



Facultad de Ciencia y Tecnología

Ingeniería en Alimentos

**Estudio de la influencia de compuestos azufrados presentes en
cerveza**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN ALIMENTOS

Autor:

GABRIELA ESTEFANÍA MORA PESÁNTEZ

Director:

ANDRÉS PÉREZ GONZÁLEZ

CUENCA, ECUADOR

2021

DEDICATORIA:

Dedico de manera especial a Dios y a mis padres amados Eduardo Mora y Rocío Pesántez por su amor, trabajo, sacrificio y por brindarme su apoyo para la construcción de mi vida profesional.

A mi hermana Carla y a su esposo Edgar por estar siempre presentes, por confiar y creer en mí.

Gabriela Mora Pesántez

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por las abundantes bendiciones en mi vida.

Un profundo agradecimiento a la Universidad del Azuay por abrirme las puertas para formarme como una buena profesional y a todos mis queridos docentes por impartir sus valiosos conocimientos y enseñanzas a lo largo de mi carrera.

A mi director de tesis Ing. Andrés Pérez quien con sus valiosos conocimientos me orientó en la realización de este trabajo. También, por brindarme la oportunidad de aprender cada día más y por creer y confiar en mí.

Finalmente, a mis mejores amigas Carla Terreros y Paula Reyes por ofrecerme su amistad y apoyo incondicionalmente.

Estudio de la influencia de compuestos azufrados presentes en cerveza

RESUMEN

El presente trabajo es un análisis bibliográfico de los compuestos azufrados presentes en la cerveza. Estos compuestos provienen de las materias primas o pueden generarse de manera natural gracias al metabolismo de las levaduras durante la fermentación. Igualmente, se caracterizan por ser los principales constituyentes de sabor de esta bebida. Para los consumidores este es un atributo de calidad importante de los alimentos. Es por esto que pequeñas diferencias en la composición de esta bebida pueden afectar en gran medida su sabor. Para la identificación y cuantificación de estos compuestos existen técnicas analíticas como los métodos cromatográficos y electroquímicos.

Palabras claves: cerveza, compuestos azufrados, aroma, sabor, métodos analíticos



Andrés Pérez

Director de Tesis



Ma. Fernanda Rosales M.

Coordinadora de Escuela



Gabriela Estefanía Mora Pesántez

Autor

Study of the influence of sulfur compounds present in beer

ABSTRACT

The present work is a bibliographic analysis of the sulphur compounds present in beer. These compounds come from raw materials or can be naturally generated by yeast metabolism during fermentation. In the same way, they are characterized as the main flavor constituents of this beverage. For consumers, this is an important quality attribute in food. This is why small differences in the composition of this beverage can greatly affect its flavor. For the identification and quantification of these compounds, there are analytical techniques such as chromatographic and electrochemical methods.

Keywords: beer, sulfur compounds, aroma, flavor, analytical methods.



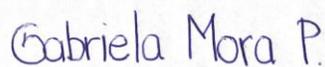
Andrés Pérez

Thesis Director



María Fernanda Rosales M.

Food Engineering Faculty Coordinator



Gabriela Estefanía Mora Pesántez

Author

Translated by

Gabriela Estefanía Mora Pesántez



ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| DEDICATORIA: | 2 |
| AGRADECIMIENTOS: | 3 |
| RESUMEN | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS: | 6 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 9 |
| ÍNDICE DE ANEXOS | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I | 3 |
| 1.1 Compuestos azufrados presentes en la cerveza..... | 3 |
| CAPÍTULO II | 9 |
| 2.1 Métodos de identificación de compuestos azufrados presentes en la cerveza..... | 9 |
| 2.1.1 Resonancia magnética nuclear (RMN): | 9 |
| 2.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): | 12 |
| 2.1.3 Cromatografía de gases:..... | 13 |
| 2.1.4 Detector fotométrico de flama: | 13 |
| 2.1.5 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS):..... | 15 |
| 2.1.6 Metodo colorimetrico: | 17 |
| 2.1.7 Método colorimétrico por la Sociedad Estadounidense de Químicos Cerveceros: | 20 |
| 2.1.8 Micro extracción de fase sólida (SPME): | 24 |
| 2.1.9 Detección por quimioluminiscencia:..... | 24 |
| 2.1.10 Cromatografía de gases con detección de ionización de llama (FID): | 27 |
| 2.1.11 Cromatografía de gases con espacio de cabeza (HS-GC): | 27 |
| 2.1.12 Cromatografía de gases por olfatometría (GC-O): | 27 |
| 2.1.13 Análisis voltamperométrico de destilados de cerveza: | 31 |
| 2.1.14 Procedimiento colorimétrico para la medición de dimetil Sulfuro: | 32 |
| 2.1.15 Determinación del dióxido de azufre total en cerveza mediante espectrofotometría de inyección de flujo utilizando la técnica de difusión de gas y zonas de fusión: | 34 |
| 2.1.16 Determinación de sulfito en cerveza mediante cromatografía de exclusión iónica y detección amperométrica pulsada: | 35 |
| 2.1.17 Cuantificación de residuos de dióxido de azufre en malta y cerveza mediante cromatografía de gases de espacio de cabeza | 38 |
| 2.1.18 Dióxido de Azufre Libre en Cerveza como la Diferencia Entre Dióxido de Azufre Total y Acetaldehído: Un Método Voltamétrico | 40 |
| 2.1.19 Métodos de destilación para el análisis de SO ₂ :..... | 41 |
| 2.1.20 Caracterización y clasificación del aroma de muestras de cerveza mediante e-nose MS y herramientas quimiométricas | 42 |

| | | |
|------------------------------------|---|-----------|
| 2.1.21 | Análisis de aldehído-bisulfitos en cerveza mediante fluorescencia-HPLC y Detección con derivatización posterior de columna..... | 44 |
| 2.1.22 | Identificación basada en mediciones cuantitativas y recombinación de aromas de los olores de impacto de carácter en una cerveza bávara tipo Pilsner | 45 |
| 2.1.23 | Optimización de un método de extracción dinámica en fase sólida (SPDE) para la elaboración de perfiles volátiles de cerveza | 48 |
| CAPÍTULO III | | 53 |
| 3.1 | Influencia de los compuestos azufrados en las características de la cerveza | 53 |
| 3.2 | Microbiología en la cerveza | 57 |
| 3.3 | Ocratoxina A (OTA)..... | 63 |
| CAPÍTULO IV | | 65 |
| 4.1 | Importancia de los compuestos azufrados presentes en cerveza..... | 65 |
| CAPÍTULO V | | 71 |
| 5.1 | DISCUSIONES Y CONCLUSIONES: | 71 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | | 74 |
| ANEXOS | | 96 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: diagrama de flujo para el sistema FIA para la determinación de sulfitos totales 102

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1: Compuestos volátiles de azufre que se encuentran comúnmente en la cerveza | 3 |
| Tabla 2 preparación de solución estándar | 21 |
| Tabla 3 preparación de la solución de calibración | 21 |
| Tabla 4: compuestos azufrados presentes en la cerveza | 56 |
| Tabla 5: Temporización del partero para lograr una deflexión del registrador de 60-90% de escala completa | 102 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----------|
| ANEXOS | 96 |
| Método oficial AOAC 963.11 | 96 |
| Dióxido de azufre en la cerveza..... | 96 |
| Método colorimétrico..... | 96 |
| A. Reactivos | 96 |
| B. Calibración | 96 |
| C. Preparación de la solución de prueba..... | 97 |
| D. Determinación | 97 |
| Método oficial AOAC 985.28..... | 98 |
| Aminoácidos de azufre en alimentos, ingredientes para piensos y alimentos procesados | 98 |
| Método cromatográfico de intercambio iónico | 98 |
| A. Principio | 98 |
| B. Reactivos y aparatos | 98 |
| C. Preparación de la porción de prueba | 99 |
| D. Preparación de hidrolizado oxidado | 99 |
| E. Determinación..... | 99 |
| F. Cálculos | 100 |
| Método oficial AOAC 990.29..... | 100 |
| Sulfito (total) en alimentos y bebidas | 100 |
| Método de análisis de inyección de flujo | 100 |
| A. Principio | 100 |
| B. Aparato | 101 |
| C. Reactivos..... | 101 |
| D. Preparación de la solución de prueba..... | 103 |
| E. Determinación..... | 103 |
| Método oficial AOAC 990.31 | 105 |
| Sulfitos en alimentos y bebidas | 105 |
| Método cromatográfico de exclusión iónica..... | 105 |
| A. Principio | 105 |

| | |
|------------------------|-----|
| B. Aparato | 105 |
| C. Reactivos | 105 |
| D. Determinación | 106 |
| E. Cálculos | 106 |

INTRODUCCIÓN

La cerveza es una de las bebidas más antiguas y populares del mundo. En la antigüedad la producción de cerveza estaba estrictamente relacionada con la cocción del pan, debido a que ambos productos se elaboraban con cereales, agua y levadura. Durante el 6000 a. C. en las antiguas ciudades de Mesopotamia, el área que hoy cubre Irak, la elaboración de cerveza era muy conocida. Aunque la gran civilización de Oriente Medio se desarrolló hasta convertirse en un arte fino, nadie entendió cómo funcionaba el proceso de fermentación. Estas cervezas eran muy diferentes a las que se consumen hoy; probablemente eran más espesas, más dulces, con bajos contenidos de alcohol y con un mayor nivel en proteínas. Los griegos y romanos aprendieron de los egipcios el arte de la elaboración de cerveza, pero cuando el vino se convirtió en la bebida más común en el área mediterránea, la cerveza migró hacia el norte. Actualmente, esta bebida se produce en todo el mundo y puede diferir mucho en su composición, dependiendo de su contenido de alcohol y de cómo se elabora. Cabe mencionar que la cerveza no solo es la bebida alcohólica más antigua, sino también la más importante en términos de volumen producido en todo el mundo. En 2006 se bebieron en el mundo cerca de 1.700.000.000 hl (mil setecientos millones de hectolitros) de cerveza (Buiatti, 2009).

La cerveza es una bebida acuosa fermentada a base de almidón y con sabor a lúpulo. Esta definición simple abarca los cuatro ingredientes esenciales, que se utilizan en la elaboración de cerveza, entre los que se encuentran el agua, el lúpulo, la malta y la levadura. El cuerpo de la cerveza lo proporciona la cebada, más específicamente la malta de cebada, y, en general, se usan pocos gramos para un litro de cerveza. La malta puede estar parcialmente sustituida por complementos ricos en almidón, como arroz, maíz o trigo (De Keukeleire, 2000). Asimismo, desde el punto de vista tecnológico, la cerveza es pura, saludable, valiosa y muestra una variedad de estilos y géneros. En esta bebida no se encuentran gérmenes patógenos debido al valor de pH, la presencia de sustancias de lúpulo, el ambiente anaeróbico, el contenido de alcohol y también el hecho de que la levadura metaboliza casi todos los azúcares fermentables (Wunderlich & Back, 2009).

Por otro lado, comprender los mecanismos de cómo las materias primas y sus interacciones influyen en la calidad de la cerveza es fundamental para la industria cervecera (Iimure & Sato, 2012). Los rasgos organolépticos de la cerveza son altamente discernibles por los consumidores en función del sabor (gusto y aroma), apariencia y sensación en boca. Estos atributos organolépticos son variables y definen el estilo general de la cerveza e impulsan las tendencias del consumidor (Briggs, 2004).

Existen varios estudios en los que se ha comprobado que el sabor de la cerveza se ve afectado en gran medida por las reacciones que se generan en el proceso de producción, además, se ha determinado que es un producto químicamente inestable (Bokulich & Bamforth, 2013) y que su

composición cambia continuamente durante el almacenamiento (Vanderhaegen et al., 2006, 2007). Es por esto que la determinación de compuestos volátiles azufrados es de considerable interés en la industria cervecera debido a los bajos umbrales de sabor de estos compuestos. De la misma forma, se ha demostrado que en concentraciones más altas, estos compuestos pueden causar efectos de sabor negativos y pueden usarse como indicadores de problemas durante la fermentación (Burmeister et al., 1992).

