

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**IMPACTO DEL CONTENIDO DE ALFA AMINO NITRÓGENO EN EL MOSTO
PARA PRODUCIR CERVEZA, SOBRE LA SÍNTESIS DE DICETONAS
VECINALES Y ALCOHOL ISOAMÍLICO EN UNA FERMENTACIÓN
UTILIZANDO LEVADURA
*Saccharomyces uvarum.***

Por

CARLOS ALBERTO CAÑAMAR PIMENTEL

**Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Industrial.**

Diciembre del 2007

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN.

Antiguamente, la mayor parte de la producción de cerveza se basaba en algún cereal malteado (Hardwick 1999). A partir de que la producción de cerveza comenzó a realizarse a nivel industrial, el uso de adjuntos se convirtió en una ventaja de costos y productividad para las industrias (Bradee 1999). La utilización de adjuntos es actualmente un reto importante para las cervecerías. Hoy en día, el 90% de la cerveza en el mundo, es elaborada a partir de una mezcla de malta y adjuntos (Le Van y colab. 2001).

La producción de cerveza se puede acotar en tres pasos básicos: La transformación del grano en malta, la malta en mosto y el mosto en cerveza a través de la fermentación (Canales 1983).

En Alemania, existe una ley para la producción de cerveza que se denomina “Ley de Pureza” y define al adjunto como todo aquello que no sea malta, levadura, lúpulo o agua. De hecho, el documento original del año 1516 no mencionaba la levadura. A partir de 1906 esta ley se hizo oficial en este país. En el Reino Unido, el Comité Estándar de Alimentos (Foods Standard Committee) define al adjunto cervecero como cualquier fuente de carbohidrato diferente a la cebada malteada, la cual contribuye con azúcares en el mosto. (Stewart 1994). En la época precolombina en México, se preparaban bebidas alcohólicas fermentadas a partir del maíz. El cultivo de maíz en México se remonta a 9,000 años de nuestra época (Canales 1983). En algunos países de África, el uso de granos de sorgo para preparar bebidas alcohólicas locales está ampliamente diseminado, incluso; en Nigeria se ha empleado el grano de sorgo malteado para elaboración de cerveza. Esta práctica también se ha extendido en México. (Ratnavathi y colab. 2000). En el Sur de Asia, el arroz es el cereal usado más frecuentemente debido a las grandes áreas de cultivo que se dedican a este cereal. El arroz es tradicionalmente considerado como materia

prima para elaborar cerveza y en algunos países, se usa en proporciones del 30 al 50% (Le Van y colab. 2001).

Una gran cantidad de materiales pueden incluirse en las definiciones de adjunto, los cuales se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Material sólido no malteado procesado en la casa de cocimientos de una cervecería.
2. Adjuntos líquidos añadidos en la parte final de la casa de cocimientos.
3. Cereales mateados diferentes a la cebada, como el trigo y el sorgo

La malta es cuantitativamente el más importante cereal usado por los cerveceros. La malta americana es elaborada para ser diluida con adjuntos, en algunos casos por arriba del 50% de Azúcares fermentables. Las cervecerías de gran tamaño hacen esto para controlar el precio de producción y para mejorar la brillantez y estabilidad física de las cervezas domésticas tipo Lager. (Stewart 1994). Los adjuntos diluyen el color y sabor que la malta proporciona a la cerveza. Las enzimas presentes en la malta, especialmente las amilasas, las proteínas y el Alfa Amino Nitrógeno (AAN) también son diluidas (Stewart 1994, Ratnavathi y colab. 2000). La malta americana es elaborada para tolerar esta dilución (Lewis 2003).

El proceso para la elaboración de malta a partir de la cebada se puede resumir en 4 etapas:

1. Preparación de la cebada para el malteo
2. Remojo
3. Germinación
4. Secado

En la Tabla I, se muestran los datos comparativos de la composición química de la cebada y de la malta, durante el malteo se busca que el nivel de

aminoácidos y péptidos aumente para que éstos sean utilizados por la levadura durante la fermentación del mosto a partir de la malta.

Tabla I.- Composición química de cebada y malta (Hough y colab. 1981)

Fracción	Proporciones (% peso seco)	
	Cebada	Malta
Almidón	63-65	58-60
Sacarosa	1-2	3-5
Azúcares reductores	0.1-0.2	3-4
Otros azúcares	1	2
Gomas solubles	1-1.5	2-4
Hemicelulosas	8-10	6-8
Celulosa	4-5	5
Lípidos	2-3	2-3
Proteína (N X 6.25)	8-11	8-11
Hordeina	3-4	2
Glutelina	3-4	3-4
Albúmina	0.5	2
Globulina	3	-
Aminoácidos y péptidos	0.5	1-2
Ácidos nucleicos	0.2-0.3	0.2-0.3
Minerales	2	2.2
Otras sustancias	5-6	6-7

En la preparación de la cebada para el malteo, esta es recibida del campo y es cribada para eliminar posibles impurezas como piedras, ramas o insectos, también; otro de los objetivos es el hacer una separación por granulometría, esto permite un homogéneo germinado del grano al evitar que los diferentes tamaños de este germinen a velocidades distintas, provocando una afectación en la calidad de la malta. El proceso de remojo consiste en humedecer la malta en tanques con agua durante un período definido de tiempo, intercalando el

remojo con períodos de aireación, los dos objetivos principales son el de limpiar la malta con el agua y el de lograr que la humedad aumente de valores promedio de 12 % a valores entre 38% y 42% de humedad. En la etapa de germinación es donde la cebada comienza el proceso de crecimiento y desarrollo enzimático, comienza el crecimiento de la plúmula. El proceso por lo general dura en promedio de 3 a 5 días, dependiendo la variedad de la cebada usada. Durante el malteo, las reservas de proteína en el endosperma de la cebada, las cuales representan alrededor del 10% del total del grano, son parcialmente hidrolizadas a péptidos solubles y amino ácidos. Cerca del 8% de la proteína de la cebada es hidrolizada a amino ácidos. La cantidad de AAN en la malta depende de la variedad de la cebada, el contenido de nitrógeno y el proceso y condiciones de malteo empleado. Las enzimas relacionadas con la producción de AAN en la malta son las proteinasa y peptidasas (Axcell y colab. 1984). La cebada contiene una serie de proteasas, incluyendo al menos 5 endopeptidasas las cuales se incrementan de manera considerable durante el proceso de malteo (Hough y colab. 1981). Cuando la malta alcanza su nivel óptimo de germinación, comienza la etapa de secado, donde es calentada con aire caliente hasta alcanzar temperaturas cercanas a los 80°C y la humedad es reducida a niveles promedio de 5%. En esta etapa, el crecimiento se detiene y la malta posteriormente es almacenada para ser enviada al proceso de molienda y elaboración del mosto para elaborar cerveza.

Las levaduras cerveceras necesitan de carbohidratos, minerales y fuentes de nitrógeno para llevar a cabo sus procesos metabólicos mediante los cuales se producirá cerveza (Lewis y Young 1998). La utilización de adjuntos (cereales no malteados), provoca una disminución en los niveles de aminoácidos y péptidos en el mosto determinados como AAN. Se reportan resultados donde la sustitución de malta con un 40% de arroz reduce significativamente el crecimiento de la levadura a causa de la disminución del nitrógeno asimilable en el mosto, repercutiendo en los procesos metabólicos de la levadura. Esto conduce a fermentaciones más lentas y se puede influenciar negativamente la

calidad organoléptica de la cerveza (Le Van y colab. 2001). Algunas variables de operación que se pueden afectar por la variación de la concentración de nitrógeno asimilable en el mosto son:

- Reproducción de levadura
- Velocidad de atenuación (consumo de carbohidratos fermentables con respecto al tiempo)
- Producción y reducción de 2, 3-butanodiona y 2,3-pentanodiona (dicetonas vecinales)
- pH de la cerveza
- Producción de 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)

Sobre la base de los elementos anteriormente expuestos, se estableció la siguiente:

HIPÓTESIS.

“Al disminuir los niveles de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto que será fermentado por *Sacharomyces Uvarum* para producir cerveza, habrá un incremento en la producción de 2,3-butanodiona , 2,3-pentanodiona (dicetonas vecinales) y un aumento en la producción de 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)”

Para el desarrollo de este trabajo se definieron los siguientes objetivos:

1. Elaborar mostos con diferentes concentraciones de aminoácidos y péptidos medidos como AAN al variar la proporción de malta empleada en la formulación, y evaluar la producción y reducción de las dicetonas vecinales y producción de alcohol isoamílico durante las fermentaciones cerveceras.

2. Analizar bajo condiciones de laboratorio el efecto de la variación de Alfa Amino Nitrógeno (AAN) en los mostos sobre la viabilidad, vitalidad, floculación y reproducción de la levadura en las fermentaciones.

Tareas a desarrollar.

1. Formular y elaborar diferentes mostos con variaciones en su concentración de Alfa Amino Nitrógeno (AAN).
2. Seleccionar la levadura cervecera a emplear en las fermentaciones.
3. Establecer las condiciones de fermentación de los mostos por *Saccharomyces uvarum* , para producir cerveza.
4. Aplicar técnicas analíticas para la determinación de dicetonas vecinales, Alcohol isoamílico y AAN.
5. Aplicar técnicas microbiológicas para la evaluación de viabilidad, vitalidad, floculación y reproducción de la levadura en las fermentaciones.

Este trabajo presenta los siguientes aspectos novedosos.

- ❖ Se estudia el aporte de AAN en el mosto para producir cerveza a diferentes porcentajes de utilización de la malta Mexicana variedad Esmeralda.
- ❖ Se establece conocimiento acerca del efecto en la variación de AAN en el mosto sobre la producción de Dicetonas vecinales y Alcohol isoamílico, en una fermentación con *Saccharomyces uvarum*.
- ❖ Se establece conocimiento acerca del efecto en la variación de AAN en el mosto sobre la fisiología de la levadura *Saccharomyces uvarum*.

Aportes teóricos y prácticos de estos resultados.

- ❖ Se establece conocimiento sobre la aportación de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto por la variedad de Malta Mexicana Esmeralda y su efecto en el proceso de elaboración de cerveza. Este conocimiento se puede aplicar en el proceso industrial, al determinar los niveles adecuados de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto con el cual, el proceso de elaboración de cerveza puede llevarse a cabo sin afectaciones en el perfil organoléptico de la misma. A su vez, esto permite el establecimiento de porcentajes para el uso de adjuntos en las formulaciones de los mostos.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. Alfa Amino Nitrógeno (AAN) en el Mosto.

La levadura cervecera requiere adaptarse a un ambiente complejo en el mosto en términos de una gran variedad y rango de nutrientes. El mosto es un medio de crecimiento que contiene azúcares fermentables (fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa y maltotriosa), compuestos nitrogenados (amino ácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), vitaminas, iones, sales minerales, trazas de elementos y muchos otros constituyentes (Lekkas y colab. 2005).

Las células de levadura usan en forma preferencial los aminoácidos presentes en el mosto cervecero. La asimilación de nitrógeno por las células de levadura es usada para sintetizar aminoácidos que a su vez serán usados para sintetizar proteínas (Young 1996).

En el mosto, la principal fuente de nitrógeno para el metabolismo de la levadura son los aminoácidos individuales, pequeños péptidos y iones de amonio formados de la proteólisis de las proteínas de la malta. El mosto cervecero contiene aminoácidos y así como el consumo de azúcares tiene preferencia por la levadura, también sucede con los aminoácidos (Lekkas y colab. 2005).

Los aminoácidos han sido clasificados en cuatro grupos en base al patrón de asimilación por la levadura cervecera. En la tabla II se muestra esta clasificación. Los aminoácidos del grupo A son asimilados rápidamente por la levadura al empezar la fermentación, el grupo B, en el cual se incluyen la isoleucina y valina son asimilados después de la fase lag de uno a dos días de fermentación (Nakatani, 1984)

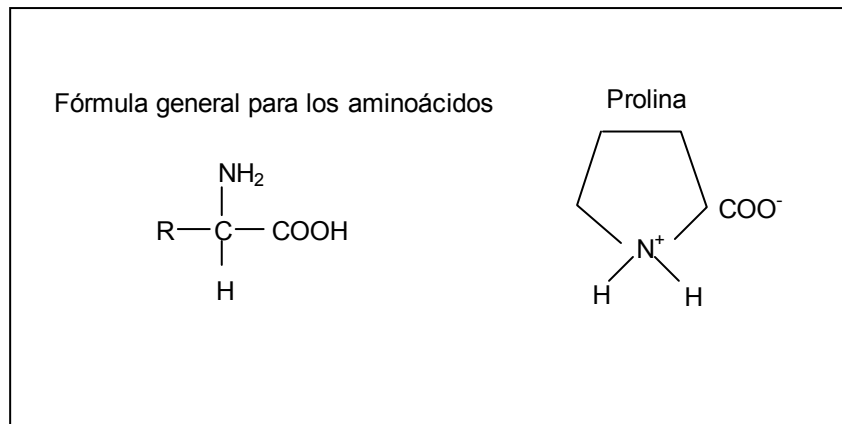
Tabla II.- Clasificación de aminoácidos por orden de asimilación durante la fermentación por *Saccharomyces uvarum* (Adaptado de Lekkas y col. 1989, Nakatani 1984).

Grupo.	Descripción de la asimilación.	Orden de la asimilación por reducción del tiempo medio.
A	Rápidamente al inicio de la fermentación (absorción rápida).	<ul style="list-style-type: none"> ○ Acido glutámico (Glu) ○ Ácido Aspártico (Asp) ○ Aspargina (Asn) ○ Glutamina (Gln) ○ Serina (Ser) ○ Treonina (Thr) ○ Lisina (Lys) ○ Arginina (Arg)
B	Después de la fase lag (absorción intermedia).	<ul style="list-style-type: none"> ○ Valina (Val) ○ Metionina (Met) ○ Leucina (Leu) ○ Isoleucina (Ile) ○ Hisitidina (His)
C	Después de la eliminación del grupo A de aminoácidos (absorción lenta).	<ul style="list-style-type: none"> ○ Glicina (Gly) ○ Fenilalanina (Phe) ○ Tirosina (Tyr) ○ Alanina (Ala)
D	Asimilado mínima o nula.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Prolina (Pro)

En el grupo C, se puede incluir el amonio como fuente de nitrógeno y solo son absorbidos cuando el grupo A ha sido consumido. En el caso de la prolina (Ver Figura 1), que es el amoniácido más abundante en el mosto proveniente de malta, no contiene un grupo amino libre y por consecuencia, no puede tomar parte directa en las reacciones de transaminación que ocurren en la levadura en el proceso de fermentación. Este aminoácido es usado de manera muy lenta por la levadura. La razón por la cual la prolina no sirve como fuente de

nitrógeno en la anaerobiosis es debido a que el gen que produce la enzima prolina oxidasa está localizado en la mitocondria y requiere una cadena de transporte de electrones funcional y la aerobiosis para su actividad. (O'Connor-Cox e Ingledew 1989).

Figura 1.- Estructura de la prolina y fórmula general de los aminoácidos (Lewis y Young 1998).



Los aminoácidos individuales y los pequeños péptidos (dipéptidos y tripéptidos) son conocidos colectivamente como AAN. Se considera la medición de AAN como un buen índice del potencial de crecimiento de la levadura y de eficiencia de la fermentación. Adecuados niveles de éstos en el mosto, aseguran la eficiencia del crecimiento de las células de levadura y por consecuencia una fermentación adecuada. La medición de estos compuestos en el mosto ha sido usada en la industria cervecera por que es una forma sencilla y disponible por método analítico. (Lekkas y col. 2005).

El nivel de aminoácidos en el mosto depende de la variedad de la cebada, las condiciones de malteo, los parámetros de maceración del mosto, pero en general, el espectro de aminoácidos es similar en los mostos. El uso de adjuntos diluye las sustancias nitrogenadas en el mosto mientras que se incrementa el extracto fermentable. Consecuentemente, en los mostos con una alta proporción de adjuntos, se tiene deficiencia de nitrógeno. Esto puede tener

afectaciones sobre los niveles de alcoholes superiores, dicetonas vecinales y ésteres, los cuales, están directamente relacionados con los perfiles de compuestos nitrogenados en el mosto. (O'Connor-Cox y col. 1989).

El AAN es producido en la cebada malteada y es una importante fuente de nutrientes que requiere la levadura para su crecimiento y condiciones óptimas de la levadura durante la fermentación (Agu 2007).

