Golpear suavemente el reactivo AccQ flour para bajar el todo el polvo de las paredes del vial (2A), transferir 1 mL del reactivo de dilución (2B) al vial 2A, tapar ajustando la tapa y dar vortex por 10 seg, calentar el vial en la parte superior del heatingblock para disolver le reactivo. No calentar por más de 10 minutos.

Reacción de derivatización. En un tubo de reacción agregar 10 µL de muestra y 70 µL de buffer de borato y aplicar vortex, posteriormente adicionar 20 µL de reactivo AccQ Flour aplicar vortex y dejar reposar un minuto. Transferir el contenido del tubo de reacción con una pipeta pasteur a un vial con inserto de bajo volumen, tapar con septa de silicón y una vez cubierto el vial, calentar por 10 minutos en el heating block a 55°C.

Condiciones cromatográficas. Para la separación se utilizó un cromatógrafo con detector de UV y Fluorescencia de la marca Hewlett Packard serie 1100 con un sistema de gradiente de una bomba utilizando 3 eluentes: buffer de fosfato y acetato (AccQ Tag Eluente A), acetonitrilo y agua grado HPLC, a un flujo de 1 mL/min. Ver Tabla 18 donde se especifican los gradientes.

Tabla 18. Gradientes para separación de aminoácidos para Waters AccQ Tag. A=Eluente A AccQ Tag, B= Acetonitrilo grado HPLC y C=Agua grado HPLC.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% A</i>	<i>% B</i>	<i>% C</i>
Inicial	100	0	0
0.5	99	1	0
18	95	5	0
19	91	9	0
29.5	83	17	0
33	0	60	40
36	100	0	0

Ajustar temperatura de columna a 37°C y programar el detector a una longitud de onda de excitación de 250nm y longitud de onda de emisión de 395nm.

Inyectar 10 o 20 μ L del derivado e interpolar la señal obtenida en la curva de calibración. Se realizaron los cálculos tomando en cuenta el tratamiento y considerando también la cantidad de derivado inyectado.

III. Análisis de Carbohidratos

Reactivos

- Agua grado HPLC filtrada
- Benzoato de sodio 0.1 % como conservador. Disolver 0.200 g de benzoato de sodio con agua grado HPLC aforado a 200 mL.
- Glucosa 99.9% de pureza
- Maltosa 99 % de pureza
- Maltotriosa hidratada
- Fructosa grado reactivo o equivalente
- Manitol (Estándar interno)

Materiales y aparatos

- Cromatógrafo de líquidos marca HP modelo 1100 con detector de índice de refracción y automuestreador.
- Columna U-Spherogel Carbohydrate 6.5 mm X 30 cm Beckman
- Membranas de 0.45- μ m Millipore
- Cartuchos Sep Pack C₁₈, Waters Associates
- Papel filtro Reeve Angel # 202

Método

Stock de azúcares. Pesar 0.5 g de cada azúcar y añadir en un matraz volumétrico de 25 mL, aforar con solución de benzoato de sodio 0.1%. Para el

caso de maltotriosa colocar 0.1 g en un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con benzoato de sodio 0.1%.

Estándar de azúcares. Colocar 1 mL de agua grado HPLC filtrada en un matraz volumétrico de 5 mL y añadir las siguientes cantidades de soluciones stock de azúcares: 500 μ L maltotriosa, 350 μ L maltosa, 30 μ L glucosa, 40 μ L fructosa y 360 μ L de manitol. Aforar con agua grado HPLC.

Preparación de muestra. Filtrar el mosto con papel filtro Reeve Angel, colocar 1 mL del mosto filtrado en un matraz volumétrico de 5 mL y añadir 360 μ L de manitol (estándar interno) y aforar con agua grado HPLC, pasar la muestra a través de un filtro con membrana 0.45- μ m y cartucho Sep Pack C₁₈. Guardar el filtrado en viales de 2 mL cerrados y cubiertos con papel aluminio.

Condiciones de operación para el HPLC. Temperatura de columna de 90°C, agua grado HPLC filtrada como eluente, velocidad de flujo 0.6 mL/min y volumen de inyección de 20 μ L.