Debido a que los consumidores de cerveza son sensibles a los compuestos azufrados, se han desarrollado varios métodos y técnicas para la identificación y cuantificación de los mismos. Estos son herramientas valiosas para asegurar la calidad de esta bebida y la satisfacción de los consumidores.

En el presente trabajo de titulación mediante revisión bibliográfica se espera identificar los compuestos azufrados presentes en cerveza, relacionar la presencia de compuestos azufrados con las características de la misma y describir los métodos analíticos utilizados para identificar y cuantificar los compuestos azufrados en esta bebida.

CAPÍTULO I

1.1 Compuestos azufrados presentes en la cerveza

Los compuestos individuales de azufre provienen de las principales materias primas utilizadas para hacer cerveza (lúpulo, malta o levadura). Pueden desarrollarse, entre otras cosas, a través de la degradación térmica de precursores como la metionina, por ejemplo, sulfuro de dimetilo (DMS) a partir de la degradación de Smetillmetionina de malta, un compuesto saborizante muy potente (B. J. Anness & Bamforth, 1982) o sino por las reacciones de oscurecimiento de Maillard (Hill & Smith, 2000). “Los dicarbonilos que se forman durante esta reacción catalizan la degradación de Strecker de la cisteína a mercaptoacetaldehído, acetaldehído, sulfuro de hidrógeno y otros compuestos” (Teranishi et al., 1992). De manera similar, la degradación de Strecker de la metionina produce metionina que se hidroliza aún más al metilmercaptano e hidroxipropionaldehído (Mussinán & Keelan, 1994), dentro de estas reacciones también se encuentra la fotólisis de componentes amargos de lúpulo (Hill & Smith, 2000), además, algunos compuestos azufrados se originan gracias al metabolismo de la levadura durante la fermentación (Martin et al., 1999; Matsui & Amaha, 2014), y como subproductos del crecimiento de organismos de descomposición (Hill & Smith, 2000). Es así que existen muchos compuestos de azufre que contribuyen de manera diferente a las características de la cerveza, los cuales se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Compuestos volátiles de azufre que se encuentran comúnmente en la cerveza

| Compuesto de azufre | Descriptor de sabor |
|----------------------|-------------------------------|
| Sulfito | Picante |
| Sulfuro de hidrógeno | Huevo podrido |
| Dióxido de azufre | Sulfuroso, fósforo quemado |
| Disulfuro de carbono | - |
| Metanotiol | Putrefacción, desagüe |
| Sulfuro de etileno | - |
| Etanotiol | Putrefacción |
| Propanotiol | Putrefacción, caucho |
| Dimetil sulfuro | Maíz dulce, tomates enlatados |
| Dietil sulfuro | Vegetales cocidos |
| Dimetil disulfuro | Vegetales podridos |
| Dietil disulfuro | Ajo, caucho quemado |

| | |
|-----------------------|--|
| Dimetil trisulfuro | Vegetales podridos, cebolla |
| Metil tioacetato | Repollo |
| Etil tioacetato | Repollo |
| Metionol | Patatas crudas |
| Metional | Puré de papas, en forma de sopa |
| 3-metil-2buteno-1tiol | Zorrillo, como un puerro, sabor a luz |

(P. Sh. E. D. Baxter, 2001).

Al mismo tiempo, el azufre es de gran importancia a lo largo de la preparación de la cerveza debido a que su presencia es un factor esencial para el crecimiento y el metabolismo de la levadura, también como un contribuyente a las propiedades organolépticas de esta bebida, especialmente para los defectos de aroma y sabor (Hysert & Morrison, 1976). Los compuestos de azufre son fundamentales para las levaduras en la formación de aminoácidos, proteínas y coenzima A. Dichos compuestos se generan a partir de iones sulfato, sulfito y sulfuro que permanecen presentes en el mosto (James et al., 2014). La levadura produce sulfuro de hidrógeno y dióxido de azufre a lo largo de la fermentación. *S. cerevisiae* genera sulfito como producto intermedio durante la reducción de sulfato a sulfuro, que es importante para la biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre como la metionina y la cisteína. Estos aminoácidos son esenciales ya que son causantes de la composición aromática en la cerveza (James et al., 2014). De hecho, las sustancias que contienen azufre en el mosto y los medios de fermentación pueden clasificarse de manera más simple como volátiles o no volátiles. La primera categoría, aun cuando representa un pequeño porcentaje del total de azufre, juega un papel predominante en la determinación del sabor y aroma de la cerveza, además, dichos compuestos poseen la característica de ser bastante reactivos (Hysert & Morrison, 1976). También se puede mencionar otra clasificación donde indica que los compuestos de azufre no volátiles se pueden dividir adicionalmente en sulfato y compuestos de organosulfuro no volátiles (Hysert & Morrison, 1976).

Además, se han detectado varios compuestos azufrados volátiles con olor activo en cervezas. Los ejemplos de estos incluyen metanotiol, etanotiol, H₂S, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, metional, metionol, acetato de 3- (metiltio) propilo y 2-mercapto-3-metil-1-butanol (Angelino, 1991; Hill & Smith, 2000). La mayoría de los compuestos causan olores desagradables, como el huevo podrido, el repollo, la cebolla y el ajo. Sin embargo, algunos tienen un impacto positivo en el sabor de la cerveza al acentuar la frutalidad (S. Liu, 2015).

En primer lugar, se conoce que la creciente concentración de metanotiol durante la oxidación de la cerveza se puede explicar por su liberación de complejos de aldehídos (Gijs & Collin, 2018). De la misma forma, el metional se puede reducir a metanotiol. Esta molécula juega un papel clave en la biosíntesis de varios compuestos de azufre importantes. Diversos compuestos tienen la capacidad de ser precursores del metanotiol, como metionina y S-metilcisteína, sin embargo, la ruta primordial es por medio de la degradación de la metionina por las actividades de la liasa. La oxidación espontánea del metanotiol crea DMDS, DMTS y tetrasulfuro de dimetilo, este último con el umbral de detección más bajo en agua (0,06 ppb). El metanotiol se combina con ácidos o acil CoA para generar metiltioésteres y con aldehídos para producir tioacetales (Spinnler et al., 2002). El metanotiol puede surgir de SO_2^- o del grupo tiometilo separado de la metionina (Shankaranarayana et al., 1974). El metiltiopropionaldehído generalmente se considera el principal precursor del metanotiol. Luego de la degradación de la metionina por parte de Strecker, el 3-metiltiopropionaldehído se descompone de forma fácil en tiol y acroleína (Ballance, 1961), especialmente cuando el pH es alto (Chan & Reineccius, 1994; Madruga & Mottram, 1995). También se ha informado que el hierro y el metabisulfito deberían aumentar los niveles de metanotiol y propenal cuando el pH es aproximadamente 3 (Wainwright et al., 1972). Siempre que el pH no sea cercano a 8.5, el 3-metiltiopropionaldehído también podría producir metanotiol en presencia de riboflavina y luz (Allen & Parks, 1975; Patton, 1954; Yang, S et al., 1967). En cuanto al metil tioacetato, se forma durante la fermentación del mosto y se propuso que se producía a partir de metilmercaptano (MeSH) o L-metionina por levadura (Wakatsuki et al., 1979). Dentro de los compuestos más estudiados en la cerveza se encuentran el dióxido de azufre y el sulfuro de hidrógeno en los cuales la concentración de ciertos aminoácidos en particular, los aminoácidos que contienen azufre, influyen en la formación de estos durante la fermentación de la cerveza (Duan et al., 2018). Asimismo, se puede presentar otro tipo de reacción donde el sulfuro de hidrógeno puede reaccionar con furanonas que conducen a la formación de heterociclos que contienen azufre (Charalambous, 1975). También se necesita mencionar que cuando la levadura se encuentra en malas condiciones, esta produce más sulfuro de hidrógeno (H_2S) en la cerveza, del mismo modo, cualquier otro componente que dificulte la fermentación (por ejemplo, la falta de zinc o vitaminas) también conduce a un crecimiento en los niveles de H_2S en la cerveza. El H_2S además es un producto de la autólisis de la levadura, que ocurre en levaduras poco saludables (Charles W Bamforth, 2000).

Otro de los principales factores que influyen en el contenido de dióxido de azufre en la cerveza son la gravedad original del mosto (concentración de azúcar) y el tipo de fermentación. En la mayoría de los casos, las cervezas con fermentación superior poseen niveles de dióxido de azufre significativamente más bajos que las cervezas con fermentación del tipo inferior. Los aminoácidos que contienen azufre absorbidos por la levadura llegan a descomponerse aún más y el exceso de azufre se desecha como sulfuro de hidrógeno, que podría ser responsable del sabor del huevo podrido (Buiatti, 2009). Cabe mencionar que, la producción de sulfuro de hidrógeno libre está

influenciada por la cepa de levadura y su formación es paralela a la intensidad del proceso de fermentación (Buiatti, 2009).

En cuanto al sabor, el H₂S (sulfuro de hidrógeno) tiene un umbral bastante bajo (10 partes por mil millones [ppb]) y puede ocurrir en la cerveza a niveles de hasta 200 ppb. No obstante, el umbral de sabor de SO₂ (dióxido de azufre) en la cerveza es mucho más elevado (25 partes por millón [ppm]) que el del H₂S, y la unión a los carbonilos generalmente conserva el SO₂ libre por debajo del umbral sensorial, lo que proporciona un margen para la adición después de la fermentación (Duan et al., 2018). Por otra parte, el SO₂ tiene la característica de unirse a los compuestos de carbonilo de sabor rancio que producen aductos de bisulfito que enmascaran el sabor desagradable del carbonilo, y el SO₂ actúa como un reductor que ralentiza la oxidación en la cerveza. Los aductos de bisulfito de SO₂, así como el SO₂ libre, pueden actuar como trampas de radicales libres (Duan et al., 2018).

Otro compuesto importante en la cerveza responsable de los sabores de azufre es el sulfuro de dimetilo (DMS). A concentraciones moderadas (30–100 ppb) se considera un componente esencial de las cervezas lager (Briggs et al., 2004.). Sin embargo, a altas concentraciones, tiene un sabor relativamente desagradable, parecido al aroma del maíz dulce cocido. Los valores más bajos de DMS en cervezas además podrían explicarse por la mayor actividad enzimática durante el macerado de infusión (típico en la producción de cervezas) o posiblemente pueden deberse a las temperaturas más altas usadas en la fermentación superior (Buiatti, 2009).

Para tal efecto, las dos rutas principales que conducen a la formación de DMS en la cerveza son primero la degradación térmica de la S-metilmetionina (SMM) durante el secado al horno de la malta y las etapas calientes del proceso de elaboración (ebullición del mosto y clarificación del mosto) (Buiatti, 2009). SMM es sensible al calor y se descompone rápidamente cada vez que la temperatura supera los 80°C (Charles W Bamforth, 2000). Si la ebullición es vigorosa, la mayor parte de los SMM se convierten en DMS y esto se volatiliza. Si las condiciones son más suaves en la ebullición; cualquier SMM que sobreviva al hervor se dividirá en DMS, sin embargo, el hecho de que las condiciones no sean turbulentas significa que la superficie disponible para la pérdida de DMS se disminuye mucho y tiende a permanecer en el mosto (Charles W Bamforth, 2000). En segundo lugar, la reducción de dimetilsulfóxido (DMSO) por la levadura durante la fermentación o durante la cocción de la malta (Ferreira & Guido, 2018). Sin embargo, DMSO es estable al calor y persiste sin cambios durante estas etapas (Briggs et al., 2004.). No obstante, es soluble en agua y tiene la capacidad de entrar en el mosto a niveles bastante altos y algunas levaduras son muy hábiles para reducirlo a DMS (Charles W Bamforth, 2000).