El crecimiento de la levadura es lineal a niveles superiores de 100 ppm de AAN. Se estima que este nivel es el mínimo requerido para mantener una levadura saludable y una velocidad adecuada de fermentación. Los niveles de estos compuestos en el mosto pueden variar de 100 a 250 ppm dependiendo del método de preparación del mosto y el nivel de adjunto empleado. Jones y Rainbow recomiendan niveles de AAN entre 140-150 ppm, Ingledew sugiere valores similares para mostos con °P normales (12°P). Basado en estos resultados, los mostos con niveles mayores de °P preparados con adjuntos y por consecuencia, limitación en el nivel de AAN, pueden exhibir un efecto mayor en la asimilación de nitrógeno debido al incremento de azúcares que han de ser fermentados. Una fermentación con un °P normal se considera en el rango de 12°P y una de alto nivel de °P está en niveles de 18°P (O'Connor-Cox y Ingledew, 1989).

2.2. Presencia de 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona en cerveza.

La presencia en la cerveza de los compuestos 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona es conocida en la industria cervecera como dicetonas vecinales (Barton and Slaughter 1992). Estos compuestos son de suma importancia en la industria cervecera, ya que su concentración final determina el período en que la cerveza debe permanecer en la fermentación y maduración (Petersen y colab. 2004 , Hannemann 2002), siendo esta etapa del proceso cervecero la mas prolongada en la elaboración de la cerveza (Knudsen 1999).

Tanto la 2,3-butanodiona como la 2,3-pentanodiona imparten un sabor a mantequilla a la cerveza que pudiera ser considerado indeseable en cervezas tipo lager. (Munroe 1994). El compuesto 2,3-butanodiona es conocido como diacetilo y sensorialmente tiene un impacto mayor que la 2,3-pentanodiona (Hough y colab. 1981). Los valores de detección organoléptica de las dicetonas vecinales se muestran en la Tabla III. A principios de 1960 se pensaba que ambos compuestos se presentaban en la cerveza como resultado de una contaminación microbiológica y que la levadura cervecera no tomaba parte en su formación. Niveles excesivos de diacetilo pueden resultar de la contaminación del mosto con bacterias como *Pediococcus* y *Lactobacillus*, sin embargo; con el entendimiento del metabolismo de la levadura, principalmente con el de las rutas metabólicas de los aminoácidos, ahora es aceptado que el metabolismo de la levadura produce la 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona durante la fermentación del mosto. (Stewart y Russell 1993).

Tabla III.- Dicetonas en cerveza (Lewis y Young 1998) .

Dicetona	Concentración típica en cerveza (ppm)	Límite de detección organoléptico (ppm)
2,3-butanodiona (diacetilo)	0.06	0.15
2,3-pentanodiona	0.01	0.90

La producción de dicetonas vecinales en cerveza esta relacionada al metabolismo de aminoácidos en la levadura, específicamente con la valina e isoleucina (Nakatani y colab.1984, Barton y Slaughter 1992). En la Figura 2 se puede observar como el diacetilo y la 2,3-pentanodiona son producidos a través de α -ceto ácidos que son intermediarios en las rutas metabólicas para la producción de valina e isoleucina respectivamente. Los α -ceto ácidos migran al exterior de la pared celular de la levadura y es en el medio externo donde a través de una reacción no enzimática, ocurre una oxidación y descarboxilación para la generación de la respectiva dicetona, estas a su vez, ingresan de nuevo a la levadura y son reducidas a su respectivo diol, sensorialmente estos compuestos tienen un umbral de detección menor que su respectiva dicetona vecinal. (Hough y colab. 1981). Ver Tabla IV.

Figura 2.- Esquema general de producción de dicetonas vecinales y reducción a su respectivo diol por la levadura (Adaptado de Barton and Slaughter 1992).

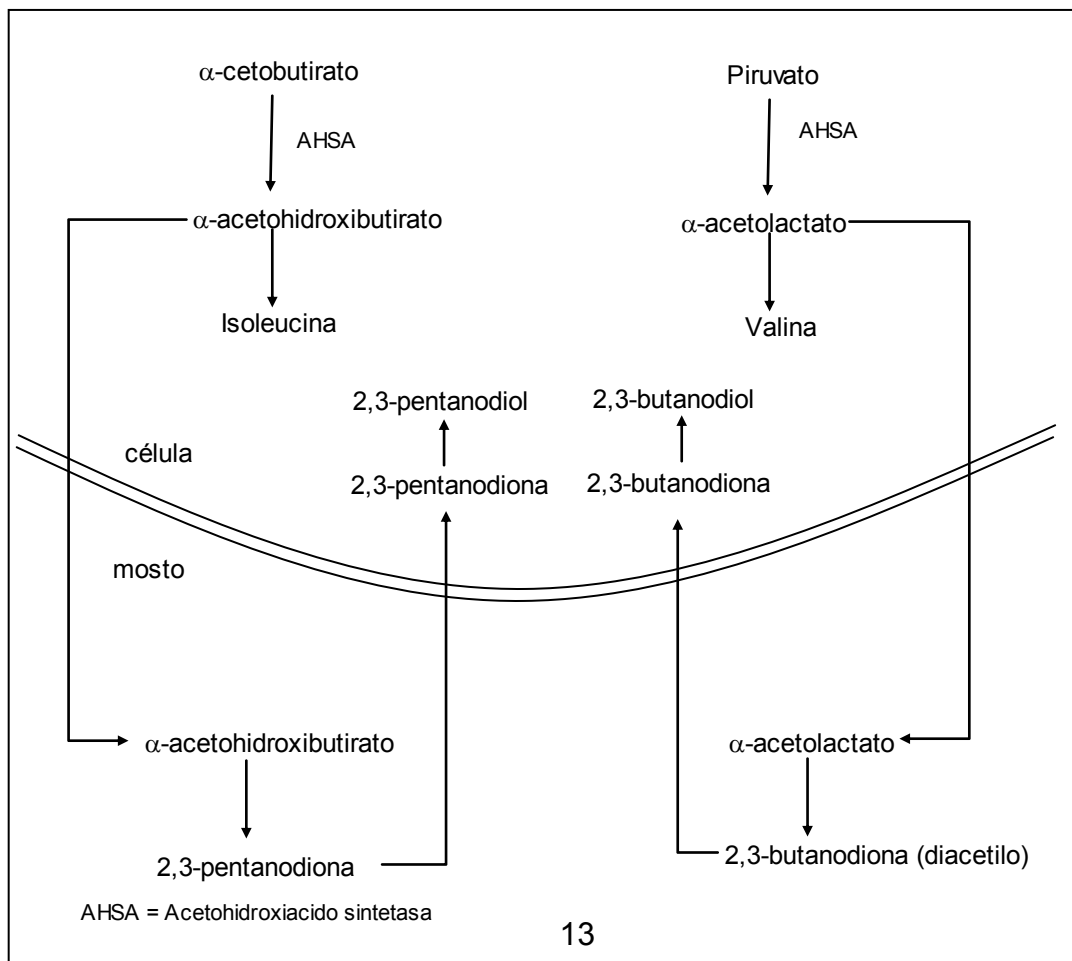


Figura 3.- Producción de diacetilo y reducción a 2,3 butanodiol por la levadura (Lewis y Young 1998).

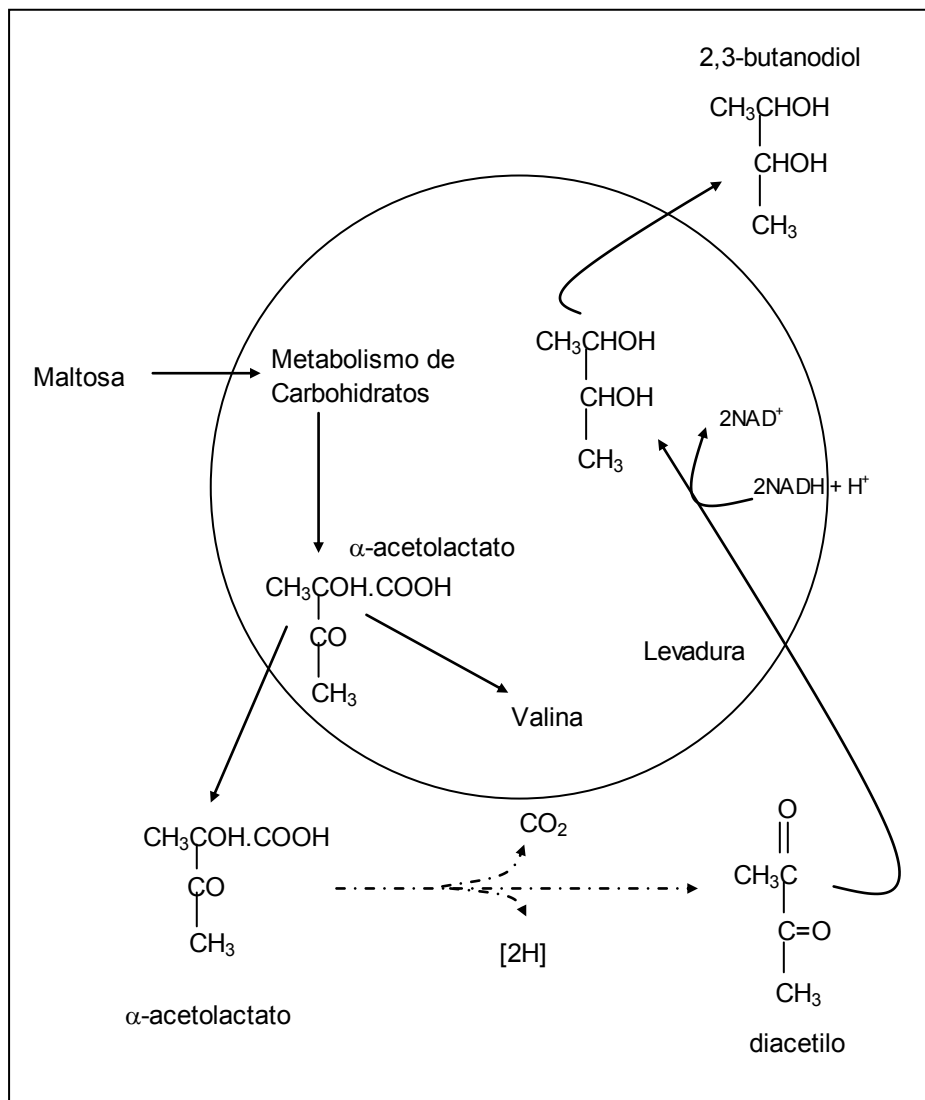


Tabla IV.- Umbrales de detección de los dioles correspondientes a la reducción de su respectiva dicetona vecinal (Hough y colab. 1981)

Dicetona (precursor)	Diol	Límite de detección organoléptico (ppm)
2,3-butanodiona (diacetilo)	Butanodiol	16
2,3-pentanodiona	Pentanodiol	45

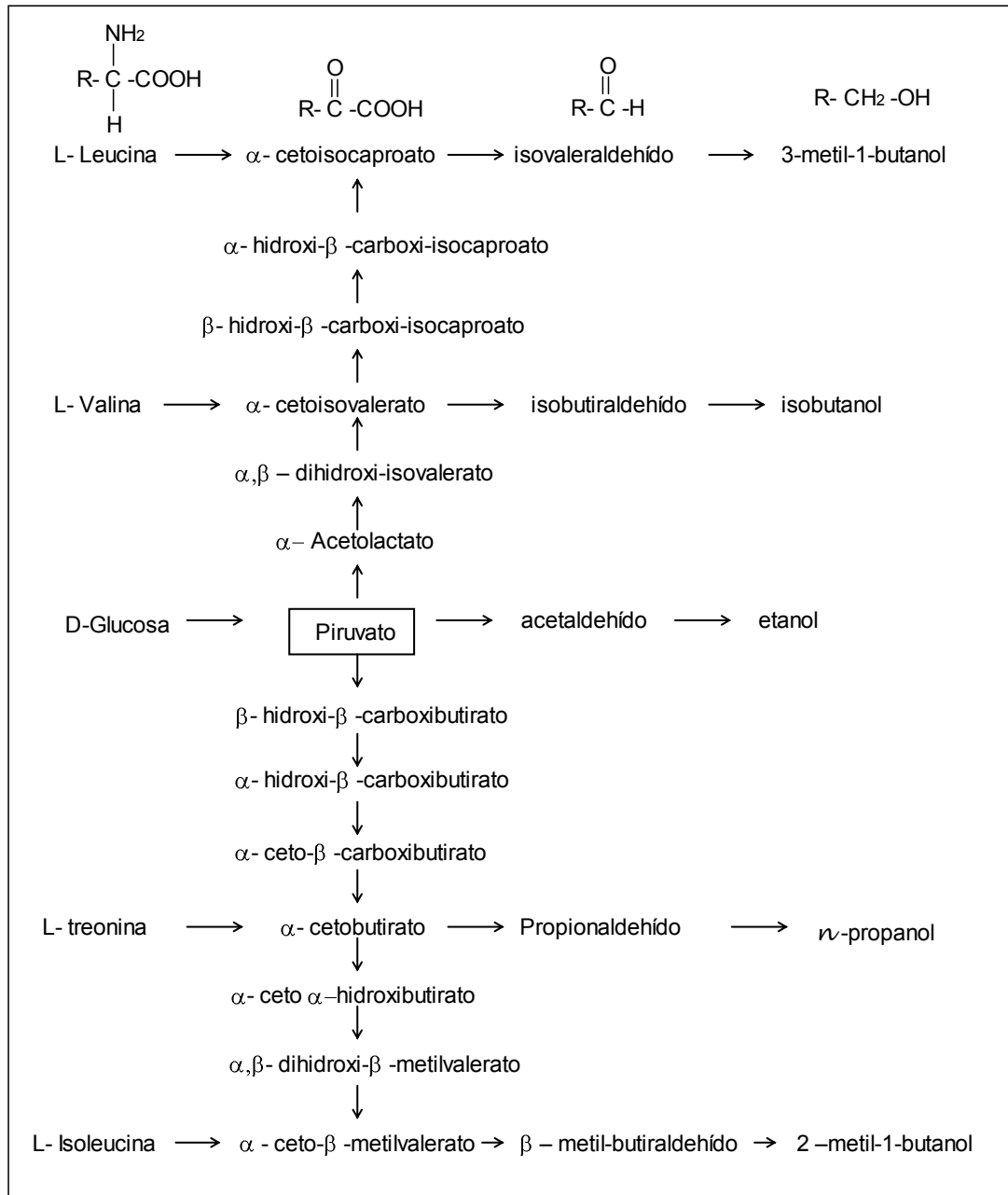
2.3. Presencia de alcohol isoamílico en cerveza.

El alcohol isoamílico ó 3-metil-1-butanol es un producto metabólico de la levadura en la producción de cerveza. Este alcohol tiene un bajo impacto en el sabor de la cerveza pero contribuye con una sensación de calentamiento en el paladar y en el estómago, así como la causa del dolor de cabeza y sensación de incomformidad que sigue a un excesivo consumo de cerveza (Hardwick 1994). Debido a lo anterior, la concentración del alcohol isoamílico debe ser controlada en el proceso de fermentación para elaboración de cerveza.

El principal alcohol en la cerveza es el alcohol etílico, otros alcoholes presentes son el alcohol isoamílico, propanol e isobutanol. La producción de estos alcoholes en la fermentación esta relacionado con la ruta de Erlich y el metabolismo de carbohidratos.

La producción de alcohol etílico está mas relacionada con el metabolismo de carbohidratos, mientras que a medida que se incrementa el número de carbonos en el alcohol, la producción por la ruta metabólica de carbohidratos disminuye y se incrementa la producción por la ruta de Erlich (Chen 1977), donde algunos aminoácidos son tomados por la levadura para ser transaminados para dar su respectivo α -ceto ácido, seguido de una descarboxilación y reducción donde se obtiene un alcohol con un átomo de carbón menor al del aminoácido original. En la Figura 4 se observa de manera general el metabolismo de los aminoácidos y la producción de aldehídos y alcoholes superiores, entre ellos esta el 3-metil-1-butanol. En la Figura 5 se muestra la interacción entre la ruta metabólica de los carbohidratos y la ruta de Erlich en la producción de los alcoholes en cerveza.