Cálculos

Calcular la respuesta de cada azúcar (g azúcar / 100 mL) dada por el área del pico correspondiente / g de azúcar en 100 mL de estándar de azúcares. La concentración de cada azúcar se determina con la siguiente fórmula:

$$\text{g azúcar/100 mL de mosto} = \text{área de azúcar} / \text{respuesta de azúcar}$$

IV. Viabilidad de levadura mediante microcultivo.

Reactivos

- Agar MYPG, 0.30 g de extracto de malta Difco, 0.30 g de extracto de levadura Difco, 1.0 g de glucosa anhidra Fisher, 0.50 g de peptona Difco, 6.0 g de maltosa Sigma Grade II, 1.50 g de agar granulado, 1 mL de solución de sulfato de zinc (1.5 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 mL de agua destilada) y 100 ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg², 121°C por 20 min. Verter en placa y dejar solidificar en campana de flujo laminar.
- Solución salina estéril

Material y aparatos

- Campana de flujo laminar
- Microscopio con objetivo 40X de campo claro
- Tubos de ensaye 16 x 125
- Cajas de petri
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas serológicas estériles de 1 mL

Método

Trabajar en condiciones de esterilidad con campana de flujo laminar.

Preparar una suspensión de células de levadura en solución salina estéril con una concentración de $5 \text{ a } 10 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. Diluir dicha suspensión 1:100 en solución salina estéril.

Con una navaja esterilizada con flama cortar un cuadrado de agar MYPG sólido de aproximadamente $2 \times 2 \text{ cm}$ y colocarlo sobre el portaobjetos.

Depositar una 1 – 2 gotas de la dilución de levaduras 1:100 sobre el cuadro de agar y cubrir lentamente con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

Observar al microscopio con objetivo 40X para verificar la presencia de 3 a 5 células (bien separadas) por campo para evitar el traslape de las microcolonias, si se observan pocas o demasiadas células por campo hacer los ajustes correspondientes (diluir o concentrar) para llegar a la concentración adecuada.

Con la dilución ajustada preparar dos microcultivos idénticos en un mismo portaobjetos, colocar dentro de una caja Petri, cubrir, identificar e incubar por 16 horas a 30°C .

Después de la incubación observar los microcultivos al microscopio con objetivo 25 o 40X, se cuentan como células viables aquellas que formaron microcolonia (mínimo 5 células) y como muertas las células aisladas sin crecimiento o grupos de máximo 4 células. Durante la manipulación es importante no tocar el cubreobjetos ya que se pueden descomponer las microcolonias formadas.

Se deben contar 500 células en total (microcolonias y aisladas), si no se completan en un cuadro de agar se puede recurrir a seguir el conteo en el segundo cuadro.

Las microcolonias que crecen en los bordes del cubreobjetos frecuentemente se traslapan por lo que se dificulta su conteo, se recomienda contar las colonias ubicadas hacia el centro del microcultivo que es donde se encuentran mejor distribuidas.

Cálculos

Calcular el porcentaje de células viables como sigue:

$$\% \text{ células viables} = \text{total de microcolonias} / (\text{total microcolonias} + \text{células aisladas})$$

V. Compuestos de azufre

Reactivos

- Agua grado HPLC Fisher
- Etanol absoluto Merck
- Solución stock 1 de dimetilsulfuro (DMS) 4 mg/mL. Pesar 40 mg (aprox 50 μ L) de DMS 99+% en 10 mL de etanol absoluto.
- Solución stock 1 de etil metil sulfuro (EMS) 4mg/mL. Pesar 40 mg (aprox 50 μ L) de EMS 99+% en 10 mL de etanol absoluto.
- Solución stock 1 de sulfuro de etileno, 39 μ L/10 mL. Pesar 39 μ L de sulfuro de etileno y aforar a 10 mL con etanol absoluto.
- Solución stock 2 de sulfuro de etileno. Tomar 0.1 mL de stock 1 y aforar a 10 mL.
- Solución stock 1 de metil tioacetato, 39 μ L/10 mL. Pesar 39 μ L de metil tioacetato y aforar a 10 mL con etanol absoluto.
- Solución stock 1 de H₂S 250 ppm. Pesar 2 g de sulfuro de sodio nanohidratado y aforar a 1L con agua destilada.
- Solución stock 1 de metanetiol 380 ppb.
- Solución estándar. Tomar 200 μ L de stock 1 de DMS, 1 mL de stock 2 de sulfuro de etileno y 39 μ L de stock 1 de metil tioacetato, aforar a 100 mL con etanol absoluto.