Además, se ha reportado que en las cervezas provenientes de Canadá existe la presencia de los sulfuros superiores, dimetil disulfuro (DMDS), dimetil trisulfuro (DMTS) y dimetil tetrasulfuro (DMTetraS) (Williams & Gracey, 1982a). El DMTS, en particular, ha sido reconocido como uno de los compuestos volátiles del lúpulo más potentes en sabor (Sharpe & Laws, 1981). Se ha observado que los niveles más altos de tetrasulfuro de dimetilo se producen normalmente en los

aceites de lúpulo que también contienen niveles relativamente altos de trisulfuro de dimetilo. Se sospecha que el tetrasulfuro de dimetilo se puede formar a partir del trisulfuro de dimetilo durante la destilación al vapor de lúpulo a 100°C (Terence Leonard Peppard, 1980). Al igual que con el trisulfuro, el tetrasulfuro de dimetilo no se ha detectado en los aceites de lúpulo preparados mediante el proceso de baja temperatura, lo que nuevamente indica la formación a partir de un precursor sensible al calor (T. L. Peppard, 1981). Se sabe también que el metional, a su vez, es un precursor de la formación de trisulfuro de dimetilo durante la etapa de envejecimiento de la cerveza (Gijs et al., 2000). Se ha propuesto que, como ocurre con muchos vegetales que desarrollan DMTS durante la cocción (F. T. Maruyama, 1970) a temperaturas elevadas como las que se usan para hervir el mosto, el sulfóxido de S-metilcisteína es capaz de eliminar el ácido metanosulfénico inestable, que puede reaccionar con el sulfuro de hidrógeno (ya sea del lúpulo o de otras fuentes de mosto) para producir DMTS. Por sí solo, el ácido metanosulfénico también puede causar la formación de DMDS (F. T. Maruyama, 1970). Esto se refiere solo a lúpulos sulfurados o envejecidos; los lúpulos recién sulfurados aparentemente producen poco o nada de DMTS. Esto ocurre porque los sulfóxidos se reducen a sulfuros mediante dióxido de azufre acuoso o bisulfito a pH ácido (Johnson et al., 1972).

A continuación se encuentra “el metilmercaptano, el cual también se produce a partir de S-metilcisteína por *Saccharomyces cerevisiae*, al mismo tiempo, cataliza la producción de etilmercaptano a partir de etionina y metilmercaptano” (Cherest et al., 1970). Los mercaptanos son tioalcoholes, compuestos en los cuales el -OH del alcohol ha sido reemplazado por el grupo tiol -SH. El más importante es el 3-metil-2-buteno-1-tiol (MBT) que imparte a la cerveza un sabor desagradable, parecido a una mofeta (descrito también como sabor al sol) y se origina por exposición a la luz. Esto hace que la fotólisis de la cadena lateral 4-metil-pentenilo de isoácidos (sustancias amargas de la cerveza) libere un radical isopentenilo que puede reaccionar con un radical tiol para formar MBT. El umbral de este compuesto es extraordinariamente bajo, de hecho, se puede detectar a un nivel tan bajo como 0.4 partes por billón (ng/l) (Buiatti, 2009). La formación y presencia de este compuesto explica por qué la cerveza generalmente se envasa en botellas de vidrio marrón o verde oscuro, proporcionando cierta protección del producto contra la fotólisis (Buiatti, 2009).

Otro sabor rancio que es desagradable en la cerveza cuyo carácter proviene de la 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (cetona de gato) puede desarrollarse rápidamente en cervezas que se empaquetan y almacenan con cantidades significativas de aire en el espacio superior (Clapperton, Dalgliesh, Meilgaard, 1976). Un sabor desagradable proveniente de este compuesto en cerveza lager envejecida se atribuye al formiato de 3-mercapto-3-metilbutilo (Schieberle, 1991a). Se detecta mercapto-3-metilbutanol en una cerveza finlandesa caracterizada por un intenso sabor a "cebolla" y se sugiere que probablemente se deriva del lúpulo (Olsen et al., 1988). Seguidamente, la degradación térmica de la tiamina (vitamina B1) proporciona otra fuente de

compuestos aromatizantes que contienen azufre, muchos de ellos heterocíclicos (Teranishi et al., 1992).

Otro de los compuestos que se genera y aumenta gradualmente durante la oxidación de la cerveza es el aroma de repollo podrido azufrado de metanotiol, lo cual puede explicarse por su liberación de los complejos de aldehído (Gijs & Collin, 2018; Lusk et al., 2012). En la cerveza, se sabe que durante el proceso de maceración (durante el cual la malta se calienta en agua), la metionina se transforma en metionina por medios estrictamente químicos (lo que se denomina degradación de Strecker). Una oxidación adicional puede conducir a la formación de metanotiol (Landaud et al., 2007). El metiltiopropionaldehído generalmente se considera el precursor primordial del metanotiol. También, gracias a la degradación Strecker de la metionina, el 3-metiltiopropionaldehído se descompone fácilmente en tiol y acroleína (Ballance, 1961).

El metabolismo de la metionina a través de la vía de Ehrlich en levaduras conduce a la producción de una variedad de compuestos volátiles azufrados, que incluyen metionol, ácido metiónico, acetato de metionilo y 3-metiltio-1-propanoato de etilo. De la misma forma, la metionina se reduce principalmente a metionol, que es un compuesto volátil del metabolismo de la metionina por las levaduras (S. Liu, 2015). También se ha encontrado que dicho compuesto se forma durante la reacción de Maillard o a lo largo de la fermentación alcohólica (Pinho et al., 2006). Asimismo, se ha comprobado que se deriva del aminoácido azufrado metionina y ambos imparten un fuerte olor que recuerda a sopa, carne, cebollas y patatas (Arctander, 1969).

Adicionalmente, el aroma de papa de metional es un precursor de la formación de trisulfuro de dimetilo durante el envejecimiento de la cerveza (Gijs et al., 2000) y es un contribuyente clave al sabor a mosto de las cervezas sin alcohol (Perpète & Collin, 1999). También, el etanotiol y el propano-1-tiol manifiestan olores a podrido bastante potentes, con cierta reminiscencia de las cebollas (Herderich, et al., 2011; Li et al., 2012).

Por último, desde hace mucho tiempo se conoce un sabor desagradable a cebolla en la cerveza, uno de los responsables es el 2-mercapto-3-metilbutanol (2S3MBol) (Olsen et al., 1988; P. Taylor et al., 2005). En los modelos de medios, el sulfuro de hidrógeno puede inducir 3 tipos diferentes de reacciones químicas que involucran este alcohol alílico: sustitución nucleofílica, adición electrofílica (Markovnikov) y adición radical (anti-Markovnikov), lo que conduce a MBT, 3-mercapto-3 metilbutanol (3S3MBol) y 2S3MBol, respectivamente. Como la levadura excreta naturalmente sulfuro de hidrógeno, la misma reacción podría ocurrir durante la fermentación de la cerveza (Gros et al., 2009). El principal precursor de 2-mercapto-3-metilbutanol (2S3MBol) es el 2,3-epoxi-3-metilbutanal (EMB) (Noba et al., 2018) y se ha comprobado en varios estudios que la aireación en caliente del mosto aumenta la concentración de 2S3MBol, lo que sugiere que el precursor de este compuesto en el mosto aumenta a medida que el mosto se oxida (Noba et al., 2017).

CAPÍTULO II

2.1 Métodos de identificación de compuestos azufrados presentes en la cerveza

Dentro de la industria cervecera es de vital importancia conocer acerca de los compuestos que se generan durante cada etapa de elaboración de este producto, por lo tanto, se han desarrollado métodos y técnicas que ayudan a identificarlos y cuantificarlos para asegurar la calidad de esta bebida alcohólica. Entre estos métodos se encuentran los de la AOAC (Official Methods of Analysis) por sus siglas en inglés, estos proveen los procesos científicos adecuados para asegurar la calidad de los alimentos, entre los que se incluye la cerveza. Es por esto que se describen algunos de ellos en la parte de anexos del presente trabajo.

A continuación, se describen varios métodos que sirven para la identificación y/o cuantificación de los compuestos azufrados presentes en la cerveza.

2.1.1 Resonancia magnética nuclear (RMN):

La base de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear está en las propiedades magnéticas del núcleo. El magnetismo del nucléolo atómico puede explicarse mostrando que el nucléolo atómico se considera como un cuerpo esférico y que gira alrededor del eje del centro. El protón se encuentra en el núcleo, por lo que el núcleo está cargado positivamente (Yeliz & Nuray, 2004). Es necesario mencionar que un espectro de RMN brinda la siguiente información: el número de picos indica diferentes tipos de núcleo, la ubicación del pico indica el tipo de núcleo y entorno químico, las áreas relativas de los picos dan el número relativo de cada tipo de núcleo y la interrupción en el pico, indica los núcleos afectados de cada uno (Keeler, 2010).

Asimismo, la resonancia magnética nuclear estudia la relación entre los núcleos atómicos magnéticamente activos con radiación electromagnética de radiofrecuencia en un campo magnético externo fuerte. Los núcleos magnéticamente activos ("espines") en los carbohidratos que son de interés práctico para la espectroscopía de RMN incluyen los núcleos ^1H y ^{13}C . Tanto ^1H como ^{13}C son núcleos spin- $\frac{1}{2}$, es decir, la orientación del vector dipolar magnético neto del núcleo en un campo magnético externo es paralela o antiparalela a la dirección del campo externo (B_0). La magnetización macroscópica neta de una muestra en equilibrio es paralela al eje del campo B_0 , debido a que la orientación paralela de un espín individual se ve beneficiada energéticamente sobre la orientación antiparalela; por lo tanto, cuando una gran cantidad de núcleos ^1H o ^{13}C se ubican en un fuerte campo magnético externo, la mayoría de los espines se orientarán paralelos al campo externo en la situación de equilibrio termodinámico. La discusión adicional se limita a los núcleos ^1H ("protones"), principalmente por la razón de que la combinación de su abundancia natural (99.98% vs 1.11% para ^{13}C) y su momento dipolar magnético inherentemente fuerte (cuatro veces más fuerte que el de ^{13}C) ayuda a que el método de RMN sea mucho más sensible para la observación de núcleos ^1H que para cualquier otro tipo de núcleo presente en las biomoléculas (Keeler, 2010).

Es posible hacer que los espines nucleares resuenen, es decir, que puedan cambiar su orientación de paralelo a anti paralelo (y viceversa) con respecto al campo magnético externo. En la situación de no equilibrio resultante, la magnetización macroscópica de la muestra ya no coincide con el eje B_0 . Para lograr la "resonancia" (spin-flip), se necesita energía. La energía se pone en el conjunto de espines a través de un pulso corto de radiación electromagnética de radiofrecuencia, con frecuencias típicamente del orden de 200 a 600 MHz (Van Halbeek, 1994). La frecuencia precisa requerida para la resonancia es directamente proporcional a la intensidad del campo B_0 ; los campos magnéticos utilizados para la espectroscopía de RMN están usualmente entre 5 y 15 T. Cuando la muestra se irradia con un pulso de radiación de radiofrecuencia, todas las posibles resonancias de RMN se excitan simultáneamente. Después del pulso, los giros intentan restablecer ("relajarse") su orientación de equilibrio, de modo que la magnetización macroscópica de la muestra sea paralela a B_0 nuevamente. Cada giro de protones lo hace mediante un movimiento en espiral, llamado precesión, alrededor del eje del campo B_0 . Cada protón tiene su propia frecuencia de precesión característica. La frecuencia de precesión está determinada por la densidad electrónica (relativa) del protón en la molécula, y la interacción ("acoplamiento") con otros protones en la misma molécula (Van Halbeek, 1994).