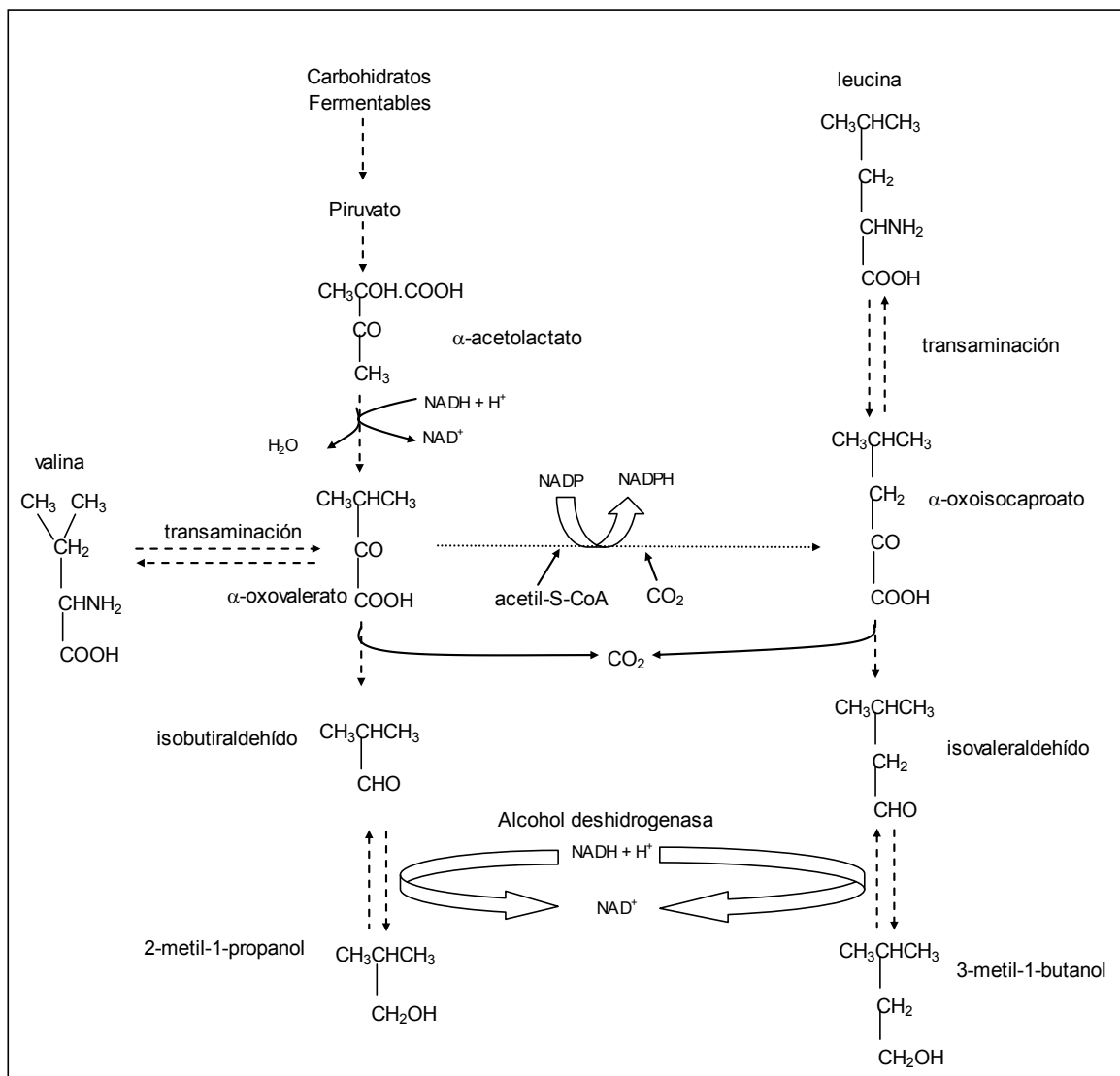
Figura 5.- Rutas metabólicas para la formación de los alcoholes, a partir de un Aminoácido o del Piruvato (Chen 1978).



El alcohol 3-metil-1-butanol, puede ser sintetizado a partir de un aminoácido o del piruvato. Ver Figura 6. Específicamente los aminoácidos precursores del alcohol isoamílico pueden ser la leucina y valina, ambos son transaminados para dar su respectivo α -ceto ácido, en el caso de la leucina, el α -ceto ácido

formado es el α -ceto isocaproico, el cual posteriormente es descaboxilado para sintetizar el isovaleraldehído, siendo este reducido para generar el alcohol isoamílico. En el caso de la valina, el α -ceto ácido fomado es el α -ceto valerico, este compuesto es oxidado y a través de una reacción anaplerótica, se integra una molécula de CO_2 para generar el α -ceto isocaproico. En el caso de la síntesis a partir del piruvato, el intermediario es el α -acetolactato el cual es reducido y es liberada una molécula de H_2O para generar el α -cetovalerico.

Figura 6.- Síntesis de 3-metil-1-butanol a partir de leucina, valina y piruvato (Hough y colab. 1981).



CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Preparación de los mostos.

Los mostos fueron formulados para obtener un valor final Azúcares fermentables de 17 ± 0.25 °P, lo que equivale a 17 ± 0.25 kg de Azúcares fermentables en 100 L de agua. Para su preparación se utilizó Malta variedad Esmeralda, Cebada variedad Esmeralda y Almidón de maíz marca Arancia. El volumen de cada mosto fue de 500 ± 25 L. Lo que equivaldría a preparar 85 ± 4.25 kg de azúcar fermentable. Se considera un factor de merma del 6.5% en la planta piloto donde se elaboraron los mostos para el cálculo de la materia prima a utilizar. Para la determinación del porcentaje de azúcares fermentables se empleó la metodología descrita por la American Society of Brewing Chemists (ASBC). Los porcentajes de azúcares fermentables por kg de materia prima para la elaboración de los mostos se indican en la tabla V.

Tabla V.- Porcentajes de azúcares fermentables por kg de materia prima utilizada.

Materia Prima	% Azúcares Fermentables
Malta Esmeralda	77.20
Cebada	64.50
Almidón de maíz refinado	93.20

Para obtener diferentes niveles de AAN en los mostos, se utilizaron diferentes proporciones de malta en su preparación. Estos porcentajes son mostrados en la Tabla VI.

Tabla VI.- Porcentajes de materias primas para la elaboración de mostos en base a los azúcares fermentables.

Materia Prima	Mosto 1	Mosto 2	Mosto 3
Malta	25%	35%	50%
Cebada	15%	15%	0%
Almidón de Maíz	60%	50%	50%

Con el % de Azúcares fermentables calculado y con el % de merma considerado en la elaboración de los mostos, se procedió a calcular el % de materia prima a usarse para obtener 3 diferentes valores de AAN en los mostos. Los valores obtenidos se muestran en la tabla VII.

Tabla VII.- Materias primas pesada para la elaboración de los mostos con diferentes formulaciones (expresadas en kg).

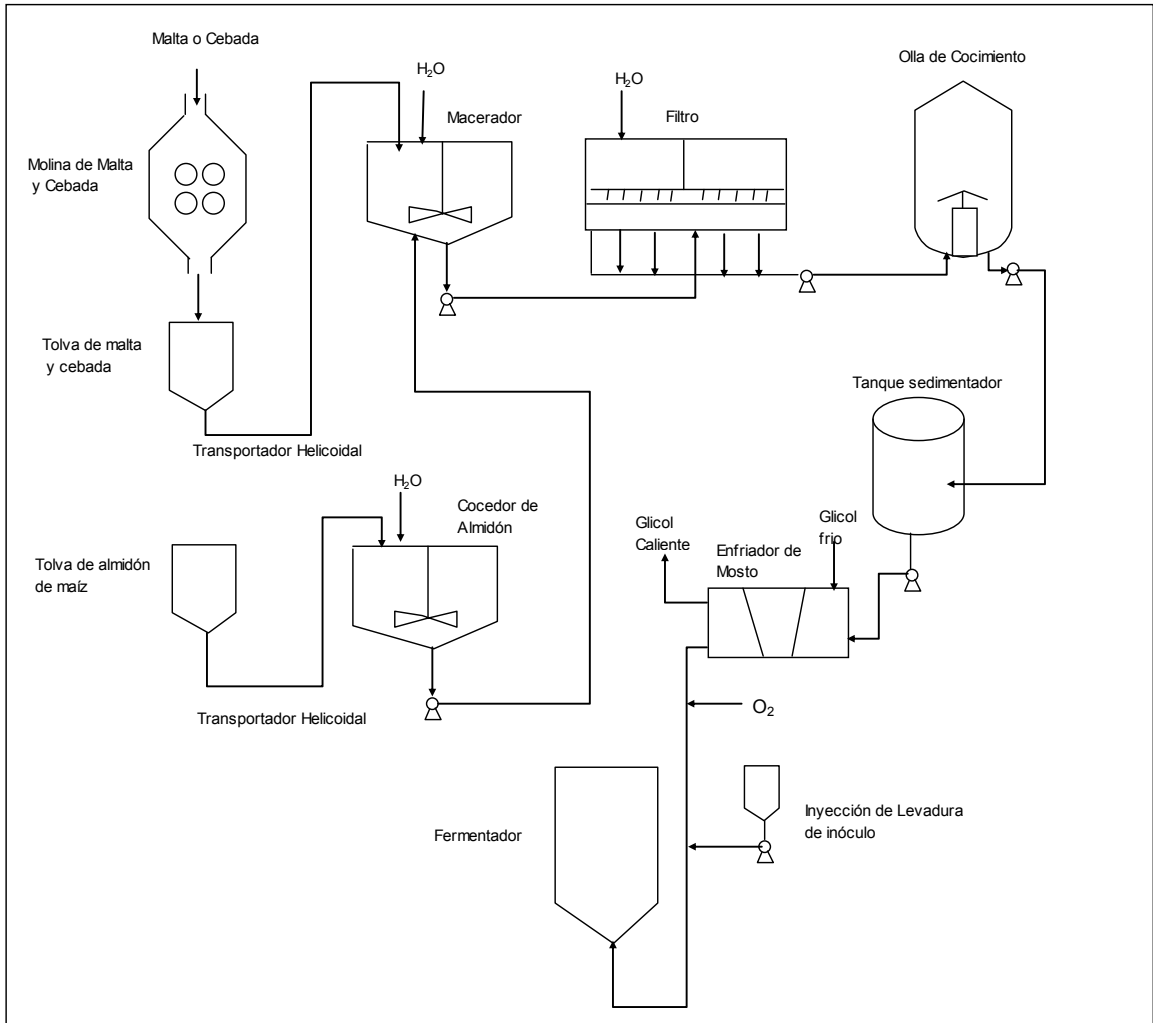
Materia Prima	Mosto 1	Mosto 2	Mosto 3
Malta	29.45	41.23	58.89
Cebada	21.15	21.15	0
Almidón de Maíz	58.54	48.78	48.78

Para la elaboración de los mostos, se empleó un molino marca Roskamp para moler la malta y cebada. Posteriormente a la molienda, el grano molido es transportado al macerador por medio de un transportador helicoidal. En este equipo, se mezcla el grano molido con una proporción de agua de 3 L por cada kg de malta y cebada molido. Al inicio, se recibe el grano molido en el macerador a una temperatura de 50°C y se reposa por 30 minutos. Durante la molienda del grano, el cocedor inicia su operación al recibir el almidón de maíz con una relación de agua de 4 L por kg de almidón de maíz, la temperatura inicial es de 55°C y se reposa por 20 minutos, al inicio se agregan 2.5 mg de enzima Termamyl 120 L marca Novo Enzymes por cada kg de almidón de maíz empleado en la fermentación con el objetivo de que el almidón pueda ser

desdoblado en azúcares de menor peso molecular. Posteriormente se incrementa la temperatura del cocedor a la velocidad de 1°C por minuto hasta alcanzar 65°C donde se reposa 10 minutos, al término de este reposo, se inicia el calentamiento hasta 98°C a razón de 1 °C por minuto. Al alcanzar la temperatura de 98°C, se reposa por 15 minutos y el producto es transferido al macerador , el cual se encuentra a 50°C. Por balance de materia y energía, la temperatura del producto del macerador (mezcla de malta y cebada molida y almidón de maíz) alcanza la temperatura de 68 a 72°C, a esta temperatura se reposa por 30 minutos para posteriormente incrementar la temperatura a 76°C y después de un reposo de 5 minutos, se inicia la transferencia al filtro. El objetivo del filtro es el de separar el bagazo (cascarilla de malta y cebada) del líquido en esta etapa denominado mosto dulce. La filtración se realiza a través de un falso fondo el en el cual se retiene el bagazo y el líquido es filtrado y recolectado en la olla de cocimientos, al término de la filtración, el líquido en la olla es calentado hasta alcanzar la temperatura de ebullición. El hervido dura 90 minutos, al término de esta etapa, el líquido es transferido a un tanque sedimentador, donde la proteína coagulada y material insoluble es separado por sedimentación. El líquido permanece 30 minutos reposando en este tanque y posteriormente pasa a un intercambiador de calor de placas con glicol a contracorriente, la temperatura final del mosto es de 10.5 ± 0.5 °C. El mosto frío es oxigenado con O₂ grado medicinal Praxair para tener una concentración de oxígeno disuelto entre 16 y 20 ppm y la levadura es entonces inoculada para dar paso al inicio de la fermentación. El valor de inóculo de levadura varía entre 17 y 22 ppm. En esta etapa inicia la fermentación del mosto. El diagrama general de proceso para la Elaboración del mosto se puede observar en la Figura 7. Algunas imágenes de los equipos empleados para la elaboración de los mostos se pueden observar en la Figura 8.

Para el pesado de materias primas se usó una báscula marca Ohaus con resolución de 0.01 kg. Durante la elaboración del mosto se emplea agua con un contenido promedio de 50 ppm de CaSO₄ como CaCO₃ y 0.2 ppm de Zn.

Figura 7.- Diagrama de Flujo para la elaboración de mostos experimentales.



Las dimensiones o capacidades de los equipos utilizados para la elaboración de los mostos se muestran en la tabla VIII. Estos equipos están diseñados para elaborar cocimientos en el rango de 500 a 600 L de volumen de mosto frío. Para el caso de la experimentación desarrollada, se elaboraron los mostos a un volumen de 500 L.

Tabla VIII. Equipos para la elaboración de los mostos experimentales.

Equipo	Dimensiones / Capacidad
Molino para Malta y Cebada con 2 pares de rodillos	681 kg/h
Cocedor	632 L
Macerador	866 L
Filtro	938 L
Olla de Cocimientos	820 L
Tanque Sedimentador	828 L
Enfriador de Placas	19 L/min de 98 °C a 10 °C± 0.5

Figura 8.- Fotografías del equipo utilizado para la elaboración de los mostos y su fermentación.



3.2. Selección de la levadura cervecera.

La levadura cervecera seleccionada para las fermentaciones es una cepa industrial identificada como *Saccharomyces uvarum*, la cual fue proporcionada por una cervecería en el noreste de México.

Para la propagación de la misma, se parte de un cultivo madre, en medio YPD, se inicia con un inóculo de 20 ± 5 millones de células / ml en un volumen de 50 ml de mosto, se incuba por 24 hr a 25°C en un agitador a 150 rpm. Posteriormente este volumen se adiciona en 500 ml de mosto estéril y se incuba por 24 hr a 25°C , posteriormente se inocula en un volumen de 15 L de mosto oxigenado a 18 ± 2 ppm de O_2 en un tanque Carlsberg incubándose por 24 hr a 25°C y se inyecta en condiciones estériles en un tanque con 150 L de mosto oxigenado a 18 ± 2 ppm por 24 hr a temperatura de 16°C . Al transcurrir 24 hr se rellena con mosto oxigenado a 18 ± 2 ppm hasta completar 600 L. Se deja en fermentación por 7 días, posteriormente se cosecha la levadura en condiciones estériles.

El inóculo en los procesos de fermentación se realizó en base al conteo de células de levadura / ml en el tanque de fermentación por medio de un hemacitómetro. El rango de células de levadura/ ml al inicio de la fermentación fue de 17 a 22 millones/ ml.