Todos las soluciones y estándares deberán prepararse en baño de hielo, con posterior almacenamiento en frascos ámbar, perfectamente cerrados a una temperatura de -10°C.

Materiales y aparatos

- Cromatógrafo de gases Marca Agilent Technologies modelo 7890 A con headspace y detector de quimiluminiscencia (SCD).
- Columna capilar Megaboro GS-Q 30 m x 0.53 mm
- Probetas de 10 mL
- Viales de 20 mL
- Jeringas de 50 y 100 μ L
- Papel filtro Reeve Angel

Método

Preparación de muestra. Enfriar la muestra de 0-5°C por lo menos una hora. Filtrar la muestra en frío con papel Reeve Angel. Medir 10 mL de muestra fría en una probeta de vidrio previamente enfriada. Transferir la muestra a un vial de 20mL (enfriado previamente en baño de agua con hielo) y adicionar 20 μ L de estándar interno y sellar con septa y tapa de aluminio. Agitar el vial de 30 a 60 segundos. Colocar los viales en el headspace, asignar los parámetros del vial y comenzar la corrida.

Condiciones cromatográficas. Temperatura inicial de 68°C con un incremento de 15°C/min hasta alcanza 180°C, continuar con el incremento de 10°C/min hasta llegar a 200°C y finalmente alcanzar 220°C a una velocidad de 15°C/min y permanecer por 7 minutos.

Temperatura del inyector de 175°C, interfase de 220°C. Se utiliza nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 20mL/min.

El detector de quimiluminiscencia (SCD) opera a una temperatura de 800°C, presión 388 Torr, oxidantes 60 ml/min e hidrógeno 40 ml/min.

Curva de calibración. Se realiza el mismo procedimiento que para muestras de cerveza o producto de fermentación o reposo, pero se sustituye la muestra por etanol al 5% y se efectúan las adiciones según la Tabla 19.

Tabla 19. Adiciones de soluciones de para los diferentes niveles de concentración de la curva de calibración.

<i>Nivel</i>	<i>soln H₂S(μL)</i>	<i>soln Metanotiol(μL)</i>	<i>soln estándar(μL)</i>
1	10	10	10
2	20	20	20
3	40	40	30
4	50	50	40
5	70	70	50
6	90	90	70
7	120	120	80
8	140	140	100
9	160	160	110
10	200	180	120

Cálculos

El factor de respuesta es calculado de los coeficientes de regresión lineal graficando los μg/L de cada uno de los compuestos de azufre añadidos en el eje de las abscisas contra la relación del área de cada compuesto / área del estándar interno en eje de las ordenadas. El inverso de la pendiente será el factor de respuesta usado para calcular la cantidad de cada uno de los compuestos en la muestra.

VI. Parámetros fermentativos

A. Conteo de células

El conteo de células en suspensión se realizó por conteo directo usando un hemacitómetro y un microscopio con objetivo 40X e iluminación de campo, siguiendo el método Yeast-4 de ASBC 8th Edition.

Reactivos

- Agua destilada
- Solución buffer de fosfatos - salina (8.77 g de NaCl, 1.38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.67 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1000 mL agua destilada)
- Materiales y aparatos
- Microscopio óptico con iluminación de campo claro y objetivo 40X Marca Zeiss Modelo Primo Star.
- Hemacitómetro con cubreobjetos
- Contador digital o manual
- Pipetas serológicas de 1 mL
- Tubos de ensaye 16 x 125

Método

Limpiar hemacitómetro y cubreobjetos con agua destilada y secar perfectamente con seda o material suave no abrasivo.

Colocar el cubreobjetos sobre el hemacitómetro y centrarlo sobre el área de conteo cuidando cubrir por igual las secciones laterales de soporte.

Homogeneizar y en caso necesario diluir la muestra a cuantificar de tal manera que se logre un conteo confiable (no más de 48 células por cuadro).

Tomar una porción de la muestra con una pipeta de 1 mL , secar la punta y desechar las primeras 3 o 4 gotas, posteriormente dejar caer un gota entre el hemacitómetro y el cubreobjetos la cual deberá correr libremente hasta llenar el área de conteo, secar el excedente.