Además, la observación de la resonancia magnética nuclear se basa en dos propiedades de los núcleos: carga y giro. El movimiento de carga en un núcleo giratorio genera un campo magnético cuyo vector es paralelo al eje de rotación. En otras palabras, el núcleo posee un momento magnético. La propiedad fundamental del espín se describe mediante el número cuántico del espín nuclear, I (en unidades de $h/2$, donde h es la constante de Planck), su valor está determinado por el número de masa atómica y el número atómico. La gran mayoría de los estudios de RMN en bioquímica han utilizado núcleos de número de espín $1/2$: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P (J. K. M. Roberts & Jardetzky, 1985).

La RMN posee una gran variedad de ventajas. En particular, no es destructivo, no está sesgado y es fácilmente cuantificable, necesita poca o ninguna separación, permite la identificación de nuevos compuestos y no necesita derivatización química. La RMN es adecuada para compuestos que son difíciles de manejar para el análisis de cromatografía de gases – espectroscopía de masas (GC-MS) o LC-MS (por ejemplo, azúcares, aminas, cetonas volátiles y compuestos relativamente no reactivos). Por otro lado, una desventaja clave de la RMN es que es una técnica relativamente insensible, con un límite inferior de detección de aproximadamente 1 a 5 μM y un requisito para tamaños de muestra relativamente grandes (500 μL) (Wishart, 2008).

En un estudio se investiga la formación de aductos de bisulfito de trans-2-butenal usando espectroscopía de resonancia magnética nuclear ^1H (^1H NMR). Debido a su mayor solubilidad en agua (15g/100g), el aldehído insaturado trans-2-butenal se utiliza para modelar el comportamiento de trans-2-nonenal, porque la solubilidad relativamente baja de trans-2-nonenal

en agua podría ser una limitación en la sensibilidad del método de RMN tanto en sentido cualitativo como cuantitativo. Una ventaja adicional del uso de trans-2-butenal es que el desplazamiento químico del grupo metilo terminal de trans-2-butenal es diagnóstico de las reacciones que ocurren en las posiciones de doble enlace y aldehído. Se destila trans-2-butenal (Janssen Chimica, Geel, Bélgica) (pe 104 °C) antes de su uso para eliminar cualquier ácido butenóico. Para el análisis del nivel de bisulfito de sodio (Janssen Chimica) se realiza mediante titulación yodométrica (Dufour et al., 2018).

En cuanto a los espectros de ^{13}C NMR, la espectroscopía correlacionada homonuclear (COSY) y la correlación heteronuclear a través de coherencia cuántica múltiple (HMQC) se obtiene en un espectrómetro Varian VXR-300 que funciona a 75 MHz y 300 MHz, respectivamente. Los espectros de ^1H NMR se obtienen en un espectrómetro que funciona a 200 MHz. Los espectros se registran en D_2O (o D_2O al 10% en H_2O) a 25°C, además contiene dioxano como referencia externa (3,70 ppm para ^1H NMR y 67,8 ppm para ^{13}C NMR). La señal de agua residual en los espectros de ^1H NMR se suprimen por pre saturación. Las especies se cuantifican a partir de los valores integrales de las señales de protones designadas, que se eligen juiciosamente para evitar la superposición espectral y cualquier intercambio isotópico. La concentración de bisulfito en relación con el aldehído insaturado puede o no estar en exceso. Por lo tanto, el análisis de ^1H NMR de la dinámica de la adición de bisulfito a trans-2-butenal se investiga en un rango de concentraciones (14-2.021 mM trans-2-butenal) (Dufour et al., 2018).

Para la preparación de 1-hidroxi-1,3-butanodisulfonato de sodio (Especie C), se agita durante una semana una solución de trans-2-butenal (10 g, 0.143 mol) y bisulfito de sodio (30 g, 0.288 mol) en H_2O (60 ml). El H_2O y cualquier trans-2-butenal sin reaccionar se elimina mediante liofilización. Si los resultados de la titulación muestran la presencia de un pequeño porcentaje de bisulfito de sodio sin reaccionar; la especie C impura se disuelve nuevamente en H_2O (60 ml) y se agita durante tres días más con trans-2-butenal (2g, 0.028 mol). El compuesto se aísla como un polvo blanco mediante liofilización y se recristaliza para dar cristales blancos. El rendimiento es del 58% (Dufour et al., 2018).

Para las mediciones de pH de bisulfito y trans-2-butenal almacenados se realizan soluciones, donde se añade bisulfito de sodio (225 mg, 2.14 mmol y 670 mg, 6.42 mmol) para triplicar soluciones de trans-2-butenal (150 mg, 21.4 mmol) en H_2O (150 ml, desgasificado). Se añade KH_2PO_4 (8.165 g) al primer conjunto. Tanto el primer conjunto como el segundo se mantienen bajo una atmósfera inerte. El pH de cada sistema se mide a intervalos regulares durante un período de 10 meses. Solo el pH del conjunto de muestra sin tampón, que no se mantiene en atmósfera inerte, disminuye lentamente debido a la oxidación del bisulfito, como lo indica una prueba positiva con cloruro de bario. Los otros dos conjuntos mantienen su pH inicial durante 10 meses. En consecuencia, las soluciones no se tamponan y las muestras de ^1H NMR se

almacenan en una atmósfera inerte para evitar la oxidación del bisulfito durante el transcurso del experimento (Dufour et al., 2018).

Para las condiciones de reacción de carbonil-bisulfito se transfirieron soluciones (600 μ l de trans-2-butenal), con una concentración de 14.25 mM (preparada mediante dilución de una solución madre 171 mM) a 2.021 mM (preparada añadiendo el trans-2-butenal en volumen a D₂O desgasificado) a tubos de RMN (5 mm de diámetro interno). La concentración más baja representa el límite práctico en el que los niveles de traza de los productos de reacción clave pueden cuantificarse con seguridad en el espectrómetro de RMN de 200 MHz. El bisulfito de sodio se añade en masa en las proporciones molares (butenal: bisulfito) 1:0.5, 1:0.8, 1:1, 1:2, 1:3 y 1:5. Las soluciones que se utilizan en el estudio mecanicista no deben estar tamponadas (pD 4.0) y no deben contener etanol ni sal adicional. Las muestras se apartan en etanol al 5% (v/v) y d₆-etanol al 5% (v/v). Las muestras se almacenan a 20°C en atmósfera inerte. El espacio libre de la muestra se purga con gas inerte después de cada análisis de RMN. Los sistemas se controlan durante 6.000 horas (250 días) (Dufour et al., 2018).

En cuanto a las titulaciones yodométricas se añade la especie C (40 mg, 0.144 mmol) a una solución de NaOH desgasificada (20 ml, 0.5 M). El espacio de cabeza se purga con gas nitrógeno y la muestra sellada se deja durante 30 min a 35°C. La solución se acidifica usando H₂SO₄ (35 ml, 0.5 M) seguido de una adición de solución de KIO₃ (20 ml, 0.01 M) y KI (1 g, 0.006 mol), se vuelve a sellar y se deja reposar durante 10 min. La solución se valora frente a una solución estandarizada de S₂O₃²⁻ (0,06 M) y el punto final se determina usando una solución de almidón recién hervida (Dufour et al., 2018).

2.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

La cromatografía de líquidos es una técnica analítica de separación muy utilizada y bastante popular. Esto se debe a que es bastante sensible, también por su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, por su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, por su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas. Con el objetivo de alcanzar flujos razonables con rellenos de tamaño de partícula de entre 3 y 10 μ m, que por otra parte son comunes en la cromatografía de líquidos moderna, se requieren presiones de bombeo de varios cientos de atmósferas. Debido a estas presiones elevadas, el equipo necesario para la cromatografía de líquidos de alta resolución tiende a ser más complejo y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos característico son: recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento del solvente, sistemas de bombeo, bombas

reciprocantes, bombas de desplazamiento, control de flujo y sistemas de programación, sistemas de inyección de muestra, columnas para cromatografía de líquidos de alta resolución, detectores (Skoog et al., 2007).

2.1.3 Cromatografía de gases:

En cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se logran separar como consecuencia de que se reparten entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es transportar este último a través de la columna (Skoog et al., 2007). Al momento de realizar separaciones mediante cromatografía de gases se han utilizado varios detectores y el más común es el detector fotométrico de llama.

2.1.4 Detector fotométrico de flama:

El detector fotométrico de llama (FPD, por sus siglas en inglés) se ha utilizado de manera extensa para el análisis de contaminantes del aire y del agua, de plaguicidas y de los productos de la hidrogenación del carbón. Se trata de un detector selectivo que es sensible sobre todo a los compuestos que contienen azufre y fósforo. En este detector el eluyente se hace pasar a través de una flama de hidrógeno-aire a baja temperatura, la cual convierte parte del fósforo en una especie HPO que emite bandas de radiación centradas alrededor de 510 y 526 nm. El azufre de la muestra cambia al mismo tiempo a S₂, el cual tiene la capacidad de emitir una banda centrada en 394 nm (Skoog et al., 2007).

En un estudio se expone que el mecanismo principal que contribuye a la generación de trans-2-nonenal en la cerveza es la oxidación enzimática o no enzimática de lípidos y ácidos grasos libres oxidados. Esta hipótesis se examina buscando relaciones entre la actividad de la lipoxigenasa en la malta, el potencial de no entrada en el mosto y los valores en la fermentación del mosto y la cerveza en relación con la estabilidad sensorial del sabor de la cerveza terminada. Se desarrollan nuevos métodos para determinar el potencial nonenal y los valores trans-2-nonenal. Primero, el potencial nonenal en mosto y, en segundo lugar, los métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de gases (GC) para el análisis de trans-2-nonal y componentes relacionados en la cerveza (Drost et al., 1990).

Para la determinación de trans-2-nonenal en cerveza a niveles de sub partes por billón ($\mu\text{g} / \text{L}$), se desarrolla un método de HPLC que usa técnicas de derivatización de columna y cambio de columna (Verhagen & Strating, 1987). Esta técnica no es aplicable a los alcoholes, debido a la derivatización con dansilhidrazina. Para el análisis de GC de productos de degradación de pruebas precursoras. Los análisis de trans-2-nonenal, trans-2-octenal, 2,4-decadienal y otros

productos de degradación de las pruebas precursoras en cerveza se realizan con análisis GC usando derivatización con opentafluorbenciloxiamina (flox) (Drost et al., 1990).

Entre los reactivos se encuentran: todos los disolventes orgánicos se obtienen de Rathburn Chemicals (Escocia) y deben ser de calidad HPLC. El n-pentano debe ser de grado analítico (Promochem, FRG) y se redestila antes de su uso. Se obtiene trans-2-Nonenal (97%) de Aldrich Chemie (Bruselas, Bélgica) y 2-nonen-1-ol y 1-nonanol (99%) de Alfa Products (Karlsruhe, FRG). El n-Decanol (el estándar interno para GC) se obtiene de E. Merck (Darmstadt, FRG). El ácido linoleico (99%), que se utiliza en el ensayo de lipoxigenasa, se obtiene de Sigma (St. Louis, MO) (Drost et al., 1990).

El equipo consiste en un Carlo Erba 5300 Mega con detección de captura de electrones y una columna capilar de sílice fundida WCOT (50 m X 0.23 mm d.i.) recubierta con 0.20 µm CP-Sil 19 CB (Chrompack) con hidrógeno (velocidad lineal del gas 25 cm/s; 0.95 kg/cm²) como gas portador. El programa de temperatura comienza a 180°C durante 7 min, sube a 8°C/min: o 220°C (4 min constante), luego a 15°C/min hasta la temperatura final de 300°C. Muestras (20 ml) se concentran en un cartucho Sep-pak C18, se secan con nitrógeno, se lavan a contracorriente con 1.5 ml de hexano y luego se derivatizan con flox durante 1 hora a 65 ° C (Drost et al., 1990).