3.3. Condiciones de Fermentación.

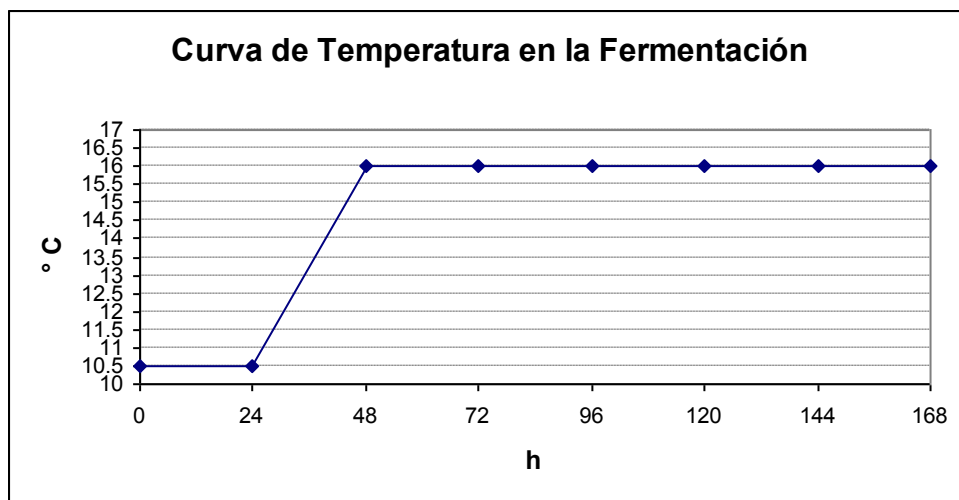
La fermentación se desarrollo en fermentadores cilindro-cónicos con una capacidad en el cono de 173.36 L y en el cuerpo de 627.23 L, dando una capacidad total de 800.59 L. El ángulo del cono respecto a la base es de 45°

La curva de fermentación inicia con una temperatura de $10.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 24 horas, al cumplir este tiempo se deja subir la temperatura a $16^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y se mantiene en este rango hasta completar las 168 horas de fermentación.

Durante la fermentación, el CO_2 producido por la levadura es liberado a la atmósfera por un tubo de venteo, por lo que la fermentación se lleva a cabo presión atmosférica. En el fermentador se tienen un sensor de temperatura RTD

ubicado a la mitad del tanque con el cual se monitorea la temperatura interna del mismo, esta señal está conectada a una válvula de control que permite la entrada de glicol a 0°C en la chaqueta de enfriamiento cuando la temperatura comienza a incrementarse por arriba del nivel preestablecido como estándar y de esta manera, evitar que la temperatura se incremente fuera de los límites establecidos durante la fermentación y que son observables en la figura 9.

Figura 9.- Curva de Temperatura y Tiempo en la Fermentación.



3.4. Métodos analíticos.

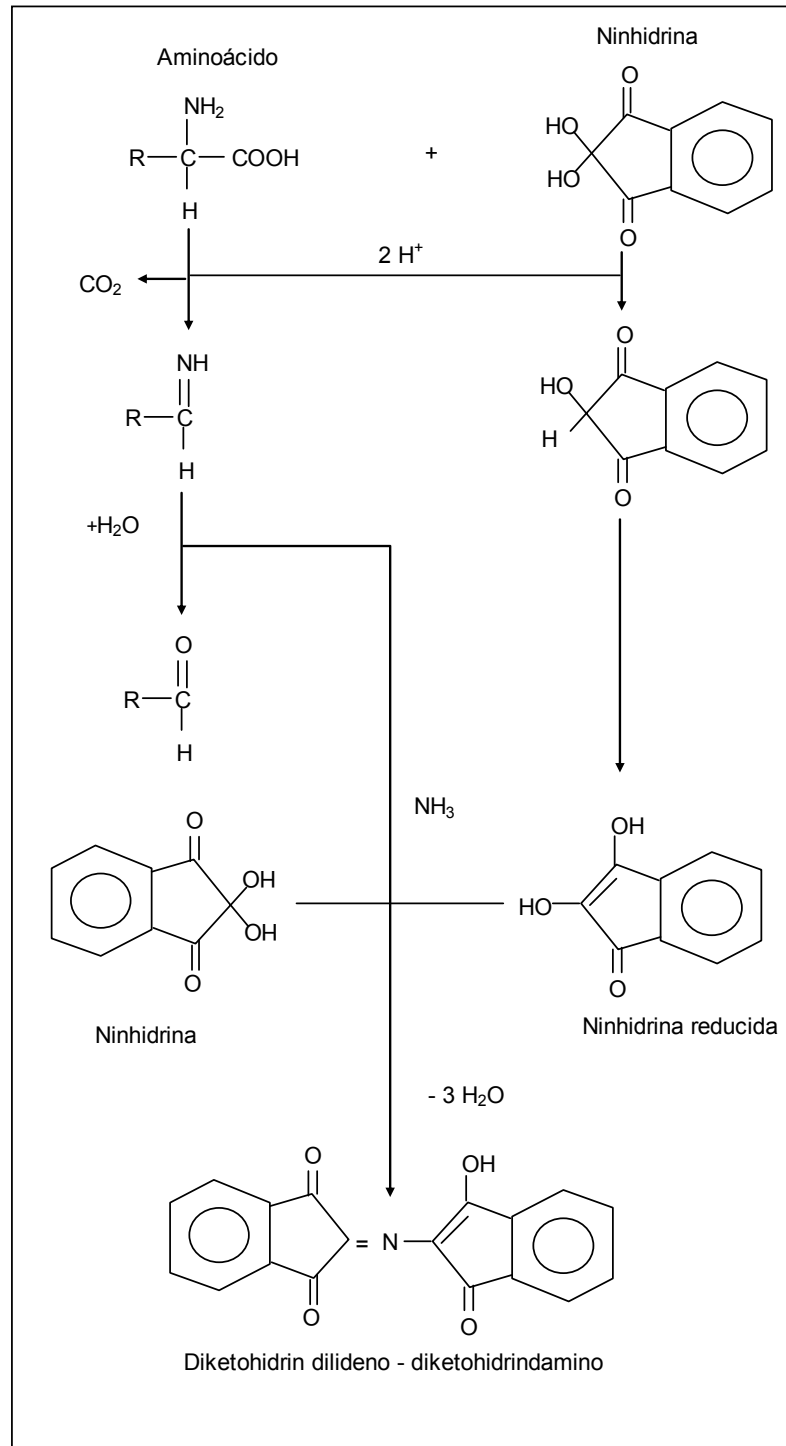
3.4.1. Determinación de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto.

Para la determinación del contenido de Alfa Amino Nitrógeno en los mostos con diferentes formulaciones, se empleó el método internacional de la ninhidrina. Este método determina aminoácidos, amoniacos y en algún grado α -aminos nitrógeno en grupos terminales de péptidos y proteínas. La Prolina no es medida en ningún grado a la longitud de onda usada.

La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) es un oxidante y actúa en la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos liberando el CO_2 , NH_3 y formándose un aldehído, que posee un átomo de C menos que el aminoácido

original. La ninhidrina reducida reacciona entonces con la ninhidrina no reducida y con el NH_3 produciendo un color azul. El color es medido a una longitud de onda de 570 nm (Métodos MEBAK). La reacción se muestra en la Figura 10.

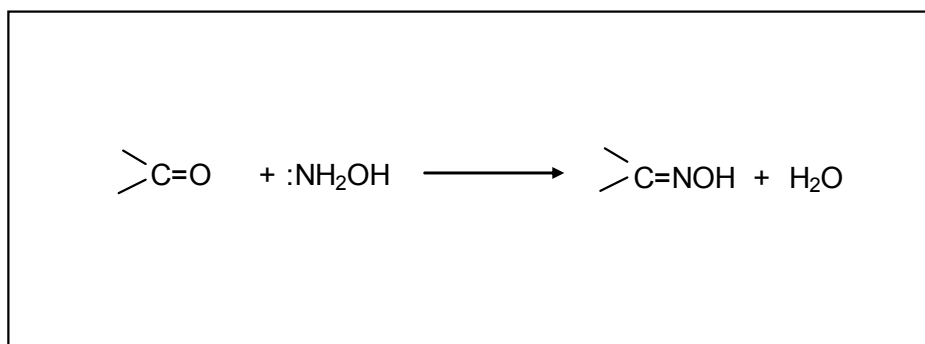
Figura 10.- Reacción de la ninhidrina con un aminoácido para la cuantificación analítica. (Métodos MEBAK 2000).



3.4.2. Determinación de Diketonas vecinales.

Para la determinación del contenido de 2,3 pentanodiona y 2,3 butanodiona (diketonas vecinales) en la fermentación se empleó el método espectrofotométrico de la ASBC (H. Garza-Ulloa y colab. 1982), en donde las diketones reaccionan con el clorhidrato de hidroxilamina para formar su respectiva oxima, la cual es leída para absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 228 nm.

Figura 11.- Reacción de la hidroxilamina con una cetona para producir la oxima correspondiente (Morrison y Boyd 1989).



3.4.3. Determinación del alcohol isoamílico.

Para la determinación del contenido del alcohol isoamílico en la cerveza se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 5890 Series II con detector FID y automuestreador headspace sampler 7694. Columna DB-WAX 30 m, ID 0.53 J&B&W Scientific Estándar interno: n-butanol. Gas Transportador: Helio, caudal: 1.5 ml/min. Temperatura de inyector: 150°C. Temperatura detector: 270°C. La metodología usada esta referenciada a los Métodos Técnicos Cerveceros de la Comisión de Análisis de Europa (Métodos MEBAK).

3.5. Métodos microbiológicos.

3.5.1. Determinación de la curva de reproducción de la levadura

Para determinar la curva de reproducción de la levadura durante la fermentación, se utilizó el conteo directo de células de levadura. La muestra se toma directamente del tanque de fermentación en condiciones de asepsia, se homogeniza previamente y se realizan diluciones seriadas con agua destilada (entre 1:10 y 1 : 10000) para posteriormente colocarse la muestra en el hemacitómetro y realizar la lectura en el microscopio. Se siguió el criterio de incluir las células de levadura que tocan o están sobre el borde del fondo y el borde izquierdo del contador. Las células de levadura que están gemando son contadas como una célula si la gema es menor que la mitad del tamaño de la célula madre, si no es así, la gema se cuenta como otra célula más. Para el cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de Células / ml} = (\text{Total de células en el área de 25 cuadros} \times \text{Factor de Dilución} \times 10,000).$$

3.5.2. Determinación de Viabilidad de la Levadura

Para esta determinación se empleó la técnica de Tinción de Células Muertas de Levadura, reportado por la American Society of Brewing Chemists. Methods of Analysis. 8th ed. Yeast-3A Dead Yeast Cell Count (International Method). La propiedades del azul de metileno en su carácter de indicador de óxido reducción permite diferenciar entre las células muertas de levadura porque permanece oxidado (azul) cuando las levaduras han perdido su capacidad reductora, mientras que las células de levadura vivas no se tiñen (reducido sin color), ha tenido un amplio uso en los laboratorios de las cervecerías y ha sido preferido sobre otras tinciones.

La técnica consiste en agregar a 1 ml de una suspensión de levadura, con un aproximado entre 10-20 millones de células / ml , 1 ml de una solución de azul de metileno preparado previamente a una concentración de 100 ppm y ajustado a un pH aproximado a 4.6. La mezcla se agita y se deja reposar 5 minutos. Posteriormente se cuentan las células de levadura en el hemacitómetro. Las células que estén teñidas de color azul oscuro, se consideran células muertas mientras que las células que se tiñan de color azul claro o no se tiñen, se consideran como vivas. Las células madres gemando se cuentan como una célula, sin considerar el tamaño de la célula hija. El cálculo del % de células muertas se realiza en forma directa al comparar el total de las células contadas con respecto a las células que se tiñeron de color azul oscuro (células muertas).

3.5.3. Determinación de Vitalidad de la Levadura.

La vitalidad nos indica la capacidad de la levadura para efectuar sus actividades metabólicas. Expresa el “vigor” de la levadura para crecer y fermentar. Los métodos utilizados para la determinación de la vitalidad fueron: Prueba de Deficiencia Respiratoria y Poder de Acidificación.

3.5.3.1. Prueba de Deficiencia Respiratoria.

El método de Tinción de Deficientes Respiratorios detecta selectivamente levaduras con deficiencia respiratoria en una población dada por la técnica de capa sobrepuesta. El cloruro de 2,3,5,-trifeniltetrazolio (TTC) es una sal sin color que forma un precipitado rojo al ser reducida. Cuando se sobrepone una capa sobre colonias de levaduras, los organismos con suficiencia respiratoria reducirán el TTC, y las colonias cambiarán su color original a rosa oscuro o rojo. Por otro lado, los organismos con deficiencia respiratoria no reducen el TTC y

estos organismos permanecerán con su color original (generalmente blanco). Esta técnica se basa en la publicación de la American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on Microbiological Controls. Journal 37:133 (1979).

La levadura analizada es diluida en solución salina estéril hasta tener una concentración de microorganismos suficiente para sembrar aproximadamente 100 células por caja en un volumen de 0.05 – 0.3 ml en agar YPD. Se deben contabilizar al menos 500 colonias por lo que se siembran 10 cajas. Las Cajas son incubadas 3 días a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones aeróbicas. Al final se agregan 20 ml de TTC Agar a 50°C y se hace una incubación adicional de 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se observan las colonias y su respectivo color, calculando el porcentaje de células que permanecen sin cambio de color y este número es reportado como % de Células de Levadura con Deficiencia Respiratoria.

3.5.3.2. Poder de Acidificación.

Esta técnica puede ser usada como un método de control aplicable a levaduras de cosecha para medir su vitalidad, parámetro de suma importancia en el arranque de la fermentación. La prueba se basa en la medición del cambio en el pH producido por la levadura en el medio que se encuentra suspendida, como consecuencia de la adición de un carbohidrato específico y teniendo este cambio una relación directa con la vitalidad de la levadura. (Simpson y Hammond 1998).

La técnica inicia con tres lavados consecutivos de la levadura con agua bidestilada a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, centrifugando en cada ocasión a 3000 rpm durante 10 minutos. A la pasta de levadura lavada que se obtiene, se le agregan 50 ml de agua bidestilada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y se mezcla por agitación. Se agregan otros 50 ml de agua bidestilada y la muestra se mantiene agitándose por 10 minutos. Al

finalizar este tiempo, se agregan 5 ml de solución de glucosa al 20.2% atemperada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se mide el pH cada 2 minutos hasta completar 10 minutos en total. Para el cálculo del Poder de Acidificación se emplea la siguiente ecuación:

Poder de Acidificación (P.A.) = $6.3 - \text{pH}$ obtenido a los 10 minutos después de haber agregado la solución de glucosa.

El valor obtenido se interpreta de acuerdo al siguiente criterio:

P.A. > 1.5 = Levadura con buena vitalidad.

P.A. < 1.5 = Levadura con poca vitalidad.

3.5.4. Determinación de Floculación de la Levadura.

La Floculación se define como el fenómeno por el cual las células de levadura se adhieren en masas y sedimentan rápidamente del medio en el cual están suspendidas. Este proceso está controlado tanto por factores externos en el mosto, así como por factores genéticos de la levadura. A nivel laboratorio se pueden simular las condiciones para determinar la capacidad de cada levadura para flocular, en la técnica son utilizados principalmente dos reactivos y la función de cada uno de ellos es la siguiente:

- El CaSO_4 : facilita formación de puentes salinos entre glicoproteínas.
- El buffer de acetatos: neutraliza cargas negativas de la pared celular de la levadura.

La técnica que se empleó está basada en la publicada por la American Society of Brewing Chemists. *Methods of Analysis*. 8th ed. Yeast-11A Flocculation Helm Assay. The Society, St. Paul, MN, 1999. La técnica consiste en preparar una solución de 7 ml de levadura con 7 ml de solución de Sulfato de Calcio(2 %), centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm, decantar el líquido,

resuspender la levadura precipitada en una solución de Sulfato de Calcio y aforar a 15 ml. Se repite la centrifugación y al final se vuelve a decantar el líquido. Se pesa 1 gr de la pasta de levadura que se forma y se le adicionan 10 ml de solución buffer preparada con Sulfato de Calcio, acetato de sodio y ácido acético. Se agita vigorosamente y se deja reposar en un baño de agua a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 minutos, al término de este tiempo se realiza otra agitación vigorosa y se vuelve a dejar reposar por 10 minutos más a la misma temperatura. Al final se realiza la lectura del volumen de levadura floculada. Se realiza la clasificación de nivel de floculación de acuerdo a la tabla IX.

Tabla IX. Clasificación de levadura por floculación.

ml de levadura Floculada	Clasificación
0 - 0.5	Levadura no floculante
0.5 – 1.5	Levadura semifloculante
> 1.5	Levadura floculante

3.6. Medición de pH y °P

Para la medición de pH se empleó un potenciómetro marca Beckman , modelo 690 pH/Temp/mV/ISE Meter con electródo marca OAKTON modelo WD-35801-00. Para la medición de °P se empleó un densímetro digital marca Anton Paar DMA-58.