Colocar en microscopio con objetivo 40X y realizar conteo. Para eliminar la posibilidad de contar una misma célula dos veces se recomienda estandarizar criterio de conteo (contar solamente las células que toquen el borde inferior y lateral izquierdo de cada cuadro). Las células de levadura que estén gemando son contadas como una célula si la gema es menor que la mitad del tamaño de la célula madre, de lo contrario se cuantifica como una célula más.

Cálculos

El área central de conteo mide 1 mm de cada lado y una profundidad de 0.1 mm, dando un volumen de 0.1 mm^3 , lo cual equivale a $1/10,000 \text{ cm}^3$, para obtener el conteo de células por mililitro el conteo directo obtenido se debe multiplicar por 10,000. Si se utiliza dilución de la muestra se deberá tomar en cuenta para cálculo. Ejemplo:

Dilución de la muestra original = 1:10

Total de células en área de conteo (25 cuadros) = 180 células

Número de células / mL = $(180) \cdot 10 \cdot 10,000 = 18 \times 10^6 \text{ cel/mL}$

- B. Extracto aparente, extracto original y porcentaje de alcohol por medio de analizador de cerveza.

El principio de esta medición del equipo está basado en la velocidad del sonido para el caso del análisis de alcohol y en la frecuencia producida por un oscilador hueco para el análisis de densidad. Los extractos real, aparente y original se obtienen por medio de un procesador interno que realiza cálculos considerando los valores de alcohol y densidad.

Materiales y equipo

- Analizador de cerveza Anton Paar con automuestreador SP-1
- Viales
- Matraces erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL
- Embudos de filtración
- Papel filtro Whatman No. 2, 4 y 5
- Papel filtro Reeve Angel No. 202
- Papel filtro para filtración media
- Papel aluminio
- Alcohol etílico absoluto grado reactivo al 96%
- Agua destilada
- Trace Kleen o Extran neutro

Método

Preparación de muestra. Atemperar la muestra a una temperatura de 10 – 15°C. Descarbonatar la muestra transfiriendo a un matraz de 500 mL agitando suavemente al principio y vigorosamente después hasta que cese el desprendimiento de gases. Filtrar primero con papel Reeve Angel y después con papel Whatman No. 5, ambas filtraciones deben llevarse a cabo en refrigeración cubriendo los embudos con papel aluminio para evitar evaporación.

Calibración de analizador de cerveza con aire. Verificar que la lectura en la pantalla digital g/cm^3 esté en cero y la temperatura a 20°C, digitar la clave F100 y presionar ENTER, deberá aparecer en la pantalla el número 0.001204 (lo cual corresponde a la densidad del aire a 20°C), oprimir la tecla cero del tablero y presionar ENTER, esperar que la lectura sea cero.

Calibración del analizador de cerveza con agua. Colocar un vial con agua destilada en el compartimento del carrusel, presionar START y esperar a que el agua sea absorbida por la aguja de absorción, esperar que la pantalla digital se estabilice en 1.00000, teclear la clave F101 y presionar ENTER, deberá aparecer en la pantalla el número 0.998204 (lo cual corresponde a la densidad del agua a 20°C), oprimir la tecla con el número 1 y presionar ENTER. Esperar a que la lectura se estabilice y volver a presionar ENTER para continuar con las mediciones. Las constantes v (velocidad del sonido) y d (densidad) deben dar con agua destilada un valor de 0.0001, si esto no se diera se recomienda lavar

las celdas. Antes de cada determinación se deber verificar la densidad del agua y las constantes de sonido y densidad.

Funcionamiento del analizador de cerveza. Oprimir F361 y dar ENTER, teclear el factor de corrección y oprimir ENTER, colocar en el carrusel el vial con la muestra y oprimir START. Esperar que el analizador indique la muestra ha sido procesada y los resultados queden impresos. Es muy importante verificar que la celda esté libre de burbujas de aire y que la impresora tenga encendidas las opciones de Power y Sel, en caso de detectar burbujas de aire en la celda oprimir STOP y reiniciar.

Limpieza. Al terminar de usar el analizador de cerveza se deberán llenar 3 viales con agua destilada, un vial con extran neutro al 10%, 3 viales con agua destilada y un vial con alcohol etílico, colocar todos los viales en el carrusel y oprimir START, esperar a que se haya absorbido el contenido de cada vial y oprimir STOP. Mover la palanca de la bomba hacia el lado derecho, colocar la manguera de silicón de salida de aire dentro de la aguja de absorción, encender la bomba de aire y esperar hasta que la lectura en pantalla sea de 0.0000 (aproximadamente 10 minutos), apagar bomba, colocar palanca en posición central y apagar analizador.