Para el análisis GC de trans-2-nonenal y sus productos de reducción originados durante las pruebas de fermentación, el análisis GC se realiza en un cromatógrafo Carlo Erba Fractovap 4160 equipado con inyección en columna fría y detección de ionización de llama. Se usa una columna capilar de sílice fundida WCOT (60 m X 0.25 mm di) recubierta con cera DB de 0.25 µm (J&W Scientific, Folsom, CA) con nitrógeno (velocidad lineal del gas 14 cm / seg; 1.1 kg / cm²) como vehículo de gas. La temperatura del horno se programa inicialmente a 50°C y se eleva inmediatamente después de la inyección en columna de 1µl de extracto de pentano a 170°C a 30°C/min (14 min de temperatura constante) y luego a una temperatura final de 220°C. Para la preparación de la muestra, se agitan 10 ml de la muestra de cerveza joven, enriquecida con 8.3 µg de n-decanol como patrón interno, con 1 ml de n-pentano en un tubo cerrado durante 2 min a temperatura ambiente. A continuación, la capa de n-pentano se separa de la capa acuosa mediante centrifugación, se elimina y se seca sobre sulfato de sodio anhidro (Drost et al., 1990).

El potencial nonenal es una especie de prueba de forzamiento para determinar el potencial de un mosto para formar trans-2-nonenal en condiciones de cerveza (pH 4.0; oxígeno reducido). Se calienta el mosto (10 ml) ajustado a pH 4.0 con ácido fosfórico en un tubo cerrado durante 2 horas a 100°C en atmósfera de argón. Se usa argón para excluir la mayor cantidad de oxígeno posible para crear una simulación del proceso de envejecimiento en una botella de cerveza cerrada. El trans-2-nonenal que se forma se analiza mediante un método de HPLC simplificado (Drost et al., 1990).

Además se realiza un ensayo de lipoxigenasa donde la actividad lipoxigenasa se determina según Baxter (E. Denise Baxter, 1982); la concentración final de ácido linoleico en el ensayo es de 1.4 mM a un pH de 7.0. La actividad de la enzima es seguida por el aumento de la absorción a 234 nm debido a la formación de hidroperóxido. La actividad de la lipoxigenasa se define como $\Delta E_{234} / 4 \text{ min}$, medida en el rango lineal de absorción (Drost et al., 1990).

Los extractos de malta se preparan mediante incubaciones de 10 minutos de 50g de harina de malta (molino Buhler-Miag 0.2 mm, Minneapolis, MN) en 200 ml de agua a 45°C en un baño de maceración. Las muestras se enfrían inmediatamente en hielo y se separan por centrifugación (12500 x g durante 1,5 min); se incuban 50 μl de extracto de enzima en 2.5 ml de tampón a 20°C (Drost et al., 1990).

Para el experimento de fermentación se llevan a cabo fermentaciones discontinuas agitadas del mosto de producción (12 °P) y deben ser por duplicado en fermentadores de laboratorio de 2 y 5 L (Braun Biostat E, Melsungen, FRG) a 8°C utilizando una cepa de producción de levadura lager (*Saccharomyces cerevisiae*). Para asegurar condiciones anaeróbicas combinadas con un metabolismo activo de la levadura, se añade el trans-2-nonenal 24 horas después de la infusión del mosto. Las muestras de fermentación se separan inmediatamente por centrifugación (1700 X g durante 3.5 min) y se preparan para el análisis por CG (Drost et al., 1990).

Con respecto a los efectos del pH se elaboran micro cervezas en una cervecería de laboratorio de 5 L de acuerdo con protocolos de producción estándar. Antes de macerar, el agua se lleva al valor de pH deseado con HCl. Se toman muestras para lipoxigenasa después de 10 min; el potencial nonenal se determina en el mosto final (Drost et al., 1990).

Para la preparación de precursores se produce ácido 9-hidroperoxi-trans-10, cis-12-octadecadienoico (9-LOOH) a partir de ácido linoleico usando lipoxigenasa de patata. El ácido 9 hidroxí-10-ceto-12-octadecenoico (9,10-cetol) se produce a partir de ácido linoleico utilizando lipoxigenasa de cebada e hidroperóxido isomerasa. El ácido 9,10-dihidroxí-12-octadecenoico (9,10-diol) se prepara mediante reducción con borohidruro de sodio de 9,10 cetol purificado. Los tres compuestos se purifican usando cromatografía en capa fina preparativa (TLC) y HPLC. Se añaden aproximadamente 50 jarras de cada componente a un tubo cerrado con 10 ml de cerveza, se calienta durante 24 horas a 40°C y se analiza para trans-2-nonenal y otros aldehídos (Drost et al., 1990).

2.1.5 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS):

Los experimentos típicos de LC/MS incluyen algunas fases analíticas, comenzando con el pretratamiento de la muestra que habitualmente incluye procedimientos de extracción de muestras. La muestra se puede introducir después en la columna LC donde las moléculas se dividen en función de su tamaño (cromatografía de exclusión de tamaño), afinidad a la fase

estacionaria (cromatografía de afinidad), polaridad (cromatografía de intercambio iónico) o hidrofobia (cromatografía de fase inversa). En la etapa de retención se mide el tiempo entre la inyección de la muestra y la aparición del pico máximo compuesto después de la separación cromatográfica (Katajamaa & Orešič, 2005). En los análisis de mezclas complejas, es posible que varios analitos eluyan al mismo tiempo o en un momento similar, y los picos de los compuestos individuales no se pueden resolver solo por LC. La espectrometría de masas (MS) se puede utilizar para separar los coelutantes de acuerdo con la relación masa-carga (m/z). Los coelutantes ingresan en la interfaz LC-MS donde se ionizan y se introducen en el espectrómetro de masas donde se mide m/z . Un tipo de aplicación de LC/MS cada vez más usado es el perfil diferencial, donde la extracción, los procedimientos de LC y la configuración del instrumento de MS permanecen configurados para proporcionar una amplia cobertura de compuestos, con el objetivo primordial de permitir comparaciones cuantitativas relativas para compuestos individuales en múltiples muestras (Katajamaa & Orešič, 2005).

La formación de aductos entre trans-2-nonenal y bisulfito de sodio han sido investigados. Tres diferentes aductos químicos se sintetizan y caracterizan por espectroscopia ^1H NMR y LC-MS. Formación de aductos en buffer acuoso al pH de la cerveza se confirman indirectamente por espectroscopía ^1H NMR y directamente por LC-MS (Nyborg et al., 1999).

Entre los reactivos se encuentran: el trans-2-Nonenal se adquiere de Aldrich (Steinheim, Alemania); metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) de calidad alimentaria de Hoechst (Frankfurt am Mein, Alemania); y 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). D_2O , 99,9%, se adquiere de Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, Reino Unido) y argón de AGA A / S (Copenhague, Dinamarca). Todos los disolventes orgánicos son de calidad HPLC de Labscan (Dublín, Irlanda) (Nyborg et al., 1999).

Todos los experimentos de LC-MS se realizan en un instrumento Hewlett-Packard LC MSD 1100, que consta de una HPLC de la serie HP 1100 conectada a un analizador de masas de un solo cuadrupolo con una fuente de iones de electropulverización (ES). Los espectros de la espectroscopia de RMN ^1H se registran en un instrumento Varian INOVA 500. Se utilizan tubos (5 mm) a 500,1 MHz y 300 K. Se utiliza D_2O como disolvente; los desplazamientos químicos se dan en relación con la acetona (2,225 ppm) (Nyborg et al., 1999).

En cuanto a los parámetros de cromatografía y detección, los aductos se analizan por LC-MS se separan en una columna LC de Hypersil octadecylsilan (ODS) (100 por 2.1 mm, 5 μm) usando gradientes de metanol en acetato de amonio 0.01 M, pH 5.5, como sigue: 10% de metanol isocrático durante 1 min, gradiente de metanol al 10-100% durante 6 o 10 min. (6 min para analizar aductos I, II y III; 10 min para analizar aductos en solución acuosa) y metanol isocrático al 100% durante 5 min. El caudal es de 0.4 ml/min, la temperatura de la columna es de 20°C y el volumen de inyección es de 2.5 μl . El instrumento MS se ejecuta en modo ES negativo, barrido completo

m/z 50–400. El gas de secado es nitrógeno, el flujo de gas es de 8,0 l/min, la temperatura del gas es de 300°C, la presión del nebulizador corresponde a 40 psig y el fragmentador es de 50 (Nyborg et al., 1999).

Para la determinación del umbral de sabor de trans-2-Nonenal en cerveza, el umbral de sabor de trans-2-nonenal se evalúa por un panel capacitado mediante el “método ascendente de la prueba de límites”. La cerveza como una lager pálida que contiene 0.025 µg/L de trans-2-nonenal libre, determinado por GC-MS (no publicado), y un contenido intrínseco de SO₂ de 3 mg / L, se determina por GC de espacio de cabeza. La cerveza se enfría a 2°C y se añade una cantidad pesada de trans-2-nonenal como solución etanólica. Se añade una cantidad correspondiente de etanol a la cerveza de referencia. Las muestras se equilibran a 15°C durante 18-24 horas antes de probarlas (Nyborg et al., 1999).

En un experimento posterior, también se añade 1,0 ml de bisulfito de sodio en agua desgasificada, correspondiente a 7 mg/L de SO₂. No se toman precauciones especiales contra la absorción de oxígeno. La cerveza se almacena a 2°C durante 14 días antes del equilibrio y la degustación (Nyborg et al., 1999).

En lo que respecta a los métodos de síntesis para el aducto I se purgan isooctano (50 ml) y agua (30 ml) con argón durante 1 hora en un agitador magnético a temperatura ambiente. Se añade bisulfito de sodio (20 g) y se continúa la purga con argón durante 15 min más. Se añade trans-2-nonenal (6.1 mmol) a la fase de isooctano. Eventualmente se forman cristales blancos en la capa límite superior. Después de cuatro días, se aísla el precipitado, se lava con hexano y éter y se seca al aire. Para el aducto II, se sigue esencialmente el mismo procedimiento que para el aducto I, pero la mezcla de reacción se deja durante una semana antes de aislar el precipitado. Para el aducto III, al etanol (100 ml) se le añaden 7.1 mmoles de trans-2-nonenal y 2.0 ml de bisulfito de sodio acuoso al 40%. La precipitación comienza inmediatamente, pero se desarrolla más durante las siguientes 4 horas, cuando el precipitado se aísla, se enjuaga y se seca (Nyborg et al., 1999).

Para la reacción con 2,4-DNPH se añaden aductos cristalinos o trans-2-Nonenal a una solución al 0,2% de 2,4-DNPH en HCl 2M. Además, para los aductos de trans-2-nonenal-sulfito en solución acuosa, se preparan soluciones acuosas de trans-2-nonenal y sulfito en tampón acetato de sodio, pH 4.5, metanol al 10%. Se utiliza D₂O (99,9%) en lugar de agua para los estudios de ¹H NMR. La concentración de trans-2-nonenal, 170 µg/ml, está cerca del límite de solubilidad en estas condiciones. Se añade bisulfito de sodio en un exceso molar de 10X (770 µg/ml de SO₂) (Nyborg et al., 1999).

2.1.6 Método colorimétrico:

Este método tiene la característica de que el sulfuro de hidrógeno se absorbe de una corriente de gas en una suspensión formada al adicionar hidróxido de sodio a una solución de acetato de zinc.

El gas desprendido se dosifica y la suspensión que contiene el sulfuro absorbido como sulfuro de zinc se trata con una solución ácida de p-aminodimetilanilina, seguido de la adición de una pequeña cantidad de solución de cloruro férrico. Después de que se haya transcurrido el tiempo para la formación del azul de metileno, la solución se diluye en un matraz volumétrico y se transfiere una alícuota al espectrofotómetro para su medición. La cantidad correspondiente de sulfuro se determina a partir de una curva de calibración preparada previamente, trazada a partir de mediciones similares en soluciones de azul de metileno preparadas en el mismo método con cantidades conocidas de sulfuro de sodio o sulfuro de hidrógeno (Fogo & Popowsky, 1949).