3.7. Frecuencias de Análisis.

Las frecuencias de análisis que se siguieron se muestran en la Tabla X. Para el caso del análisis de AAN, este se realizó en el mosto antes de iniciar la fermentación. La reproducción de levadura se considera de las 0 a las 64 h de fermentación. A partir de las 88 h de fermentación comienza la floculación de levadura, por lo que el conteo de levadura a partir de las 88 h se interpreta solo

como células de levadura en suspensión. Como parte del monitoreo de la fermentación, se incluye la medición de pH y °P.

Tabla X.- Frecuencias de análisis establecidas para el desarrollo de las fermentaciones.

Análisis	Hora de Fermentación							
	0	16	40	64	88	112	136	160
Dicetonas vecinales en cerveza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alcohol isoamílico en cerveza								<input type="checkbox"/>
Crecimiento de levadura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Tinción de células muertas en levadura						<input type="checkbox"/>		
Tinción de deficientes respiratorios en levadura						<input type="checkbox"/>		
Poder de Acidificación de levadura						<input type="checkbox"/>		
Floculación de levadura						<input type="checkbox"/>		
pH y °P en cerveza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

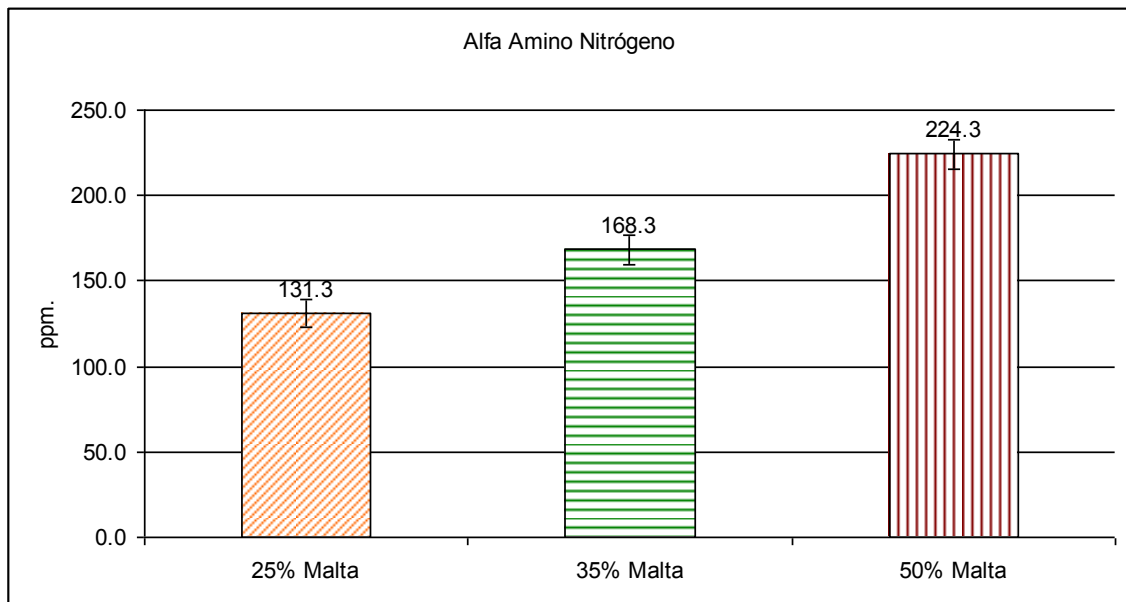
CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1.- Contenido de Alfa Amino Nitrógeno en los mostos elaborados con diferente formulación.

Los mostos elaborados con diferente proporción de malta, tuvieron valores diferentes de AAN. Los valores de se muestras en la Figura 12. Al efectuar el Análisis de Varianza (ANOVA) a los valores obtenidos de AAN en las 3 diferentes formulaciones empleadas, se observan diferencias estadísticamente significativas con una confiabilidad del 95%. Ver Tabla XI. La concentración de AAN aumenta, a medida que se incrementa la proporción de malta en la formulación.

Figura 12.- Valores de AAN para los mostos preparados con diferentes proporciones de malta.



4.3.- Efecto de la variación en cantidad de Alfa Amino Nitrógeno en los mostos sobre la producción y reducción de dicetonas vecinales.

Los resultados obtenidos en la producción y reducción de dicetonas vecinales a diferentes niveles de AAN en los mostos se muestran en la Figura 14. Observamos que las velocidades de producción de dicetonas vecinales durante las primeras 40 h de Fermentación son similares para los diferentes mostos. A partir de los resultados obtenidos a las 64 h de Fermentación, se observa que en el mosto con menor contenido de AAN, los niveles de dicetonas vecinales son mayores en comparación con los mostos de 168.3 y 224.3 ppm de AAN. A partir de las 64 h de Fermentación se observa que el nivel de dicetonas vecinales comienza a disminuir, a excepción del mosto con 168.3 ppm de AAN, donde se observa un incremento a las 88 h comparado con el análisis previo a las 64 h. También se observa diferencia en los niveles de dicetonas vecinales a las 112 h de Fermentación entre los mostos con 168.3 y 224.3 ppm de AAN. El resumen de los análisis de ANOVA en concentraciones de dicetonas vecinales se muestra en la Tabla XIII.

Figura 14.- Curvas de producción y reducción de dicetonas vecinales a diferentes niveles de concentración de Alfa Amino Nitrógeno inicial en el mosto fermentado por *Saccharomyces uvarum*.

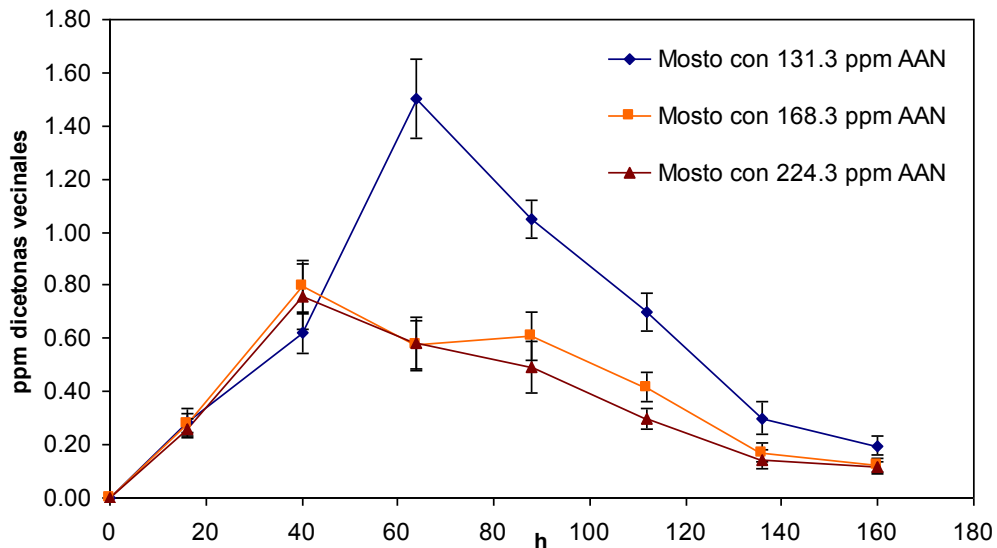
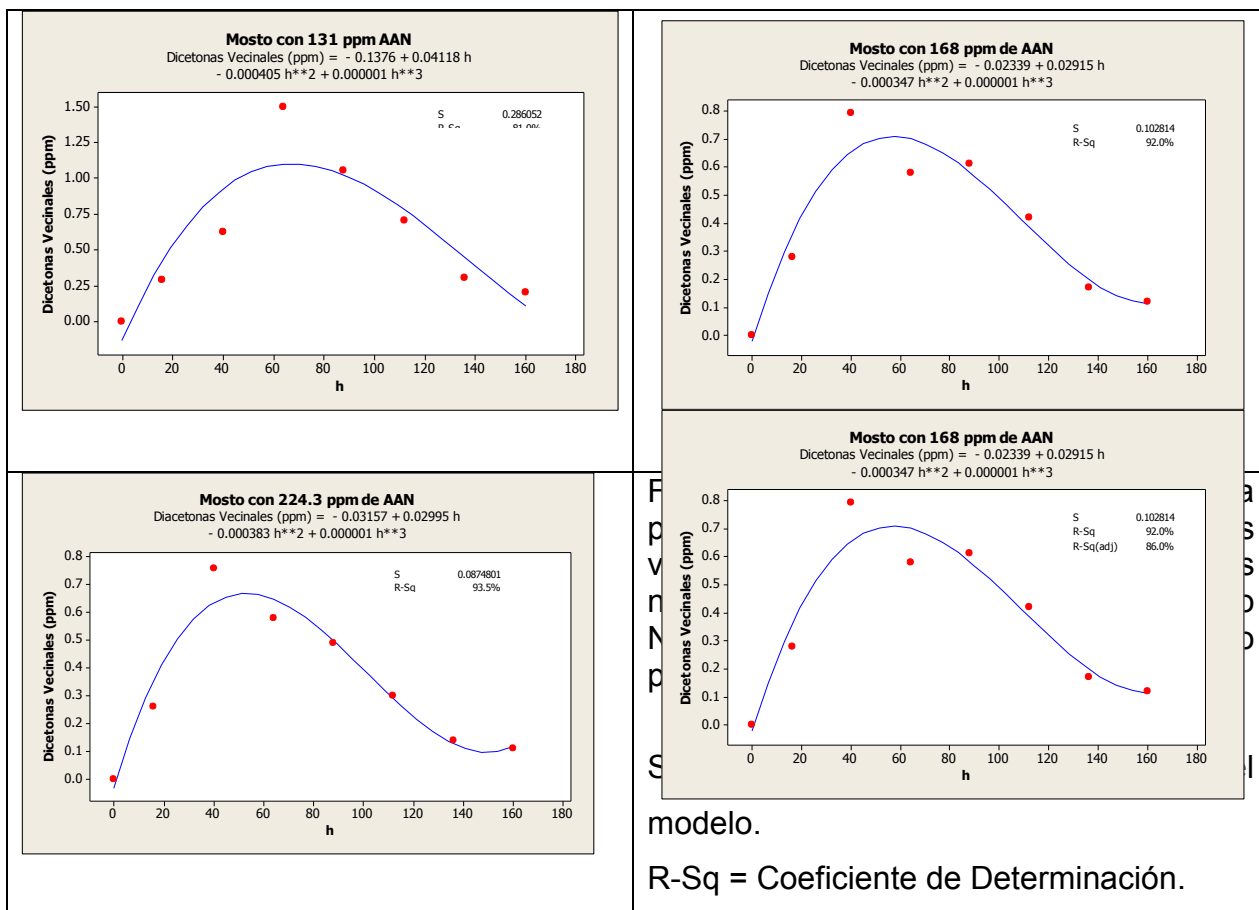


Tabla XIII.- Análisis de Varianza (ANOVA) para el contenido de dicetonas vecinales en los mostos a diferentes niveles de AAN en los mostos. El valor $P < 0.05$ nos indica que existe diferencia significativa con un 95% de confiabilidad entre al menos dos de las poblaciones analizadas. Las diferencias se describen en el apartado de comentarios.

Tiempo de Fermentación (h)	Valor P	Comentario
16	0.730	No existe diferencia
40	0.178	No existe diferencia
64	0.000	Diferencia significativa en el mosto con nivel de 131.3 ppm de AAN con respecto a los mostos con 168.3 y 224.3 ppm de AAN. El mosto con 131.3 ppm de AAN presenta una mayor concentración de dicetonas vecinales.
88	0.001	Diferencia significativa en el mosto con nivel de 131.3 ppm de AAN con respecto a los mostos con 168.3 y 224.3 ppm de AAN. El mosto con 131.3 ppm de AAN presenta una mayor concentración de dicetonas vecinales.
112	0.000	Diferencia significativa entre los 3 mostos con diferente nivel de AAN. El mosto con 131.3 ppm de AAN presenta una mayor concentración de dicetonas vecinales, seguido del mosto con 168.3 ppm de AAN y el valor mas bajo se presenta en el mosto con 224.3 ppm.
136	0.011	Diferencia significativa en el mosto con nivel de 131.3 ppm de AAN con respecto a los mostos con 168.3 y 224.3 ppm de AAN. El mosto con 131.3 ppm de AAN presenta una mayor concentración de dicetonas vecinales.
160	0.028	Diferencia significativa en el mosto con nivel de 131.3 ppm de AAN con respecto a los mostos con 168.3 y 224.3 ppm de AAN. El mosto con 131.3 ppm de AAN presenta una mayor concentración de dicetonas vecinales.

Al analizar el comportamiento en la producción y reducción de dicetonas vecinales respecto al tiempo para los diferentes mostos, se establece un modelo de predicción para cada concentración de AAN en el mosto. Ver Figura 15. En los 3 casos se observa que el modelo que mejor se apega al comportamiento de los datos es una ecuación cúbica. En el caso del mosto con

menor concentración de AAN , se observa el menor coeficiente de determinación (R-Sq), respecto a los valores obtenidos para la predicción de las dicetonas vecinales a 168.3 y 224.3 ppm de AAN.



4.4.- Efecto de la concentración de Alfa Amino Nitrógeno en los mostos sobre la producción del alcohol isoamílico.

Los resultados de Alcohol isoamílico a las 160 h de fermentación se muestran en la Figura 16. Se puede observar que la cerveza proveniente de la fermentación con menor contenido de AAN, presenta una media mayor que la cerveza proveniente de las fermentaciones con 168.3 y 224.3 ppm de AAN inicial en el mosto. Al efectuar el Análisis de Varianza para validar si existe diferencia significativa en al menos dos diferentes niveles de AAN, no se

observan diferencias significativas con una confiabilidad del 95%. Ver Tabla XIV.

Figura 16.- Concentración de 3-metil-1-butanol a las 160 h de Fermentación a diferentes niveles de AAN inicial en el mosto.

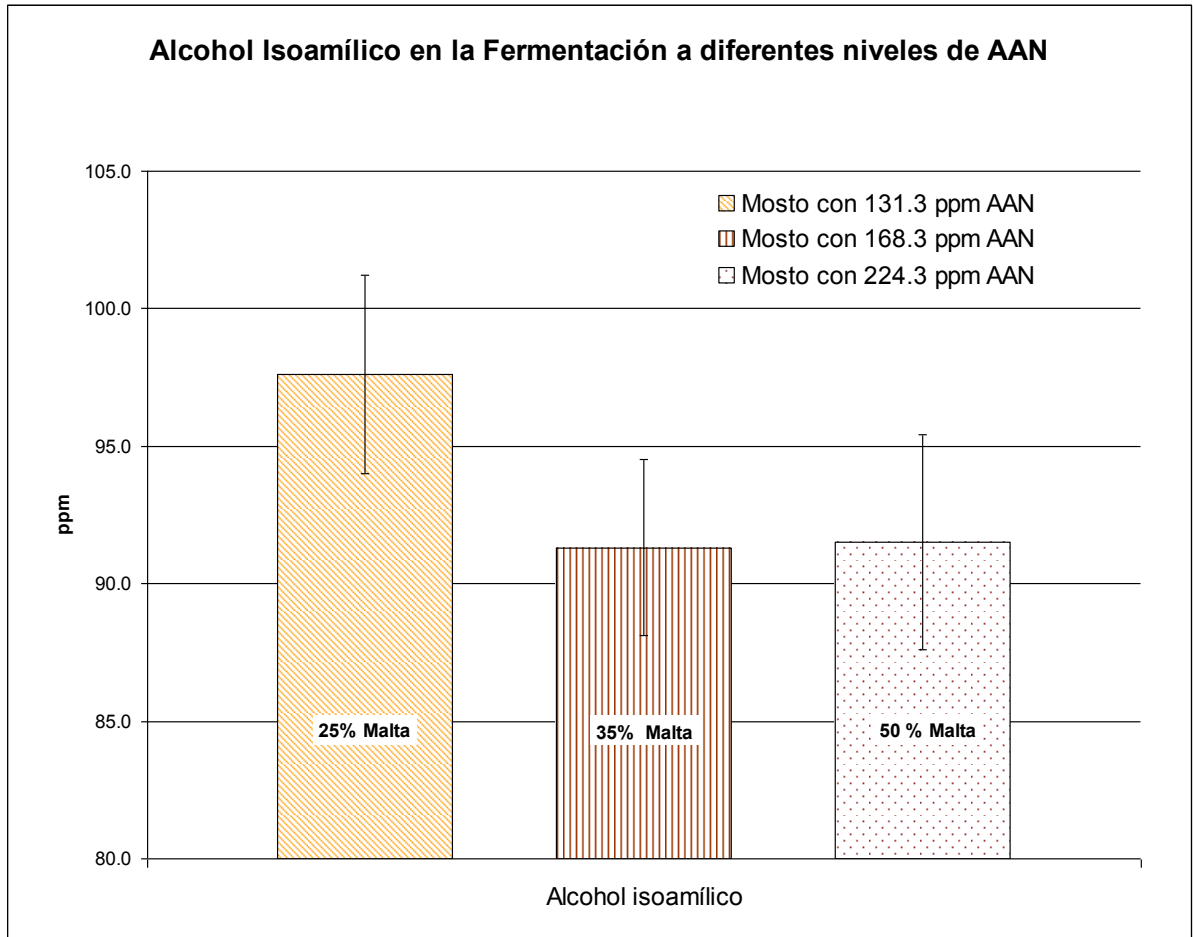


Tabla XIV.- Análisis de Varianza para la concentración de Alcohol isoamílico a diferentes niveles de AAN en el Mosto. El valor $P > 0.05$ nos indica que no existe diferencia significativa entre las poblaciones analizadas con una confiabilidad del 95%. (MINITAB versión 14).