Cálculos y resultados

Los resultados que se imprimen en la tira de papel son los siguientes:

Date	Fecha (año – mes – día)
Time	Tiempo (hora – minuto – segundo)
Temp	Temperatura (°C)
Density	Densidad
v	Constante de velocidad del sonido
d	Constante de densidad
% A w/w	Alcohol, por ciento en peso
% E real	Extracto real, por ciento en peso
% A v/v	Alcohol, por ciento en volumen
% E orig	Extracto original, por ciento en peso
% E app	Extracto aparente, por ciento en peso

C. Diacetilo

La determinación de diacetilo se realizó por cromatografía de gases siguiendo como base el método Beer-25 inciso E de la ASBC.

Reactivos

- 2,3 Hexanediona. Para solución stock disolver 250 mg en agua para prepara 50 mL de solución (estable de 1-2 meses en refrigeración). Solución de trabajo diluir 1 mL de stock en 100 mL de agua.
- Diacetilo, las soluciones stock y de trabajo son preparadas igual que 2,3 Hexanediona.
- 2,3 Pentanodiona las soluciones stock y de trabajo son preparadas igual que 2,3 Hexanediona.

Materiales y aparatos

- Cromatógrafo de gases marca Shimadzu modelo GC-17A con headspace y detector de captura de electrones.
- Columna HP 5 30 m x 0.25 mm marca Agilent
- Jeringas
- Viales
- Papel filtro Reeve Angel 202
- Baño de agua de 60°C
- Horno a 45°C

Método

Preparación de muestra. Enfriar muestra entre 0-10 °C, descarbonatar la muestra con agitación suave en un vaso de precipitados y filtrar con papel filtro Reeve Angel.

Condiciones cromatográficas. Temperatura del inyector y detector a 150°C, columna a 45°C, helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL / min.

Curva de calibración. Se realiza el mismo procedimiento que para muestras de cerveza terminada, pero se efectúan las adiciones según Tabla 20.

Tabla 20. Adición de soluciones de calibración para los diferentes niveles de concentración de la curva de calibración.

<i>Nivel</i>	<i>soln de diacetilo(μL)</i>	<i>soln de 2,3 pentanodiona(μL)</i>
1	10	10
2	25	25
3	50	50
4	100	100
5	150	150
6	200	200
7	400	400
8	600	600

Cálculos

El factor de respuesta es calculado de los coeficientes de regresión lineal graficando los μg/L de cada compuestos añadidos en el eje de las abscisas contra la relación del área de cada compuesto / área del estándar interno en eje de las ordenadas. El inverso de la pendiente de la curva de calibración será

el factor de respuesta usado para calcular la cantidad de cada compuesto en la muestra

D. Acetaldehído, acetato de etilo, acetato de isoamilo y alcoholes isoamílicos.

La determinación de volátiles se realizó por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID).

Reactivos

- Agua destilada
- Acetato de etilo
- Acetato de isoamilo
- Alcohol de iso-butilo
- Alcohol n-propilo
- Alcohol isoamílico
- Alcohol n-butilo
- Etanol
- Etanol 4%
- Estándar interno. Diluir 1 mL de n-butilo en 100 ml de agua destilada.
- Solución de calibración A. Adicional 1 mL de acetato de etilo, 0.2 mL de acetato de isoamilo, 2.0 mL alcohol n-propilo, 1.0 mL de alcohol isobutilo y 4 mL de alcohol isoamílico a un matraz de de aforación de 100 mL, llevar al volumen de aforación con etanol .
- Solución de calibración B. Diluir 4 mL de solución de calibración A con 25 ml de agua destilada.
- Papel filtro Whatman No.4 y No. 12

Aparatos

- Cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 7890A con headspace y detector de ionización de flama (FID)
- Columna DB-WAX 30 m, ID 0.53 J&B&W Scientific
- Papel filtro Reeve Angel
- Probetas 10 mL
- Viales, septas y arillos de aluminio

Método

Preparación de muestra. Se enfría la cerveza entre 0-10 °C y si es necesario se filtra con papel Reeve Angel. Se miden 10 mL de muestra fría en una probeta de vidrio (previamente enfriada) y se transfieren a un vial de 20mL (previamente enfriado), se adiciona el estándar interno y se sella con septa y tapa de aluminio. Se agita y se coloca en el headspace.