Se estudia la reducción de la producción de sulfuro de hidrógeno en la levadura de cerveza mediante la expresión constitutiva del gen MET25, se analiza el H₂S en el mosto en fermentación que se determina mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector fotométrico de llama y un sistema de muestreo de gas en el espacio superior. La cantidad de H₂S desprendida del fermentador se determina mediante un procedimiento colorimétrico, donde se mide la conversión de p-aminodimetilanilina en azul de metileno por reacción con H₂S y cloruro férrico (Omura et al., 1995).

Para los medios y cultivo de las bacterias se utilizan placas de agar levadura-peptona-dextrosa (YPD) para el mantenimiento del cultivo. El medio mínimo de dextrosa sintética (SD), suplementado con o sin metionina 5 mM, se utiliza para examinar la dependencia de metionina de la expresión de MET25. Se añade un análogo de neomicina, G418 (300 jar/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a las placas YPD para la selección de transformantes que albergan el gen de resistencia a G418 (G418r). Los transformantes que albergan el gen CUP1 se seleccionan en placas SD suplementadas con CuSO₄ 150 nM. En los experimentos de fermentación, se utiliza mosto de lúpulo (11°P, 9 mg/L de O₂ disuelto). Se añade G418 (10 Mg/ml) al mosto para la fermentación con la cepa 38-2 (Omura et al., 1995).

En cuanto a las cepas de levadura, la cepa X2180-1A (un SUC2 mal mel gal2 CUP1) se adquiere en Yeast Genetic Stock Center (Universidad de California, Berkeley) y se usa para la preparación de ADN cromosómico. BH-84, una de las cepas de fermentación inferior de levaduras de cerveza de esta colección de cultivos, se utiliza como cepa huésped para la transformación con genes MET25 modificados (Omura et al., 1995).

Para el aislamiento y modificación del gen MET25, el gen MET25 de *Saccharomyces cerevisiae* se amplifica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de ADN cromosómico de la ADN polimerasa *Thermus aquaticus* (Replitherm, Epicenter Technologies, Madison, WI) como plantilla y estos oligonucleótidos como cebadores, basados en la secuencia MET25 publicada por Kerjan et al (Kerjan et al., 1986).

Los cebadores 25HR y 25H contienen un sitio HindIII en sus secuencias correspondiente al sitio HindIII intrínseco dentro del marco de lectura abierto (ORF) del gen MET25. Los cebadores 25B (ATG) y 25BR corresponden a la secuencia de ADN de -14 nucleótidos (nt) aguas arriba y 370 nt aguas abajo del ORF, respectivamente, y ambos cebadores se marcaron con una secuencia de sitio BamHI en su extremo 5' (Omura et al., 1995).

La PCR se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor, y dos fragmentos resultantes (1,2-kb BamHI-hindIII y de 580 pb HindIII-BamHI) se ligan junto con el vector plásmido pUC119 digerido con BamHI (Takara Shuzo Co., Ltd., Japón) para construir pUCMET25. La integridad de la secuencia de ADN en MET25 ORF se determina mediante el método de terminación de la cadena de dideoxi nucleótidos (Omura et al., 1995).

El plásmido pYE22mG es un vector plásmido multicopia basado en un origen de 2 μ m. Este plásmido contiene el gen TRP1 y el gen de resistencia a ampicilina (Apr) como marcadores selectivos, y el promotor del gen GAP (PGAP) que permite la expresión constitutiva de genes insertados. La unidad transcripcional del gen G418r en este plásmido proviene de pIGZ2 (Nakazawa et al., 1992). Se prepara un fragmento BamHI de 1,8 kb que codifica MET25 a partir de pUCMET25 y se inserta en el sitio BamHI de pYE22mG para construir pEG25. Para obtener un vector que promueva la integración múltiple de genes diana en el ADN cromosómico de levadura, se elige la secuencia (Valenzuela et al., 1977) de ADN ribosómico 18S (rDNA) para el sitio de integración. El ADN genómico de la cepa X2180-1A de *S. cerevisiae* se digiere completamente con EcoRI y se fracciona mediante electroforesis en gel de agarosa. Se insertan fragmentos de ADN de ~ 2 kb en el sitio EcoRI del vector pUC19 para obtener una biblioteca genómica. Un clon de plásmido (pUCrDNA) que contiene un fragmento EcoRI de 1,9 kb derivado de 18S rDNA, se selecciona mediante la técnica de hibridación de colonias. El fragmento EcoRI-SacI de 1,6 kb y el fragmento NcoI-EcoRI de 1,2 kb de pUCrDNA se insertan en tándem en los sitios HindIII y EcoRI del vector pUCBM21 (Boehringer Mannheim, Alemania) después de recortar los extremos del fragmento con ADN polimerasa de T₄. El gen de resistencia al cobre CU PI se selecciona de una biblioteca genómica basada en el vector plásmido pBR322 mediante el método de hibridación de colonias. El plásmido pCUPII es uno de los clones positivos. El gen CU PI se prepara como un fragmento XhoI - KpnI de 700 pb de pCUP11 y se inserta en los sitios SmaI y KpnI de la construcción de ADN antes mencionada. A partir de este plásmido, se corta una unidad integradora (18S rDN A + CUP1 + 18S rDN A) como un fragmento SacII de 2,7 kb y luego se subclona en el plásmido pUC19 en los sitios EcoRI y HindIII que se habían cambiado al sitio SacII con un enlazador ADN. El vector plasmídico resultante se denomina prrC2. La unidad transcripcional MET25 (fragmento HindIIISaI de 2,9 kb) se prepara mediante digestión parcial de pEG25 con HindIII y Sail, y se inserta en los sitios HindIII y Sail de prrC2 para construir prrCM25.2 (Omura et al., 1995).

Para la transformación de levadura se realiza con acetato de litio. Se seleccionan clones transformantes con plásmido de copias múltiples, pEG25, en placas YPD que contienen G418. La cepa 38-2 es uno de esos clones transformantes. El plásmido prrCM25.2 se digiere completamente con endonucleasa de restricción SacII antes de la transformación. Los transformantes (es decir, integrantes) con el fragmento SacII derivado de prrCM25.2 se seleccionan sobre la base de su resistencia a CuSO_4 . La cepa 2520 es uno de esos clones integrantes (Omura et al., 1995).

Las muestras de ARN total se preparan a partir de células de levadura cultivadas en el laboratorio o extraídas de fermentadores en una cervecería piloto. La electroforesis en gel de agarosa se realiza con 40 jarras de ARN por carril, y el análisis Northern posterior se realiza con el fragmento del gen MET25 marcado con ^{32}P como sonda, de acuerdo con un procedimiento general (Sambrook et al., 1989). La cuantificación del ARNm de MET25, en relación con la cantidad de ARNm de MET25 de BH-84, se mide mediante la señal radiactiva correspondiente en el filtro usando una placa de formación de imágenes (Fujix BAS 2000, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japón) (Omura et al., 1995).

Para el ensayo de H_2S y otros análisis, el H_2S en el mosto en fermentación se determina mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector fotométrico de llama y un sistema de muestreo de gas en el espacio de cabeza. Al mismo tiempo, se determina el número de células de levadura en suspensión mediante un método microscópico. La cantidad de H_2S desprendida del fermentador se determina mediante un procedimiento colorimétrico, en el que se mide la conversión de p-aminodimetilanilina en azul de metileno por reacción con H_2S y cloruro férrico (Omura et al., 1995).

2.1.7 Método colorimétrico por la Sociedad Estadounidense de Químicos Cerveceros:

Se utiliza el método estándar de para-rosanilina (Dióxido de azufre total, método p-rosanilina – cerveza) de la Sociedad Estadounidense de Químicos Cerveceros, el dióxido de azufre reacciona con para-rosanilina y formaldehído para formar una sustancia colorante, que se puede medir por espectrofotometría. Es preciso realizar las calibraciones necesarias. Este método tiene un rango de medición de 0.0 - 16.0 mg/ ISO_2 . Asimismo, se deben preparar las siguientes soluciones: Reactivo de color, solución de formaldehído, solución estabilizadora, solución de almidón al 1%, solución madre de dióxido de azufre 500 mg/ ISO_2 , solución estándar de dióxido de azufre 20 mg/ ISO_2 . Para garantizar una solución estándar precisa, el ensayo del disulfito de sodio debe determinarse de antemano mediante valoración con solución de tiosulfato de sodio. Preparación: Muestra fría antes de usar, no desgasificar la cerveza, también es necesario medir un blanco de reactivo (Prove, 2019). Después de esto se preparan soluciones estándar como indica la tabla 2:

Tabla 2: preparación de solución estándar

| Solución estándar | | | | | | | | |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | E0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | [0.0mg/l SO ₂] | [2.0mg/l SO ₂] | [4. 0mg/l SO ₂] | [6. 0mg/l SO ₂] | [8. 0mg/l SO ₂] | [10. 0mg/l SO ₂] | [12. 0mg/l SO ₂] | [16. 0mg/l SO ₂] |
| 1-hexanol | <ul style="list-style-type: none"> Se debe añadir 1 gota de 1-hexanol en una probeta graduada de 10 ml. | | | | | | | |
| Cerveza fría sin gas | <ul style="list-style-type: none"> Medir 10 ml de cerveza fría sin gasificar en el cilindro medidor | | | | | | | |
| | <ul style="list-style-type: none"> Transferir el contenido de cada probeta a 8 matraces aforados de 100 ml separados | | | | | | | |
| Solución estándar de dióxido de azufre 20 mg/l SO ₂ | 0.0 ml | 1.0 ml | 2.0 ml | 3.0 ml | 4.0 ml | 5.0 ml | 6.0 ml | 8.0 ml |
| | <ul style="list-style-type: none"> Pipetear en cada matraz, completar hasta 100 ml con H₂O y mezclar | | | | | | | |

(Prove, 2019)

Se preparan soluciones de calibración como se indica en la tabla 3:

Tabla 3: preparación de la solución de calibración

| Solución de calibración | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | E0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | [0.0 mg/l SO ₂] | [2. 0mg/l SO ₂] | [4.0mg/l SO ₂] | [6. 0mg/l SO ₂] | [8. 0mg/l SO ₂] | [10. 0mg/l SO ₂] | [12. 0mg/l SO ₂] | [16. 0mg/l SO ₂] |
| Cada solución estándar (E0-7) | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml |
| | <ul style="list-style-type: none"> Pipetear en matraces aforados de 50 ml separados | | | | | | | |
| Reactivo de color | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| | <ul style="list-style-type: none"> Agregar y girar | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|--------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|
| Solución de formaldehído | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Agregar y girar | | | | | | | |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Llenar hasta 50 ml con H₂O y mezclar • Colocar el matraz al baño maría a 25 °C y dejar reposar durante 30 min. | | | | | | | |

(Prove, 2019)

Reactivo en blanco:

- Se coloca 1 gota de 1-hexanol en un cilindro graduado de 10 ml.
- Se mide exactamente 10 ml de cerveza fría sin desgasificar en el cilindro de medición
- Se transfiere la cerveza del cilindro graduado de medición por completo lo más posible a un matraz volumétrico de 100 ml y se agita
- Se agrega 0.5 ml de solución de almidón al 1%
- Se agrega gota a gota la solución de yodo 0.025 mol / l (solución de yodo 0.05 mol / l diluida 1 + 1 con H₂O) hasta que la solución sea de color azul permanente.
- Se agrega una gota más de solución de yodo 0.025 mol / l, se completa hasta 100 ml con H₂O y se mezcla
- Cuando el color azul se haya desvanecido, se pipetea 25 ml de la solución en un matraz aforado de 50 ml.
- Se agrega 5 ml de reactivo de color y agite
- Se agrega 5 ml de solución de formaldehído y se agita
- Se prepara hasta 50 ml con H₂O y se mezcla
- Se coloca el matraz en un baño de agua a 25°C y se deja reposar durante 30 minutos.