Análisis de Varianza					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Factor	2	78.2	39.1	3.07	0.121
Error	6	76.5	12.7		
Total	8	154.7			

R-Sq = 50.54%

Nivel	N	X	DS	Intervalo de confianza al 95%.
131 ppm	3	97.63	3.61	(-----*-----)
168 ppm	3	91.30	3.16	(-----*-----)
224 ppm	3	91.47	3.90	(-----*-----)

90.0 95.0 100.0 105.0

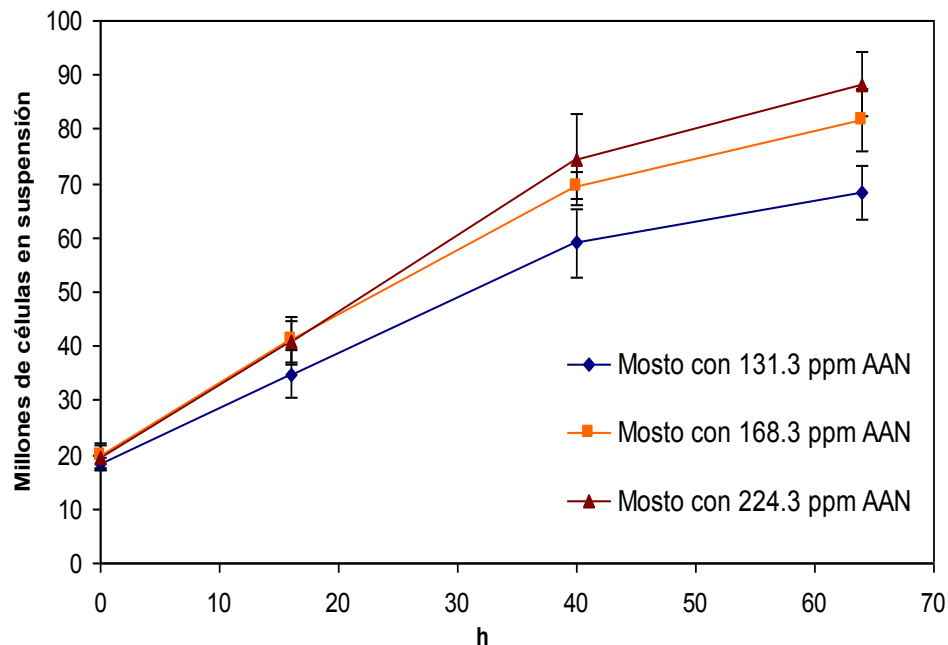
F = Media cuadrática del Factor / Media cuadrática del Error
P = Probabilidad de que las medias no tengan diferencia significativa al intervalo de confianza definido.
N = número de datos
X = Media
DS = Desviación estándar
R-Sq = Coeficiente de determinación

4.5.- Efecto de la concentración de Alfa Amino Nitrógeno en los mostos sobre la reproducción de la levadura.

Los resultados de reproducción de levadura en mostos con diferentes valores de alfa amino nitrógeno se muestran en la Figura 17. Se observa que a medida que aumenta el nivel de AAN en el mosto, la reproducción en la fase exponencial es mayor, hasta alcanzar un nivel máximo similar entre los mostos de 168.3 AAN y 224.3 AAN.

La fermentación con 131.3 ppm de AAN presenta una menor reproducción comparado con las otras dos fermentaciones con mayor contenido de AAN a partir de las 40 h de fermentación.

Figura 17.- Curvas de reproducción de levadura *Saccharomyces uvarum* a diferentes niveles de concentración de alfa amino nitrógeno inicial en los mostos.

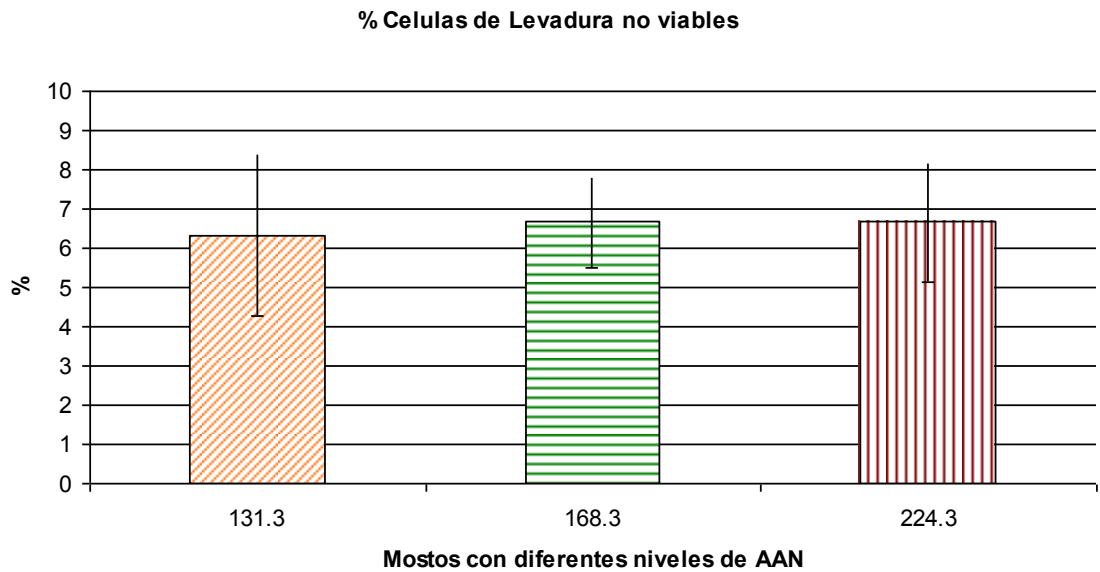


4.6.- Viabilidad de la Levadura cosechada

El % de células no viables de levadura se determinó a las 112 h de fermentación y en los resultados mostrados en la Figura 18, no se observan diferencias significativas a un 95% de confiabilidad entre los diferentes mostos fermentados a diferentes niveles de Alfa Amino Nitrógeno.

Todos los resultados observados se encuentran por debajo del 10% de células no viables. Solo se observa una mayor desviación estándar en los valores obtenidos de los mostos con menor concentración inicial de AAN.

Figura 18.- % de células de no viables en levadura de cosecha por tinción con azul de metileno a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de Alfa Amino Nitrógeno inicial en el mosto fermentado por *Saccharomyces uvarum*.

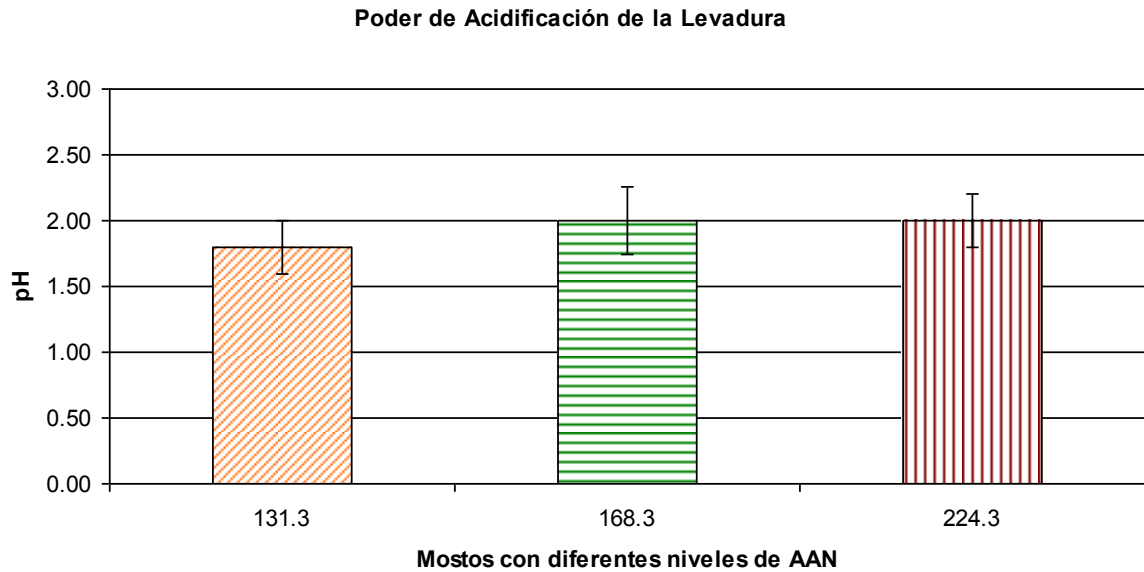


4.7.- Vitalidad de la Levadura, Poder de Acidificación

El poder de acidificación de la levadura se determinó a las 112 h de fermentación. En los resultados mostrados en la Figura 19, no se observan diferencias significativas a un 95% de confiabilidad entre los diferentes mostos fermentados a diferentes niveles de Alfa Amino Nitrógeno.

Ninguno de los valores estuvo por debajo de 1.5 unidades de pH indicado en la literatura como el umbral donde se puede clasificar la levadura con bajo poder de acidificación y como consecuencia, con baja vitalidad analizada bajo este parámetro.

Figura 19.- Poder de Acidificación en levadura de cosecha a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de Alfa Amino Nitrógeno inicial en el mosto fermentado por *Saccharomyces uvarum*.

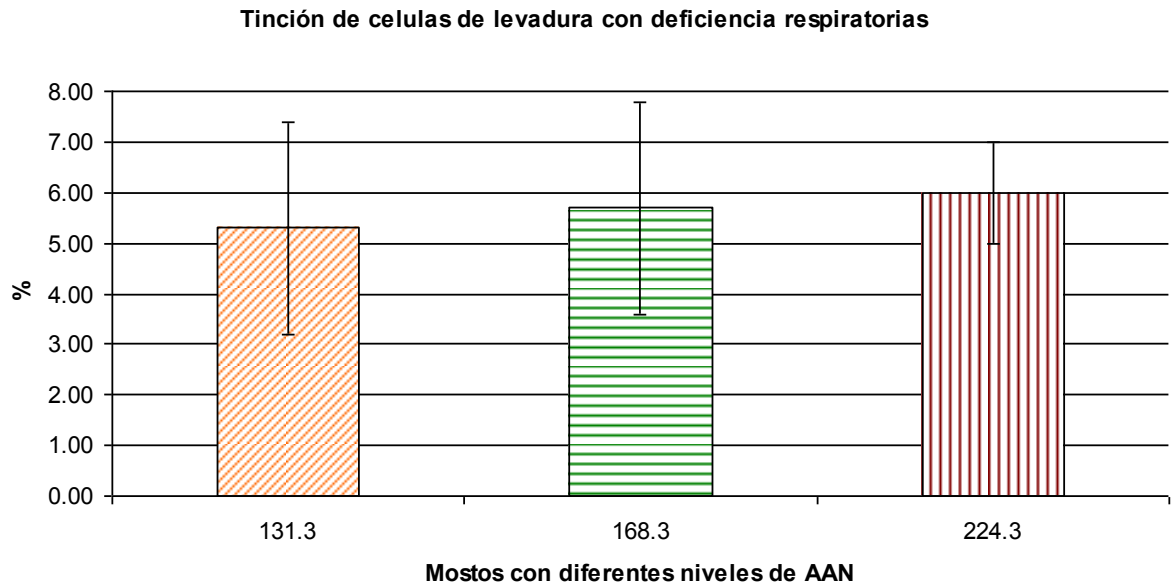


4.8.- Vitalidad de la Levadura, Prueba de Deficiencia Respiratoria

La prueba para la deficiencia respiratoria de la levadura se determinó a las 112 h de fermentación. En los resultados mostrados en la Figura 20, no se observan diferencias significativas a un 95% de confiabilidad entre los diferentes mostos fermentados a diferentes niveles de Alfa Amino Nitrógeno.

En todos los resultados de las pruebas de deficiencia respiratoria realizados a diferentes niveles de Alfa Amino Nitrógeno, se puede observar que se encuentran por debajo del 10%.

Figura 20.- Prueba de Deficiencia Respiratoria en levadura a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de Alfa Amino Nitrógeno inicial en el mosto fermentado por *Saccharomyces uvarum*.

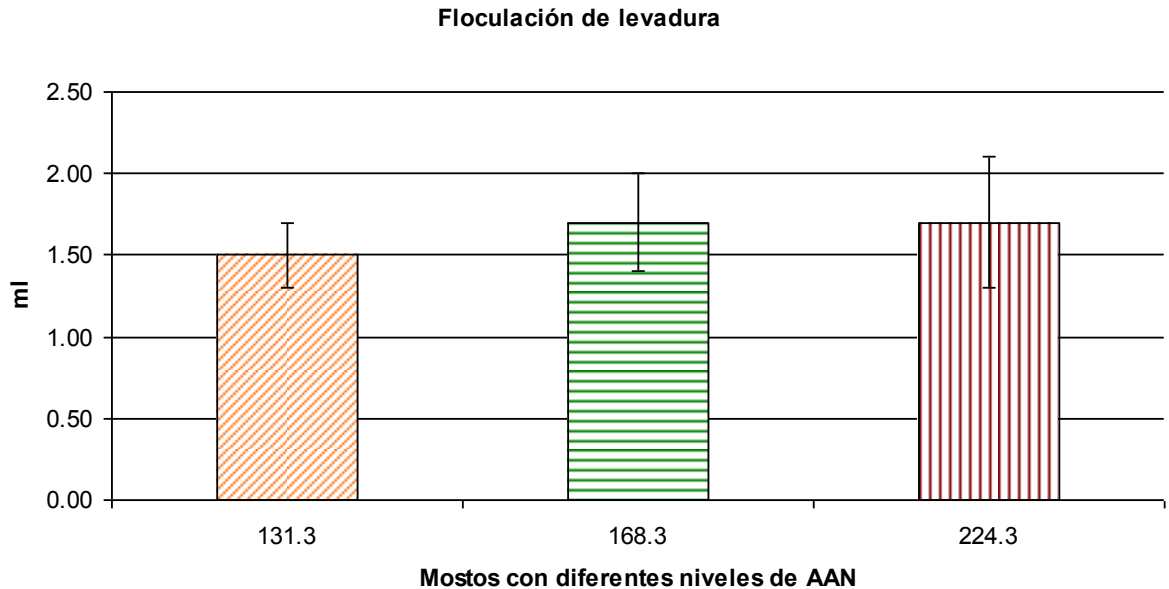


4.9.- Floculación de Levadura.

La capacidad de floculación de levadura a las 112 h de fermentación se muestra en la Figura 21. No se observan diferencias significativas a un 95% de confiabilidad entre los diferentes mostos fermentados a diferentes valores de AAN.

Los valores promedio se encuentran por arriba de 1.5 ml, umbral determinado en la literatura como mínimo para considerar a la levadura como floculante.

Figura 21.- Flocculación de levadura de cosecha a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de Alfa Amino Nitrógeno inicial en el mosto fermentado por *Saccharomyces uvarum*.