Condiciones cromatográficas. Temperatura de inyector de 200°C, temperatura del detector de 280°C, Helio como gas acarreador con caudal de 10 mL/min.

Curva de calibración. Se realiza el mismo procedimiento que para muestras de cerveza terminada o producto en proceso, pero se sustituye la cerveza por etanol al 4% y se efectúan las adiciones según

Tabla 21.

Tabla 21. Adiciones de solución de calibración para los diferentes niveles de concentración de la curva de calibración.

<i>Nivel</i>	<i>soln de calibración B</i> (μL)
1	10
2	25
3	50
4	75
5	100
6	125

Cálculos

El factor de respuesta es calculado de los coeficientes de regresión lineal graficando los $\mu\text{g/L}$ de cada compuestos añadidos en el eje de las abscisas contra la relación del área de cada compuesto / área del estándar interno en eje de las ordenadas. El inverso de la pendiente de la curva de calibración será el factor de respuesta usado para calcular la cantidad de cada compuesto en la muestra.

10 Referencias

1. Arfi K, Spinnler H, Tache R, Bonnarme P. (2002). Production of Volatile Compounds by Cheese-ripening Yeast: Requirement for a Methanethiol Donor for S-Methyl thioacetate Synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 503-510.
2. Asociación Nacional de Fabricantes de Cerveza. (2005). www.anafacer.com.mx. Recuperado el 27 de Marzo de 2010.
3. Bamforth C. (2003). Wort Composition and Beer Quality. En K. Smart (Ed). *Brewing Yeast Fermentation Performance*. Segunda Ed. págs. 77-84. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
4. Benjamini Y. y Hochberg Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 57 (1): 289-300.
5. Blaiseau P, Isnard A, Surdin-Kerjan Y, Thomas D. (1997). Met31p and Met32p, Two Related Zinc Finger Proteins, Are Involved in Transcriptional Regulation of Yeast Sulfur Amino Acid Metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 17 (7): 3640 - 3648.
6. Boulton C. y Quain D. (2003). *Brewing Yeast and Fermentation*. Primera Ed. págs. 69-142. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
7. Burmeister M, Drummond C, Pfisterer E, Hysert W. (1992). Measurement of Volatile Sulfur Compounds in Beer Using Gas Chromatography with a Sulfur Chemiluminescence Detector. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 50 (2): 53-58.
8. Cañamar C. (2007). Impacto del Contenido de Alfa Amino Nitrógeno en el Mosto para Producir Cerveza, sobre la síntesis de Diketonas Vecinales y Alcohol Isoamílico en una Fermentación Utilizando Levadura *Saccharomyces uvarum*. San Nicolás de los Garza, N.L., México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
9. Carey D. y Grossman K. (2006). Fermentation and Cellar Operations. En K. Ockert (Ed). *Fermentation, Cellaring and Packaging Operations. Vol 2*. págs. 1-45. Portland, Oregon, USA: Master Brewers Association of the Americas.

10. Casey G. (2007). Supply Chain Lesson in Improved Process Control for Product Quality Attributes and Plant Productivity Metrics as Captured in Fishbone Diagrams. En P. W. Gales (Ed). *Brewing Chemistry and Technology*. págs. 181-183. St. Paul, Minnesota, USA: American Society of Brewing Chemists.
11. *Cerveceros de España*. (2007). www.cerveceros.org. Recuperado el 07 Diciembre de 2010.
12. Coghe S, Martens E, D'Hollander H, Dirinck P, Delvaux F. (2004). Sensory and Instrumental Flavour Analysis of Wort Brewed with Dark Specialty Malts. *Journal of the Institute of Brewing* 110 (2): 94-103.
13. Critchlow D. y Fligner M. (1991). Paired Comparison, Triple Comparison and Ranking Experiments as Generalized Linear Models and their Implementation on GLIM. *Psychometrika* 56 (3): 517-533.
14. Damas L. (2008). Evaluación y Análisis de la Expresión Genética de *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones de Fermentación que Afectan la Floculación. San Nicolás de los Garza, N.L., México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
15. Dercksen A, Torline P, Axcell B, Rohwer E. (1996). Quantitative Analysis of Volatile Sulfur Compounds in Beer Using a Membrane Extration Interface. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 54 (4): 228-233.
16. Drews B, Barwald G, Niefind H. (1969). Some Metabolic Products of Beer Yeast and Their Significance in Fermentation Technology. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas* 6 (3): 193-197.
17. Duan W. y Roddick F. (2004). A Parallel Analysis of H₂S and SO₂ formation by Brewing Yeast in Response to Sulfur-containing Amino Acids and Ammonium Ions. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 62 (1): 35-41.
18. Dufour J, Malcorps P, Silcock, P. (2003). Control of Ester Synthesis during Brewery Fermentation. En K. Smart (Ed.), *Brewery Yeast Fermentation Performance*. Segunda Ed. págs. 213 - 230. Oxford, UK: Blackwell Publishing.