Muestra de medición:

- Se coloca 1 gota de 1-hexanol en un cilindro graduado de 10 ml.
- Se mide exactamente 10 ml de cerveza fría sin desgasificar en el cilindro de medición
- Se pipetea 2 ml de solución estabilizadora y 5 ml de ácido sulfúrico 0.05 mol/l en un matraz aforado de 100 ml.
- Se transfiere la cerveza del cilindro graduado de medición por completo lo más posible a un matraz volumétrico de 100 ml y se agita
- Se pipetea 15 ml de solución de hidróxido de sodio 0.1 mol/l en el matraz y se agita
- Se espera 15 s.
- Se pipetea 10 ml de ácido sulfúrico 0.05 mol/l en el matraz, complete hasta 100 ml con H₂O y se mezcla
- Se pipetea 25 ml de la solución en un matraz volumétrico de 50 ml.

- Se agrega 5 ml de reactivo de color y se agita
- Se agrega 5 ml de solución de formaldehído y se agita
- Se prepara hasta 50 ml con H₂O y se mezcla
- Se coloca el matraz en un baño de agua a 25°C y se deja reposar durante 30 minutos (Prove, 2019).

Para la determinación de cantidades ultramicro de sulfato como azul de metileno y obtener resultados precisos, es esencial que toda la cristalería que se use para el desarrollo del color se mantenga libre de trazas de metales pesados. La cristalería se lava con ácido clorhídrico (1 + 1), luego con agua, y finalmente se enjuaga con agua destilada y desionizada. La absorción de la luz se determina con un espectrofotómetro y se utiliza agua destilada como solución de referencia. Para la solución de acetato de zinc (0.25M ZnAc₂, 0.1M NaAc) se debe eliminar los restos de metales pesados precipitándolos como sulfuros, con sulfuro de zinc como vehículo de la siguiente manera: se agrega gota a gota, con agitación profunda, 2 ml de sulfuro de sodio 0.05 M recién preparado a 1 litro de la solución de acetato de zinc. Se deja pasar la noche, se agita el precipitado y se filtra a través de un papel de textura fina. Se puede observar el desarrollo de turbidez. En el caso del reactivo amino se disuelve 0.93 g de la preparación Eastman No. 1333 en 75 ml de agua desionizada, se agrega 3.50 moles de H₂SO₄, se enfría y se diluye a 1 litro con agua desionizada. El reactivo se mantiene al menos 6 meses. Para la solución que contiene hierro, se debe colocar 0.25MNH₄ Fe(SO₄)₂ , 0.5M H₂SO₄ y se usa el agua desionizada (Gustafsson, 1960).

Para la preparación estándar de sulfito se sabe que las soluciones de sulfuro se oxidan fácilmente y, en consecuencia, deben prepararse y estandarizarse inmediatamente antes de su uso. Se preparan soluciones estándar, 0.03-0.05Mn de sulfuro, a partir de cristales grandes de Na₂S 9H₂O. Se usa agua desionizada hervida al vacío para preparar las soluciones. La estandarización final se realiza de la siguiente manera, dependiendo de la concentración, se pipetea 20-50 ml de la solución de sulfuro en un vaso de precipitados de 250 ml seguido de 5 ml de NaOH 1M y 5 ml de H₂O₂ al 30%. Se cubre el vaso de precipitados y se calienta en una placa hasta que cesa la evolución de oxígeno, y la solución se evapora a aproximadamente la mitad del volumen original. Después de enfriar, la solución se pasa a través de un intercambiador de cationes (Dowex 50, forma H) y se hierve para expulsar dióxido de carbono. El ácido sulfúrico formado se titula con NaOH 0.1M (Gustafsson, 1960).

El procedimiento estándar para el desarrollo del color se realiza de la siguiente manera: se supone que el sulfuro de hidrógeno que se determinará en los análisis se ha absorbido en una solución de acetato de zinc. Se debe pipetear 10 ml de solución de acetato de zinc en un matraz volumétrico con tapón de vidrio de 10 ml y se agrega agua desionizada para obtener 80 ml, después de la adición de la solución de sulfuro a continuación se mezcla y se agrega la solución de sulfuro de una pipeta, sumergiendo su punta. Se mezcla girando suavemente y se coloca el

matraz, junto con las botellas que contienen el reactivo amino y la solución férrica, en un termostato a 20 grados durante al menos 10 minutos. Se usan pipetas de funcionamiento rápido para las siguientes dos adiciones. Se agrega 10 ml de reactivo amino para que la solución fluya por la pared del matraz y se forme una capa en el fondo. Se mezcla girando e inmediatamente se agrega 2 ml de solución férrica. Se tapa el matraz y se agita vigorosamente durante aproximadamente medio minuto. Se diluye hasta la marca, se mezcla y se coloca el matraz en luz tenue. Se mide la extinción a 20 grados y 667 μm el mismo día, después de 15 minutos o más se realiza un espacio en blanco y se aplica la corrección (Gustafsson, 1960).

2.1.8 Micro extracción de fase sólida (SPME):

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) promete un método simple y sensible para el análisis de compuestos volátiles. Los usos principales incluyen la cuantificación de compuestos presentes en matrices simples o complejas. Aunque están disponibles diferentes tipos de fibras con diferentes afinidades, en general son particularmente sensibles a los compuestos no polares (D. D. Roberts et al., 2000). SPME requiere una preparación mínima de la muestra, mientras sigue obteniendo límites de detección en el rango de nanogramos por litro para compuestos seleccionados (Evans et al., 1997; Uinard & Beler, 2004). Muchas técnicas presentan ciertos inconvenientes, como el uso de grandes volúmenes de solvente, el tiempo requerido y el uso de dispositivos costosos con una vida útil limitada que puede conllevar problemas de contaminación cruzada o de arrastre. En consecuencia, para superar estos inconvenientes, la microextracción en fase sólida (SPME) se ha convertido en un método eficiente de preconcentración de extracción y una alternativa confiable a las técnicas tradicionales de preparación de muestras, debido a características importantes como simplicidad, bajo costo, selectividad y sensibilidad cuando se combina con modos de detección apropiados (Caldeira et al., 2007).

2.1.9 Detección por quimioluminiscencia:

La quimioluminiscencia se produce cuando una reacción química genera una especie electrónicamente excitada que emite luz cuando vuelve al estado fundamental. Las reacciones quimioluminiscentes se producen en varios sistemas biológicos, en los que el proceso se suele denominar *bioluminiscencia*. Entre los ejemplos de especies que muestran bioluminiscencia están las luciernagas, un coral suave del género *Renilla* y ciertas medusas, bacterias, protozoos y crustáceos. El equipo para medir la quimioluminiscencia es bastante sencillo, y puede consistir tan solo de un recipiente de reacción y un tubo fotomultiplicador. Generalmente, no necesita ningún dispositivo para elegir la longitud de onda porque la única fuente de radiación es la reacción química entre el analito y el reactivo. La señal característica de un experimento quimioluminiscente depende del tiempo y surge con rapidez hasta un máximo cuando la mezcla del reactivo y el analito se completa. Después sigue una disminución de la señal mas o menos exponencial. Por lo regular, en lo que se refiere al análisis cuantitativo, la señal se integra para un tiempo fijo y se compara con patrones tratados de forma idéntica. Otra opción es usar las

alturas de los picos para efectuar los cálculos. A menudo se observa una relación lineal entre la señal y la concentración, para un intervalo de concentración de varios ordenes de magnitud (Skoog et al., 2007). La detección de quimioluminiscencia de azufre (SCD), permite la detección selectiva de bajo nivel al "filtrar" los otros compuestos volátiles como el alcohol y los ésteres que están presentes en la cerveza o el mosto (Burmeister et al., 1992; Firor & Quimby, 2001; Mestres et al., 2000).

Hay casos en los que se han empleado microextracción de fase sólida combinado con GC y detección de quimioluminiscencia de azufre para realizar mediciones de sustancias volátiles con sulfuro en una gama de cervezas. Para la cromatografía de gases se lleva a cabo usando una HP 5890 II GC equipada con un detector quimioluminiscente de azufre Sievers 355. La columna que se utiliza es un GS GasPro (60 m x 0.32 mm). El GC se ajusta para inyección sin división a 250°C con un revestimiento de inyección SPME de vidrio y septos HP de 3/8 pulg. La válvula de purga se abre a los 3 minutos y se cierra a los 13 minutos después de la inyección. Se usa un caudal volumétrico de 3 ml/min usando helio como gas portador con una presión constante de la cabeza de la columna de 150 kPa. El programa de temperatura del horno comienza con un ajuste inicial de 40°C seguido de una rampa inmediata de 10°C/min a 260°C seguido de una retención de 3 min. La temperatura del quemador SCD es de 800°C con un caudal de hidrógeno de 100 ml/min y un caudal de aire de 40 ml/min. La presión del SCD es de 6–10 torr con el controlador a 200–275 torr. En lo que corresponde a las fibras SPME se utiliza el carboxeno/polidimetilsiloxano de 85 µm (Supelco, Inc. Bellefonte, PA). Las fibras se exponen al espacio superior sobre la muestra con la punta de la fibra recubierta ubicada justo por encima del nivel de líquido de 5 ml en el vial de 10 ml. Se permite que todos los viales alcancen el equilibrio a 30°C en un baño de agua con agitación antes del muestreo. Las fibras SPME se exponen durante 15 minutos en el espacio de cabeza de los viales a 30°C. Después del muestreo, la jeringa SPME se inyecta manualmente en el inyector GC a una profundidad de 33 mm. Luego, la fibra se expone por completo en el inyector para que ocurra la desorción, y la fibra permanece en el inyector durante todos menos los últimos 7 minutos de la ejecución del GC, cuando se retira y se coloca en el espacio superior de la siguiente muestra (Miracle et al., 2005).

Con respecto a los estándares internos y curvas estándar se realizan en una campana extractora equipada con un medidor de temperatura. Se construyen curvas estándar para los compuestos que contienen azufre como: S-metil tioacetato (MeSAC; 98 +%), etanotiol (EtSH; 97%), etil metil sulfuro (EMS; 98%), dietil sulfuro (DES; 98%), dimetil disulfuro (DMDS; 99%), sulfuro de dimetilo (DMS; 99 +%), 1-propanotiol (1-PrSH; 99%), dióxido de azufre (SO₂; 99.9 +%), sulfuro de hidrógeno (H₂S; 99.5 +%), metanotiol (MeSH; 99.5 +%) en etanol al 4%. El estándar interno que se utiliza es 1-PrSH. Para cada punto de concentración en la curva estándar, el área del pico para cada compuesto se divide por el área del pico para el estándar interno. Estos valores de IPAR (relaciones de área pico integradas) se usan para todas las curvas y mediciones estándar para

corregir la variabilidad en el sistema. Las soluciones estándar se preparan cada día durante la calibración y periódicamente después para verificar la respuesta de la columna y el tiempo de retención. El estándar interno (1.0 mg/L) se prepara diariamente antes de cada corrida de muestreo para agregarlo a todas las muestras a una concentración final de 10 µg/L. El límite de detección para cada analito se determina visualmente comparando las alturas máximas para el nivel de concentración más bajo con las ejecuciones en blanco para el fondo y una relación de señal a ruido estimada de al menos ocho. Todas las diluciones se realizan con jeringas herméticas a los gases inyectadas debajo de la superficie del líquido. Las jeringas se enjuagan tres veces con acetona entre inyecciones. Las jeringas se mantienen específicas y separadas para compuestos estándar e internos (Miracle et al., 2005).

Las mezclas estándar líquidas para cada compuesto se preparan en viales de espacio de cabeza superior prensado de 10 ml con tapas de tabique de teflón/silicona de aluminio de la siguiente manera: se añaden 10 ml de etanol al 95% al primer vial en el que los compuestos estándar se inyectan luego con jeringas herméticas de microlitros a una concentración final de 0.5 g/L. Luego se inyecta una alícuota de esta solución en un segundo vial de 10 ml de etanol al 4% para producir una solución de 1.0 mg/L. Esta solución se utiliza luego como base para diluciones adicionales en viales sellados que contienen 5 ml de etanol al 4% para producir las concentraciones deseadas para las curvas de calibración (Miracle et al., 2005).