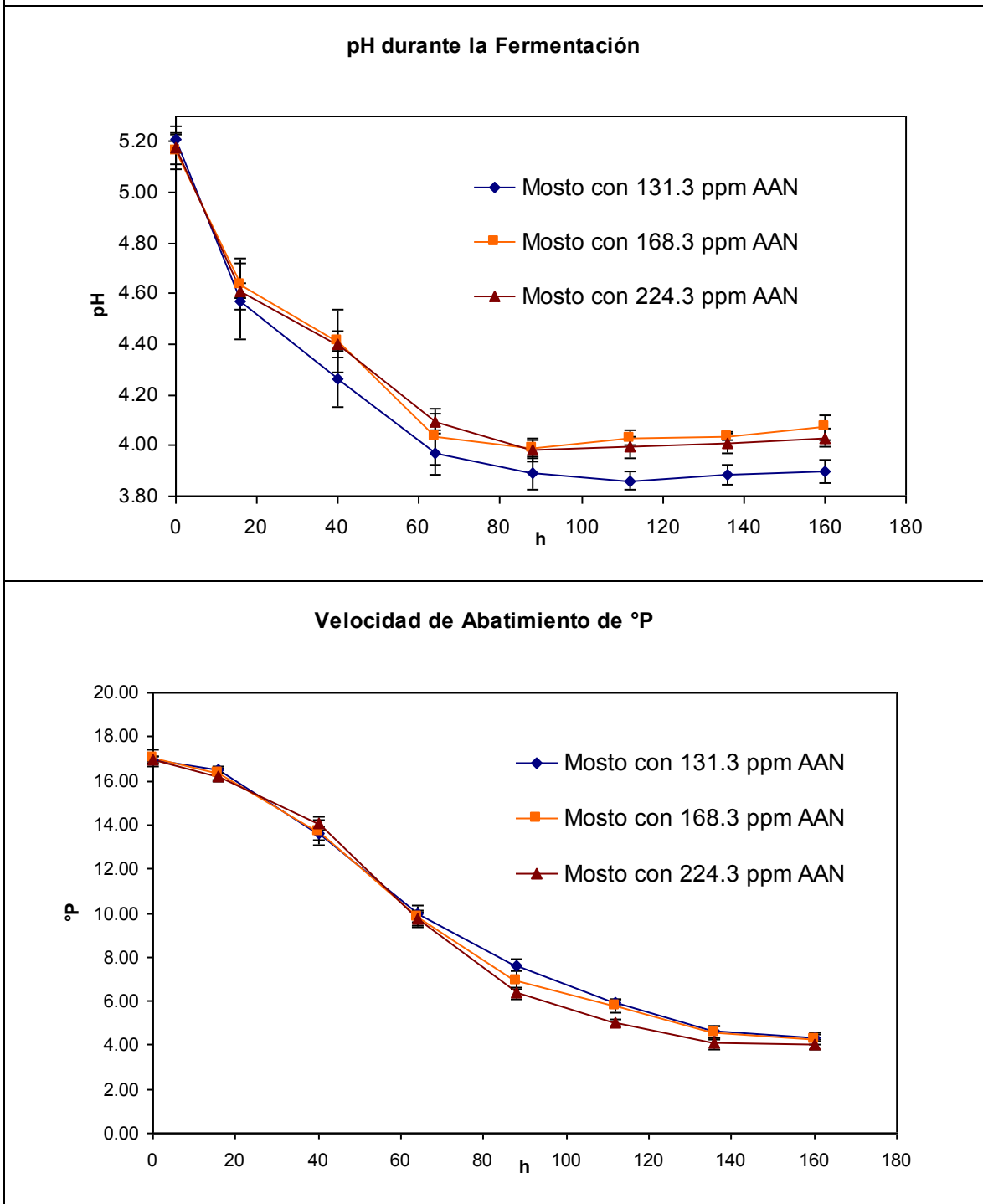


4.10- Efecto de la variación en cantidad de Alfa Amino Nitrógeno en los mostos sobre el °P y pH en el transcurso de las fermentaciones.

Los resultados de °P y pH se muestran en la figura 22, con respecto al °P se observa que la velocidad de abatimiento es similar para las fermentaciones con diferentes niveles de Alfa Amino Nitrógeno hasta alcanzar las 112 h. A partir de este tiempo, se comienza a observar una menor velocidad de abatimiento de °P en el mosto fermentado con 131.3 ppm de AAN.

Con respecto al comportamiento del pH durante la fermentación, se puede observar que el valor de pH final de fermentación es menor en la fermentación con el mosto con menor contenido de AAN. En los mostos con un contenido de AAN de 168.3 y 224.3 ppm de AAN, no se observan diferencias significativas a un 95% de confiabilidad.

Figura 22.- Abatimiento de °P y comportamiento del pH en las fermentaciones a diferentes niveles de concentración de Alfa Amino Nitrógeno inicial en el mosto fermentado por *Saccharomyces uvarum*. Gráfica superior °P, gráfica inferior de pH.



CAPITULO 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La proporción de malta en la formulación para la elaboración del mosto tiene un efecto sobre los niveles de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto. En los resultados obtenidos en esta experimentación, se pueden observar que en la formulación con 25% de Malta, se obtiene un valor promedio de AAN de 131.3 ppm, en el caso de 35% Malta se obtiene un valor promedio de 168.3 ppm de AAN y en el caso de 50% de Malta se obtuvo un valor promedio de 224.3 ppm de AAN. Los mostos con 25% de malta presentan un valor menor de AAN que el de 35% Malta y este a su vez, presenta un valor menor que el de 50% Malta. Esto se debe a que la concentración de AAN depende de la cantidad de Malta en el mosto, al aumentar la proporción de malta en el mosto, se incrementa la cantidad de AAN. Existen reportes que indican que la cantidad de AAN también depende de las condiciones de maceración (Agu 2006, O'Connor y colab. 1989). Sin embargo; al tener las mismas condiciones de maceración, los resultados de AAN se pueden atribuir solo a las diferentes proporciones de malta Esmeralda empleadas en las formulaciones.

Los mostos preparados con un 25% de malta presentan un comportamiento diferente en la producción y reducción de dicetonas vecinales con respecto a los mostos con 35% y 50% de malta. En estudios previos realizados por O'Connor-Cox y colaboradores en 1989 y Pugh y colaboradores en 1997, se sugiere un nivel mínimo de AAN de 140 ppm para no tener afectaciones en los niveles de producción de dicetonas vecinales. La formulación con 25% de malta presenta un comportamiento diferente en la producción de dicetonas vecinales con respecto a los mostos con 35% y 50%. Esto está relacionado con la síntesis de isoleucina y valina, precursores de la 2-3 pentanodiona y 2-3 butanodiona respectivamente. Al tener una menor concentración de estos aminoácidos en el mosto, se promueve su síntesis y como consecuencia, se producen los

precursores, los cuales, son excretados al medio de fermentación y a través de una descarboxilación oxidativa no enzimática se forma la dicetona vecinal (Lewis y Young 1998.). En la experimentación se puede observar que al usar un 35% de Malta Esmeralda, los niveles de dicetonas vecinales son prácticamente similares a los obtenidos en la fermentación empleando 50% de malta Esmeralda. Solo a las 112 h de fermentación se observa una diferencia significativa, la cual ya no se observa a las 136 h de Fermentación. Para fines prácticos, esto no afecta el tiempo de fermentación, ya que a nivel industrial, se tiene establecido obtener valores inferiores a 0.18 ppm en la etapa de fermentación, para que en la cerveza final, se obtengan valores inferiores al umbral de detección organoléptico establecido (Ver tabla II). La reducción de dicetonas vecinales es efectuada por la misma levadura, es decir; la dicetonasa reducida a su respectivo diol, el cual presenta un umbral de detección organoléptico mucha mayor que su respectiva dicetonasvecinal (Ver Tabla III). La reducción de la dicetonas depende de la cantidad de levadura y de la cantidad de NADH presente en la fermentación que tenga que ser regenerado a NAD^+ para que a su vez, este sea usado para ser reducido en diferentes rutas metabólicas. Los resultados obtenidos en la experimentación muestran como a menor cantidad de AAN , se tiene una reproducción menor de levadura , la cual, los mostos con promedio de 131.3 ppm de AAN, a partir de las 40 h de fermentación, presentan una menor cantidad de levadura en suspensión comparado con los mostos con 168.3 y 224.3 ppm de AAN. Esto se puede deber a la menor concentración de AAN en el mosto, lo cual afecta la reproducción de levadura, al tener repercusiones sobre la síntesis de proteínas para la construcción de nuevas células. Al tener una menor concentración de células de levadura, se tiene una menor oxidación de las dicetonasa su respectivo diol.

Con respecto a la producción de alcohol isoamílico, no se observan diferencias significativas en los mostos con tres diferentes niveles de AAN. Solo se observa que la media de alcohol isoamílico de los mostos con 25% de Malta

es mayor que los mostos con 35% y 50%, sin embargo; al efectuar las pruebas de Análisis de Varianza entre las medias, no se puede distinguir una diferencia significativa a un 95% nivel de confianza. (Ver Tabla XIV). La síntesis de alcoholes esta relacionada con el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y la reducción de NADH para obtener NAD⁺. Específicamente, la producción de alcohol isoamílico esta relacionada con la transaminación de valina y leucina y del metabolismo de los carbohidratos. En el caso de los aminoácidos, estos son transaminados para obtener su respectivo α -ceto acido, el cual, al ser descarboxilado forma su respectivo aldehído y este es reducido para generar el alcohol correspondiente. Durante la etapa anaeróbica de la fermentación, la levadura no cuenta con O₂ para respirar, y es por medio de compuestos orgánicos que acepta los electrones finales, siendo estos reducidos. Específicamente, la reducción del isovaleraldehído por medio del la enzima alcohol deshidrogenasa, produce el 3-metil-butanol. En la experimentación, no se observaron diferencias significativas en la producción de este alcohol, esto se puede deber a que el balance de oxácidos producidos no fue lo suficientemente diferente para obtener concentraciones de alcohol isoamílico con diferencia significativa a diferentes niveles de AAN.

Al comparar los resultados de viabilidad y vitalidad de la levadura, se observa que no existen diferencias significativas en los mostos con diferentes niveles de AAN. Esto se puede deber a que solo se hicieron los estudios con una sola fermentación, no presentando afectación en la fisiología de la levadura bajo estas condiciones de fermentación. En las tres diferentes proporciones de malta, se cuenta con la misma concentración de azúcares fermentables iniciales, solo se varía la cantidad de aminoácidos y péptidos, la levadura no es afectada en su viabilidad y vitalidad en forma inicial. Esta se adapta al medio y fermenta de acuerdo a las condiciones que prevalecen, como ya se comentó en el caso de las dicetonas vecinales, el metabolismo de la levadura tiende a sintetizar los aminoácidos necesarios para su crecimiento y reproducción, este

efecto se refleja en la producción de dicetonas vecinales, pero no se observan efectos sobre su fisiología en forma directa.

Al analizar los resultados de pH durante la fermentación, se observa que a menor proporción de malta, el pH es menor. Esto puede estar relacionado a la capacidad buffer que le imparte la malta al mosto. A menor proporción de malta, menor capacidad buffer para amortiguar la producción de ácidos orgánicos en la fermentación (Bamforth 2001).

Con respecto la gravedad del mosto, expresada en °P, aquellos con mayor proporción de AAN, presentan una mayor velocidad de atenuación del °P. Esto se pueden deber a que la reproducción de levadura es mayor, provocando una afectación directa sobre la cantidad de azúcares fermentables disponibles en el medio el cual es fermentado. A mayor cantidad de levadura, mayor velocidad de atenuación de °P en la fermentación.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Los resultados presentados y lo anteriormente discutido nos proporciona los conocimientos suficientes para concluir lo siguiente:

1. La variación en la proporción de malta en la elaboración de los mostos para producir cerveza tiene impacto en la concentración de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto. A menor proporción de malta, menor concentración de Alfa Amino Nitrógeno.
2. A una concentración igual o mayor a 168.3 ppm de Alfa Amino Nitrógeno y hasta 224.3 ppm de Alfa Amino Nitrógeno, que corresponde a una proporción de malta Esmeralda de 35% y 50% respectivamente, no se observan diferencias significativas en la producción y reducción de dicetonas vecinales, alcohol isoamílico, vitalidad y viabilidad de levadura, reproducción de levadura y pH en la fermentación.
3. Concentraciones cercanas a 131.3 ppm de Alfa Amino Nitrógeno, que corresponde a un 25% de malta esmeralda, tienen una mayor producción de dicetonas vecinales comparadas con mostos con 35% y 50% de malta Esmeralda.
4. Se concluye que para el uso de malta Esmeralda, existe un mínimo de malta usada aceptable para no afectar la fermentación del mosto para producir cerveza. Esta proporción se encuentra por debajo de 168.3 ppm y por arriba de 131.3 ppm de Alfa Amino Nitrógeno.

CAPITULO 7

RECOMENDACIONES.

El trabajo aquí presentado da pie para la realización de proyectos de investigación que completen el entendimiento del fenómeno de producción de dicetonas vecinales, alcohol isoamílico, viabilidad y vitalidad de la levadura *Saccharomyces uvarum* y el perfil de fermentación medido como pH y °P .

- Establecer con precisión el límite mínimo de Alfa Amino Nitrógeno donde se observe una diferencia significativa en la producción y reducción de dicetonas vecinales para establecer la proporción mínima de malta Esmerlada en la formulación de mostos para producir cerveza con levadura *Saccharomyces uvarum*, sin tener afectaciones en el perfil organoléptico de la cerveza que se obtenga.

- Evaluar los posibles efectos que se tendrían sobre la viabilidad y vitalidad de la levadura al fermentar mostos con baja proporción de malta al estar usando la misma levadura para la inoculación de fermentaciones consecutivas.

- Evaluar el efecto sobre el análisis sensorial de cervezas fermentadas a diferentes niveles de Alfa Amino Nitrógeno en el mosto.

CAPITULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **Alberts Eva, Larsson Christer, Liden Gunnar, Niklasson Claes, Gustafsson Lena.** 1996. Influence of Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62, No. 9. pp. 3187-3195.
- **Agu R.C.** 2007. Some Links Between Total Nitrogen, β -Glucan, and Steeliness in Relation to Barley and Malt Quality. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 44, No. 1, pp. 32-39.
- **Agu R.C.** 2006. Fermentation studies of Wort Made Using Malt and Different Adjuncts-Rice and Maltose Syrup. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 43, No. 4, pp. 227-280.
- **American Society of Brewing Chemists.** 1999. *Methods of Analysis*. 8th ed. Yeast-3A Dead Yeast Cell Count (International Method). The Society, St. Paul, MN,
- **American Society of Brewing Chemists.** 1988. Yeast dead cells staining. Report of Subcommittee on International Methods. *Journal* 47:117
- **Axcell Barry, Morrall Phillip, Yulej Roman y Murray James.** 1984. Malt Specifications-A Safeguard or Restriction on Quality. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 21, No. 3, pp. 101-106.
- **Bamforth Charles W.** 2001. pH in Brewing: An Overview *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 38, No. 1, pp. 1-9
- **Barton Sara y Slaughter J.C** 1992. Amino Acids and Vicinal Diketone Concentration During Fermentation. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 29, , pp. 60-63
- **Barredo Moguel L.H., Rojas de Gante C., Serna Saldivar O.** 2001. Alpha Amino Nitrogen and Fusel Alcohols of Sorghum Worts Fermented into Lager Beer. *Journal of The Institute of Brewing*. Vol. 107, No. 6, pp. 367-372.
- **Bohinski Robert.** 1987. *Bioquímica*. Addison-Wesley Iberoamericana. Pp. 63-96,315-316, 389.
- **Boulton Chris A., Box W. G., Quain D. E., Molzahn S. W.** 2001. Vicinal Diketones Reduction as Measure of Yeast Vitality. *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 38, No. 2, pp. 89-93.
- **Bradee, L..** 1999. *Adjuncts*, 3th ed. *The Practical Brewer*. MBAA, Wauwatosa, Wisconsin. p. 76.
- **Calderbank J. and Hammond J. R M.** 1994. Influence of Higer Alcohol Availability on ester Formation by Yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52(2):

84-90.