19. Edney M. y Langrell D. (2005). Effect of Fermentable Sugars and Amino Acids on Fermentability of Malts Made from Four Barley Varieties. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas* 42 (2): 101-106.
20. Fahy A. y Spencer J. (1999). Wort Production. En J. McCabe (Ed.), *The Practical Brewer*. Tercera Ed. págs. 99-100. Wauwatosa, WI: Master Brewers Association of the Americas.
21. Firth D. (2005). Bradley-Terry Models in R. *Journal of Statistical Software* 12 (1).
22. *Food and Drug Administration*. (2010). www.fda.gov. Recuperado el 7 de Diciembre de 2010.
23. Gales P. (Ed). (2007). *Brewing Chemistry and Technology*. St. Paul, Minnesota, USA: American Society of Brewing Chemists.
24. Gibson B, Boulton C, Box W, Graham N, Lawrence S, Linforth R. (2009). Amino Acid Uptake and Yeast Gene Transcription During Industrial Brewery Fermentation. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 67 (3): 157-165.
25. Grant W. (1947). Colorimetric Determination of Sulfur Dioxide. *Analytical Chemistry* 19 (5): 345-347.
26. Hardwick W. (1995). History and Antecedents of Brewing. En W.A. Hardwick (Ed), *Handbook of Brewing*. págs. 37-52. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
27. Hardwick W. (1995). The Properties of Beer. En W. A. Hardwick (Ed), *Handbook of Brewing*. págs. 551-581. New York, USA: Marcel Dekker Inc.
28. Hill P. y Smith R. (2000). Determination of Sulphur Compounds in Beer Using Headspace Solid-phase Microextraction and Gas Chromatographic Analysis with Pulsed Flame Photometric Detection. *Journal of Chromatography A* , 872: 203-213.
29. Kramer P. (2006). Barley, Malt and Malting. En K. Ockert (Ed), *Practical Handbook for Specialty Brewer*. Vol 1. págs. 15-16., Portland, Oregon USA: Master Brewers Association of the Americas.

30. Kunze W. (1999). *Technology Brewing and Malting*. Segunda Ed. Berlin, Germany: VLB.
31. Laundaud S, Helinck S, Bonnarme, P. (2008). Formation of Volatile Sulfur Compounds and Metabolism of Methionine and Other Sulfur Compounds in Fermented Foods. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 1191-1205.
32. Leal C. (2010). Regulación de la Expresión de Genes Involucrados en la Producción de Compuestos de Azufre en *Saccharomyces cerevisiae*. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
33. Lekkas C, Hill A, Taidi B, Hodgson J, Steward G. (2009). The Role of Small Wort Peptides in Brewing Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing* 115 (2): 134-139.
34. Lekkas C, Steward G, Hill A, Taidi B, Hudgson J. (2005). The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas* 42 (2): 113-116.
35. Lekkas C, Stewart G, Hill A, Taidi B, Hodgson J. (2007). Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in Yeast Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* 113 (1): 3-8.
36. Lewis M. y Young T. (1995). *Brewing*. London, UK: Chapman & Hall.
37. Li H, Jia S, Zhang W. (2008). Rapid Determination of Low Level Sulfur Compounds in Beer by Headspace Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detector. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 66 (3): 188-191.
38. Linderholm A, Findleton C, Kumar G, Hong Y, Bisson F. (2008). Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (5): 1418-1427.
39. Marsili R. (2007). Comparing Sensory and Analytical Chemistry Flavor Analysis. En R. Marsili (Ed), *Sensory-Directed Flavor Analysis*. págs. 1-22. Rockford, Illinois: Taylor & Francis Group.

40. Matsui S. y Amaha M. (1981). Production of S-Methyl Thioacetate from Methyl Mercaptan by Brewer's Yeast. *Agricultural and Biological Chemistry* 45 (6): 1341-1349.
41. Meilgaard M. (1981). *Beer Flavor*. Denmark University.
42. Meilgaard M. (1982). Prediction of Flavor Differences between Beers from Their Chemical Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 1009-1017.
43. Meilgaard M. (1999). Wort Composition. En J. McCabe (Ed), *The Practical Brewer. Tercera Ed.* págs. 147-163. Wauwatosa, WI: Master Brewers Association of the Americas.
44. Meilgaard M, Civille G, Carr T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques* Tercera Ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
45. Methods of Analysis ASBC. (1992). *8th*. St Paul, MN: American Society of Brewing Chemists.
46. Miracle R, Ebeler S, Bamforth C. (2005). The Measurement of Sulfur-Containing Aroma Compounds in Samples from Production-Scale Brewery Operations. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 63 (3): 129-134.
47. O'Connor-Cox E. y Ingledew M. (1989). Wort Nitrogenous Sources - Their Use by Brewing Yeasts: A review. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 47 (4): 102-108.
48. Owades J. y Plam M. (1988). The Influence of Brewing Processes on Volatile Sulfur Compounds in Beer. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas* 25 (4): 134-136.
49. Patterson C. y Ingledew W. (1999). Utilization of Peptides by Lager Brewing Yeast. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 57 (1): 1-8.
50. Pedrero D. y Pangborn R. (1989). *Evaluación Sensorial de los Alimentos*. México: Ed. Alhambra.
51. Perpéte P, Duthoit O, De Maeyer S, Imray L, Lawton A, Stavropoulos K. (2006). Methionine Catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Res* 6: 48-56.

52. Perpète P, Gijs L, Collin S. (2003). Methionine: A Key Amino Acid for Flavour Biosynthesis in Beer. En K. Smart (Ed), *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Segunda Ed. págs. 206-211. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
53. Perpète P, Santos G, Bodart E, Collin S. (2005). Uptake of Amino Acids During Beer Production: The Concept of a Critical Time Value. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 63 (1): 23-27.
54. Pickerell T, Hwang A, Axcell, B. (1991). Impact of Yeast-Handling Procedures on Beer Flavor Development During Fermentation. *Journal of American Society of Brewing Chemists* 49 (2): 87-92.
55. Rauhut D. (2009). Usage and Formation of Sulphur Compounds. En H. König (Ed), *Biology of Microorganism on Grapes, in Must and Wine*. págs. 181-199. Berlin: Springer-Verlag.
56. Sánchez G. (1999). Water. En J. McCabe (Ed), *The Practical Brewer. Tercera Ed.* págs. 33-34. Wauwatosa, WI: Master Brewers Association of the Americas.
57. Sidor L. (2006). Hops and Preparation of Hops. En K. Ockert (Ed), *Practical Handbook for the Specialty Brewers*. Vol 1. págs. 73-74. St Paul, MN: Master Brewers Association of the Americas.
58. Stewart G. y Russell I. (1993). Fermentation - The Black Box of the Brewery Process. *Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas* 30(4): 159-168.
59. Thomas D. y Surdin-Kerjan Y. (1997). Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (4): 503-531.
60. Urrea V. (2009). *Detección de Interacciones Genéticas Asociadas a Enfermedades Complejas. Aplicación al Cáncer de Vejiga*. Cataluña, España: Universidad Politécnica de Cataluña.
61. Van Haecht J. y Dufour J. (1995). The Production of Sulfur Compounds by Brewery Yeast: a Review. *Cerevisia and Biotechnology* 20 (1): 51-64.

62. Vermeulen C, Gijs L, Collin S. (2005). Sensorial Contribution and Formation Pathways of Thiols in Foods: A Review. *Food Reviews International* 21: 69-137.
63. Walker M. y Simpson W. (1993). Production of volatile sulphur compounds by ale and lager brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology* 16: 40-43.
64. Waters AccQ Tag Chemistry Package Instruction Manual. (1993). Milford, MA: Millipore Corporation.

Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey



30002007368178

<http://biblioteca.mty.itesm.mx>