- **Canales Gajá Arnulfo.** 1983. Beer: Art and Science. MBAA Technical Quarterly, Vol. 20, No. 2, pp. 53-67.
- **Chen Ernest C. H.** 1977. The Relative Contribution of Erlich and Biosynthetic Pathways to the Formation of Fusel Alcohols. American Society of Brewing Chemists. J. Am. Soc. Brew. Chem. Vol. 36, pp. 39-43
- **Dengis Pascale B., Nélissen L.R. y Rouxhet Paul G.** 1995. Mechanisms of Yeast Flocculation: Comparison of Top and Bottom-Fermenting Strains. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61, No. 2. pp. 718-728
- **Garza Ulloa H., E. Gonzalez, A.M. Canales y A. Sierra.** 1982. A Quality Control Method for the Determination of Diketones and Precursors in Fermenting Wort. American Society of Brewing Chemists. J. Am. Soc. Brew. Chem. 40:15:
- **Goldammer Ted.** 1999. The Brewer's Handbook. KVP Publishers. pp. 78-84.
- **Hannemann Wolfgang.** 2002. Reducing Beer Maturation Time and Retaining Quality. MBAA Technical Quarterly, Vol. 39, No. 3, pp. 149-155
- **Hardwick William A., Jr.** 1999. World history of brewing and its development in the Americas. The Practical Brewer. MBAA, Wauwatosa, Wisconsin. p. 2.
- **Hardwick William A., Jr.** 1994. The Properties of Beer. Handbook of Brewing, Marcel Dekker, Inc.. p. 560.
- **Hines William y Montgomery Douglas.** 1993. Probabilidad y Estadística para Ingeniería. Tercera Edición. CECSA. pp 343-350.
- **Hough J.S., D.E. Briggs, R. Stevens y T.W. Young,** 1981. Malting and Brewing Science, AN Aspen Publication, Second Edition Vol. 1 p 65. Vol. 2.. pp. 595-601, 791
- **Imai Takeo y Ohno Toshihiko.** 1995. The relationship between Viability and Intracellular pH in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61, No. 10. pp. 3604-3608.
- **IngledeW W. M., Patterson C. A** 1999. Effect of Nitrogen Source and Concentration on the Uptake of Peptides by Lager Yeast in Continuous Culture. J. Am. Soc. Brew. Chem. 57(1):9-17.
- **Kara B.V., Simpson, W.J., and Hammond,** 1988. J.R.M., J. Inst. Brew. May-June, Vol. 94, pp. 153-158
- **Knudsen Finn. B.** 1999. Fermentation, Principles and Practices, The Practical Brewer.. 3th ed. Wauwatosa, Wisconsin. p. 237
- **Kruger Lynn.** 1998. Yeast metabolism and its effect on Flavour: Part 1. Brewer's Guardian, Mayo. pp. 27-30
- **Kunze, W.** 1996. Adjuncts, Technology Brewing and Malting. VLB, Berlin. pp 83-84
- **Lee Sun, Villa Keith, Patino Hugo.** 1995. Yeast strain Development for Enhanced Production of Desirable Alcohols/Esters in Beer. J. Am. Soc. Brew. Chem. 53(4): 153-156.
- **Lewis Michel J.** 2003. Malt, the Beauty and the Beast- An Appraisal for

Craft Brewers. MBAA Technical Quarterly, Vol. 40, No. 3, pp. 186-188.

- **Lewis M., Young T.W.** 1998. Brewing, Chapman & Hall. pp. 16-18, 173-189
- **Lekkas C., G.G. Stewart, A. Hill, B. Taidi y J. Hodgson.** 2005. The importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer. MBAA Technical Quarterly, Vol. 42, No. 2, pp. 113-116
- **Le Van Viet Man, Strehaiano Pierre, Nguyen Luong Duc, Taillandier Patricia.** 2001. Microbial Protease or Yeast Extract – Alternative Additions for Improvement of Fermentation Performance and Quality of Beer Brewed with a High Rice Content. J. Am. Soc. Brew. Chem. 59(1):10-16.
- **Métodos MEBAK.** Métodos de Análisis Cerveceros. Recopilación de Métodos Técnicos Cerveceros de la Comisión de Análisis de Europa Central. 2000. Traducción y edición de la segunda edición por la Asociación Latinoamericana de Fabricantes de Cerveza (ALAFACE). Caracas Venezuela, pp 1-5, 65-68 ,
- **Morrison Robert T y Boyd Robert N.** 1989. Química Orgánica 5^{ta} Edición. ADDISON-WESLEY IBEROAMERICA. pp. 767, 1324-1325.
- **Munroe James H.,** 1994. Aging and Finishing. Handbook of Brewing, Marcel Dekker, Inc.. p. 358
- **Nakatani Kazuo, Takao Takahashi, Kenzoh Nagami y Junichi Kumada.** 1984. Kinetic Study of Vicinal Diketones in Brewing, II: Theoretical Aspect for the Formation of Vicinal Diketones. MBAA Technical Quarterly, Vol. 21, No. 4, pp. 175-183
- **O'Connor-Cox Erin S. C. y IngledeW W.M..** 1989. Wort Nitrogenous Sources-Their Use by Brewing Yeast: A Review. ASBC Journal Vol. 47. No. 4. pp. 102-108
- **Owuama Chikezie I.** 1998. Brewing Beer with Sorghum. Journal of Institute of Brewing. Volume 105, No. 1. pp. 23-34.
- **Patterson C. A, IngledeW W. M.** 1999. Utilization of Peptides by a Lager Brewing Yeast. J. Am. Soc. Brew. Chem. 57(1):1-8.
- **Petersen Erin E., Argyrios Margaritas, Roberto J. Stewart, P. Heather Pilkington y Normand A. Mensour.** 2004. The Effect of Wort Valine Concentration on the Total Diacetyl Profile and Levels Late in Batch Fermentations with Brewing Yest *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Am. Soc. Brew. Chem. 62(4):131-139
- **Pugh T. A., Maurer J. M., Pringle A. T.** 1997. The impact of Wort Nitrogen Limitation on Yeast Fermentation Performance and Diacetyl. MBAA Technical Quarterly, Vol. 34, No. 3, pp. 185-189
- **Ratnavanthi C.V, Ravi Bala S. Subramanian V. Rao N.S.** 2000. A Study on the Suitability of Unmalted Sorghum as Brewing Adjunct. Journal of The Institute of Brewing. Vol. 106. No. 6. pp. 383-387.
- **Stewart G.G.** 1994. Adjuncts. Handbook of Brewing, Marcel Dekker, Inc.. p. 121
- **Stewart Graham y Russell Inge.** 1993. Fermentation-The “Black Box” of Brewing Process.. MBAA Technical Quarterly, Vol. 30, , pp. 159-168
- **Takashi Inoue, Kashihara Tadashi.** 1995 .The importance of Indices

Related to Nitrogen Metabolism in Fermentation Control. MBAA Technical Quarterly, Vol. 32, pp. 109-113.

- **Takahashi S., Yoshioka K., Hashimoto N., Kimura Y.** 1997. Effect of Wort Plato and Fermentation Temperature on Sugar and Nitrogen Compound Uptake and Volatile Compound Formation. MBAA Technical Quarterly, Vol. 34, Number 3, pp. 156-163.
- **Taylor David G.** 1990. The Importance of pH Control During Brewing. MBAA Technical Quarterly, Vol. 27, pp. 131-136.
- **Young T.W..** 1996. The biochemical and physiology of yeast grow. Brewing Microbiology. Chapman & HALL, London, pp 26.
- **Younis Omar S. Stewart Graham G.** 1999. Effect of Malt Wort, Very – High-Gravity Malt Wort, and Very-High-Gravity Adjunct Wort on Volatile Production in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Am. Soc. Brew. Chem. 57(2):39-45.

**IMPACTO DEL CONTENIDO DE ALFA AMINO NITRÓGENO EN EL MOSTO
PARA PRODUCIR CERVEZA, SOBRE LA SÍNTESIS DE DICETONAS
VECINALES Y ALCOHOL ISOAMÍLICO EN UNA FERMENTACIÓN
UTILIZANDO LEVADURA
*Saccharomyces uvarum.***

Aprobación de la Tesis:

Dr. Sergio S. Fernández Delgadillo
Director de la Tesis

Dra. Martha A. Suárez Herrera
Secretario

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Secretario

Dra. Ma. Teresa Garza González
Sub-Director de Estudios de Postgrado

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.	1
Hipótesis.	5
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. Alfa Amino Nitrógeno (AAN) en el mosto. .	8
2.2. Presencia de 2,3 butanodiona y 2,3 pentanodiona en cerveza.	12
2.3. Presencia de alcohol isoamílico en cerveza.	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Preparación de los mostos.	19
3.2. Selección de la levadura cervecera. .	23
3.3. Condiciones de fermentación.	24
3.4. Métodos analíticos.	25
3.4.1. Determinación de AAN en el mosto.	25
3.4.2. Determinación de dicetonas vecinales.	27
3.4.2. Determinación del alcohol isoamílico.	27
3.5. Métodos microbiológicos.	28
3.5.1. Determinación de la curva de reproducción de la levadura.	28
3.5.2. Determinación de la viabilidad de la levadura.	28
3.5.3. Determinación de la vitalidad de la levadura.	29
3.5.3.1. Prueba de deficiencia respiratoria.	29
3.5.3.1. Poder de acidificación.	30
3.5.3. Determinación de floculación de levadura.	31
3.6. Medición de pH y °P.	32
3.7. Frecuencias de análisis.	32
4. Resultados	33
4.1. Contenido de AAN en los mostos elaborados con diferente formulación.	34
4.2. Selección de la levadura cervecera. .	35

Capítulo	Página
4.3. Efecto de la variación en cantidad de AAN en los mostos sobre la producción y reducción de dicetonas vecinales.	36
4.4. Efecto de la variación en cantidad de AAN en los mostos sobre la producción del alcohol isoamílico.	38
4.5. Viabilidad de la levadura, % de células no viables por tinción con azul de metileno en levadura de cosecha.	41
4.6. Vitalidad de la levadura, poder de acidificación.	42
4.7. Vitalidad de la levadura, prueba de deficiencia respiratoria.	43
4.8. Floculación de levadura	44
4.9. Efectos de la variación en cantidad de AAN en los mostos sobre el °P y pH en el transcurso de las fermentaciones	45
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
6. CONCLUSIONES.	51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la prolina y fórmula general de los aminoácidos.	10
2. Esquema general de producción de dicetonas vecinales y reducción a su respectivo diol por la levadura	13
3. Producción de diacetilo y reducción a 2,3 butanodiol por la levadura	14
4. Metabolismo de amoniácidos y su relación con la producción de aldehídos y alcoholes superiores.	16
5. Rutas metabólicas para la formación de los alcoholes, a partir de un Aminoácido o del Piruvato.	17
6. Síntesis de 3-metil-1-butanol a partir de leucina, valina y piruvato. . .	18
7. Diagrama de flujo para la elaboración de mostos experimentales	22
8. Fotografías del equipo utilizado para la elaboración de los mostos y su fermentación	23
9. Curva de temperatura y tiempo en la fermentación	25
10. Reacción de la ninhidrina con un aminoácido para la cuantificación analítica.	26
12. Valores de AAN para los mostos preparados con diferentes proporciones de malta	34
13. Aspectos macroscópicos de las colonias de <i>Saccharomyces uvarum</i>	35
14. Curvas de producción y reducción de dicetonas vecinales a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i> .	36
15. Modelos de predicción para la producción y reducción de dicetonas vecinales respecto al tiempo a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i>	38
16. Concentración de 3-metil-1-butanol a las 160 h de Fermentación a diferentes niveles de AAN inicial en el mosto	39

Figura	Página
17. Concentración de 3-metil-1-butanol a las 160 h de fermentación a diferentes niveles de AAN inicial en el mosto	41
18. % de células de no viables en levadura de cosecha por tinción con azul de metileno a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i> .	42
19. Poder de acidificación en levadura de cosecha a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i> .	43
20. Prueba de deficiencia respiratoria en levadura a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i> .	44
21. Floculación de levadura de cosecha a las 112 h de fermentación a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i> .	45
22. Figura 22.- Abatimiento de °P y comportamiento del pH en las fermentaciones a diferentes niveles de concentración de AAN inicial en el mosto fermentado por <i>Saccharomyces uvarum</i> .	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Composición química de cebada y malta. .	3
II. Clasificación de aminoácidos por orden de asimilación durante la fermentación por <i>Saccharomyces uvarum</i>	9
III. Dicetonas en cerveza.	12
IV. Umbrales de detección de los dioles correspondientes a la reducción de su respectiva dicetona vecinal	14
V. Porcentajes de azúcares fermentables por kg de materia prima utilizada.	19
VI. Porcentajes de materias primas para la elaboración de mostos en base a los azúcares fermentables.	20
VII. Materias primas pesada para la elaboración de los mostos con diferentes formulaciones.(expresadas en kg.)	20
VIII. Equipos para la elaboración de los mostos experimentales. .	22
IX. Clasificación de levadura por floculación	32
X. Frecuencias de análisis establecidas para el desarrollo de las fermentaciones	33
XI. Análisis de Varianza (ANOVA) para el contenido de AAN en los mostos a diferentes porcentajes de malta empleada en la formulación	35
XII. Perfil bioquímico de la cepa de levadura.	35
XIII. Análisis de Varianza (ANOVA) para el contenido de dicetonas vecinales en los mostos a diferentes niveles de AAN en los mostos.	37

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
α	Alfa

NOMENCLATURA

ml	Mililitros
g	Gramos
kg	Kilogramos
L	Litros
h	Hora
min	Minuto
rpm	Revoluciones por Minuto
pH	Potencial de Hidrógeno
AAN	Alfa Amino Nitrógeno
YPD	Yeast Potatoe Dextrose
nm	Nanómetros
ppm	Parte por millón
°P	Grado Plato
R-Sq	Coefficiente de determinación
CO ₂	Dióxido de Carbono
Zn	Zinc
NADH	Nicotinamida adenindinucleótido (Forma reducida)
NAD ⁺	Nicotinamida adenindinucleótido (Forma oxidada)

RESUMEN

Carlos Alberto Cañamar Pimentel Fecha de Graduación: Dic. 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: IMPACTO DEL CONTENIDO DE ALFA AMINO NITRÓGENO EN EL MOSTO PARA PRODUCIR CERVEZA, SOBRE LA SÍNTESIS DE DICETONAS VECINALES Y ALCOHOL ISOAMÍLICO EN UNA FERMENTACIÓN UTILIZANDO LEVADURA *Saccharomyces uvarum*.

Número de páginas: 56

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Microbiología Industrial**

Área de Estudio: Microbiología Industrial

Propósito y Método del Estudio: La concentración de Alfa Amino Nitrógeno (AAN) en el mosto para producir cerveza proviene de la malta. El uso de adjuntos (fuentes de carbohidratos diferentes a la cebada malteada) es una alternativa para optimizar el uso de malta y aprovechar las distintas fuentes de carbohidratos disponibles geográficamente. Se elaboraron mostos a partir de diferentes proporciones de malta mexicana variedad Esmeralda, (25%, 35% y 50% de malta), el nivel restante de carbohidratos fue sustituido con maíz refinado y cebada, las fermentaciones se llevaron a cabo empleando una cepa de *Saccharomyces uvarum*. Se estudió el efecto que se obtiene en la cerveza al variar la cantidad de AAN en el mosto, los resultados muestran que a una proporción de 25% de malta para la elaboración del mosto, los niveles de 2,3-pentanodiona y 2,3-butanodiona (Dicetonas Vecinales) son mayores que en relación a las proporciones de malta de 35% y 50%. También se evaluó el efecto de la cantidad de AAN sobre la producción de alcohol isoamílico, donde se observa un valor promedio mayor en la cerveza que se fermentó con una proporción de malta del 25%, aunque no se encontró diferencia significativa entre las diferentes proporciones de malta. Con lo que respecta a la evaluación de la levadura que es cosechada a las 112 h de Fermentación, no se observaron diferencias significativas en las pruebas de viabilidad, vitalidad y floculación. En lo que respecta a la velocidad de reproducción de levadura, se observa que en los mostos fermentados con un 25% de Malta, la velocidad es menor comparada con los mostos preparados con 35 y 50% de Malta.

Contribuciones y Conclusiones La proporción de malta la formulación para elaborar mostos, tiene una relación directa en el nivel de AAN del que dispondrá la levadura al iniciar la fermentación. Se concluye que al disminuir el nivel de AAN en el mosto a valores del 131.3 ppm. (Lo que equivaldría a una proporción de 25% de malta variedad Esmeralda) se incrementará el nivel máximo de dicetonas vecinales y disminuirá la velocidad de reproducción de la levadura *Saccharomyces uvarum* en la fermentación para producir cerveza. En el rango de 131.3 a 224 ppm de AAN, no hay afectación en la producción de alcohol isoamílico y la viabilidad, vitalidad y floculación de la levadura. Este estudio establece las bases para definir los límites máximos de utilización de adjuntos en sustitución de la malta Esmeralda para la elaboración de mostos para producir cerveza. Estos límites se encuentran en el rango máximo del 65% de adjunto como fuente de carbohidrato.

FIRMA DEL ASESOR: _____