Las soluciones estándar de gas y las soluciones de identificación se preparan de la siguiente manera: se obtienen cilindros de metil mercaptano, sulfuro de hidrógeno y dióxido de azufre de Sigma. Estos cilindros son equipados con un regulador de acero de rango de baja presión (0-5 psi). La tubería Tygon (1/4 pulg. I.d.) se ejecuta desde el regulador a un adaptador de púa de manguera que convierte la conexión a 1/8 pulg. I.d. Tygon. Un adaptador adicional aguas abajo de esta longitud de tubería restringe el flujo a 1/16 pulg. I.d. Tygon. Esta última duración del tubo se introduce en un vial de NaOH 1M como agente de lavado. Para completar los estándares, la presión se establece en el regulador a 1 psi. El sistema se purga durante dos minutos para garantizar que solo el gas de interés estuviera presente en la tubería. El tubo de 1/8 pulg. se corta con tres clips de resorte. Se usa una jeringa hermética del volumen deseado para perforar el tubo por encima del punto de cierre. La jeringa se lava dos veces y se retira el volumen deseado. Este volumen se inyecta en un vial sellado de espacio de cabeza de 10 ml. Este vial se usa para hacer diluciones posteriores en viales de 10 ml que contengan 10 ml de EtOH al 10% y luego en un vial final de 5 ml de EtOH al 4% como se hizo para los estándares líquidos anteriores. Los tres gases se inyectan muy por debajo de la solubilidad establecida de cada uno en agua. Las concentraciones iniciales se calculan suponiendo que los gases se comportan idealmente a temperatura y presión ambiente (Miracle et al., 2005).

2.1.10 Cromatografía de gases con detección de ionización de llama (FID):

El detector de ionización por llama (FID, por sus siglas en inglés) es el que más se utiliza y, por lo general, uno de los que más se aplican en cromatografía de gases. En un detector, el efluente de la columna se dirige a una pequeña llama de hidrógeno y aire. La mayor parte de los compuestos orgánicos generan iones y electrones cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno-aire. La detección involucra controlar la corriente producida al recolectar dichos portadores de carga. La ionización en la llama de los compuestos que contienen carbono es un proceso no muy bien conocido, aunque se observa que el número de iones que se produce es relativamente proporcional al número de átomos de carbono que se reducen en la flama. Puesto que el detector de ionización por flama responde a la cantidad de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es más un detector sensible a la masa que un dispositivo sensible a la concentración. Además, este detector tiene la ventaja de que los cambios en la tasa de flujo de la fase móvil afectan poco la respuesta del detector. Al mismo tiempo, el detector es insensible a los gases no combustibles como H₂O, CO₂, SO₂, CO, gases nobles y NO_x. Estas características hacen del detector de ionización por flama uno de los que más se utiliza para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos, sin olvidar los contaminados con agua y óxidos de nitrógeno y de azufre (Skoog et al., 2007).

2.1.11 Cromatografía de gases con espacio de cabeza (HS-GC):

HS-GC se basa en el equilibrio termodinámico entre la mezcla de volátiles en el espacio superior sobre la muestra y en la muestra en un sistema cerrado (es decir, HS-GC_{vial}). Tan pronto como se alcanza el equilibrio, generalmente en un tiempo menor a 30 min, se inyecta una alícuota del espacio de cabeza en GC, donde los volátiles se dividen y detectan. HS-GC no requiere pasos adicionales de preparación de muestras y puede automatizarse fácilmente. La adición de sal o agitación, así como el calentamiento, se aplican generalmente para cambiar el equilibrio y acelerar la saturación de la fase gaseosa. HS-GC es una extracción de equilibrio y su mayor desventaja es la sensibilidad limitada (Jorge & Trugo, 2003; Steinhaus et al., 2003).

2.1.12 Cromatografía de gases por olfatometría (GC-O):

El GC – O se utiliza para identificar cualitativamente los odorantes y establecer medidas para cuantificar su actividad de olor. En GC – O, los evaluadores humanos detectan y evalúan compuestos volátiles a medida que eluyen del GC (Eyres et al., 2007). Sin embargo, debe subrayarse aquí que GC – O, preferiblemente en combinación con GC-MS, es una técnica extremadamente poderosa de investigación (Ullrich & Grosch, 1987; Ullrich & Grosch, 1988).

Utilizando las técnicas de microextracción en fase sólida y GC por olfatometría se descubre dos compuestos que no han sido identificados previamente después de que se somete a la cerveza a un proceso de fotooxidación, los mismos generan aromas indistinguibles del 3-metil-2-butenol-1-ol. Para la preparación de las muestras se empaquetan en frascos de vidrio flint de 355 ml.

Las botellas se exponen en una caja de luz utilizando cuatro tubos fluorescentes (Deluxe Daylight, General Electric) durante 2 horas a 6.400 lx. Todas las muestras se almacenan a temperaturas refrigeradas antes y después de la exposición. Los controles son muestras no expuestas. Las cervezas de muestra son lagers estilo norteamericano amargas con ayuda de iso- α -ácidos. La cerveza envasada en latas se coloca en la oscuridad a 30°C durante 4, 8 o 12 semanas para iniciar la oxidación térmica. La cerveza de control en lata se almacena en la oscuridad a 2°C (Lusk et al., 2009).

Se prepara una solución modelo que utiliza un método similar al descrito por Irwin et al (Irwin et al., 1993). Se prepara una solución de agua carbonatada que contiene ácido cítrico 4,41 mM (CX1725-1, EMD Chemicals), fosfato dibásico de sodio 5,57 mM (S374-1, Fisher Scientific), cisteína 0,085 mM (16,814-9, Aldrich Chemical Company), 0,014 mM riboflavina (R170-6, Aldrich) y 20 mg de iso- α -ácidos por L (Watertown Hops Company). Los frascos que contienen esta solución se deben sellar (Lusk et al., 2009).

Con respecto al muestreo para GC-Olfactometría los volátiles del espacio de cabeza se capturan utilizando un método SPME. Se obtienen fibras SPME por encargo de Supelco. Cada fibra tiene 2 cm de largo, calibre 23, y están recubiertas con carboxeno / polidimetilsiloxano de 85 μ m en Stableflex. Las nuevas fibras SPME se acondicionan usando un tubo (Dynatherm modelo 10, CDS Analytical) a 260°C durante 3 horas, con un flujo de nitrógeno de 150 ml/min. Para el uso diario, las fibras reutilizadas se acondicionan de manera similar durante 20 minutos (Lusk et al., 2009).

El aparato para recoger el espacio superior consiste en una botella de 500 ml (Corning no. 1395-500 comprada a través de VWR), una tapa del sistema de manejo de fase móvil HPLC (Ultra-Ware no. 953913-0000, Kimble / Kontes), tres tuercas de descarga (F-364X, Upchurch) y septos de 5 mm (Thermo Green Septa LB-2 no. 20638, Supelco). El espacio superior de la botella se enjuaga con CO₂ y se tapa. La botella y la muestra de Corning se transfieren luego a una guantera (guantero protectora de atmósfera controlada modelo 50801-00, Labconco). La botella de Corning se abre y la atmósfera en la guantera se cambia tres veces a una atmósfera de nitrógeno mediante ciclos con vacío y gas nitrógeno. Luego se abre una muestra enfriada (2°C) de 355 ml y se vierte suavemente en la botella de Corning, que contiene una barra de agitación magnética (Lusk et al., 2009).

Se insertan tres fibras SPME a través de las tuercas y septos al ras, y la porción de fibra se expone al espacio superior. El espacio de cabeza de la cerveza se muestrea durante 48 horas con agitación suave constante. Durante el período de muestreo de 48 horas, las botellas se mantienen en la oscuridad a 24°C en una incubadora de convección mecánica (modelo de precisión 30MR, Fischer Scientific) (Lusk et al., 2009).

La olfatometría GC se realiza con un analizador de olores. Los microanalíticos se modifican ampliamente un GC Agilent 6890N y un 5973N MSD para incluir capacidades de análisis de corte y olfatometría GC. Los picos volátiles de la cerveza se identifican usando una biblioteca (ChemStation Wiley 7N.1, Agilent) (Lusk et al., 2009). Además, la tuerca del inyector original en el cromatógrafo de gases (Agilent) se reemplaza con un inyector microseal (Merlin no. 5182-3442, Agilent). Dos columnas se unen en una serie. La primera columna es una columna capilar, 15 m x 0,53 mm, con película de 1,0 μm (BP5, SGE). La segunda columna es una columna capilar, 30 m x 0,53 mm, con película de 1,0 μm (BP20, SGE). Se coloca una válvula entre las columnas. El efluente de la primera columna se desvía a un detector de ionización de llama, excepto por los cortos períodos de tiempo en que se determina que se está eluyendo un compuesto de interés. Mediante una válvula de conmutación temporizada, se permite que el compuesto de interés pase a la segunda columna para una resolución mejorada (Lusk et al., 2009).

La intensidad del aroma es evaluada por el software de olfatometría. Al tocar un descriptor de aroma particular en la primera detección de ese aroma, se inicia el equivalente de la generación de área pico en GC estándar. Luego, el analista estima un valor máximo para la intensidad del aroma. Esta estimación se basa en la experiencia previa con el compuesto. El analista toca la barra de intensidad del aroma para obtener el valor máximo justo cuando el aroma se desvanece. Tocar la barra de intensidad de aroma también señala el final del pico, que es análogo a la "parada de integración" para la detección estándar del área de pico de GC. Luego, el software genera un pico de pseudocromatograma basado en el tiempo de inicio, el tiempo de parada y la intensidad del pico. Este pico por lo general está ligeramente compensado del pico total del cromatograma de iones del espectrómetro de masas, tanto porque la longitud del recorrido hasta la nariz del analista es mayor que la longitud del recorrido hacia el espectrómetro de masas y porque el tiempo de respuesta humano es más lento que el tiempo de respuesta del instrumento. Los parámetros MSD son cuadrúpole 150°C, fuente 230°C, línea de transferencia 160°C, escaneo 35-350 m/z, y umbral 150. Se usa inyección sin división, con la temperatura del inyector mantenida a 260°C. El flujo de helio se mantiene a 10.0 psi, el flujo de purga es de 63.7 mL/min, y el tiempo de purga es de 2.0 min, con un flujo total de 100.2 mL/min. Los parámetros de GC son 40°C durante 3 min, 7 grados Celsius/min y 20 min a 220°C. Finalmente, el tiempo total de ejecución es de 48,71 min (Lusk et al., 2009).

De igual forma, se encuentra el método de extracción de sorbente de barra de agitación (SBSE), esta técnica permite detectar compuestos que están presentes en cantidades muy pequeñas. SBSE se ha aplicado al análisis de ácidos grasos (Horák et al., 2007), terpenoides (Kishimoto et al., 2006), y carbonilos (Ochiai et al., 2003) en cerveza.

Por otra parte, para el análisis de sulfitos existe la polarografía de pulsos y la cromatografía iónica. La técnica Monier-Williams, adoptada por el Institute of Brewing, implica la eliminación del SO_2

de la cerveza acidificada en una corriente de dióxido de carbono y nitrógeno a 100°C. El gas se absorbe en peróxido de hidrógeno y el ácido sulfúrico formado se valora frente a NaOH. Las modificaciones menores hechas por la FDA incluyen la reducción en la concentración del titulante por un factor de 10, el reemplazo de la trampa de pirogalol por un lavador de oxígeno tipo GLC y la eliminación del paso del condensador caliente (Fazio & Warner, 1990).

Igualmente, existen los métodos de análisis de inyección de flujo (FIA) para determinar los sulfitos en la cerveza. La mayoría de los análisis de inyección de flujo son adaptaciones de otros métodos existentes, principalmente métodos espectrofotométricos. Se conoce la aplicación de sistemas FIA tanto para el verde de malaquita (Atanassov et al., 2000) como para los métodos de p-rosanilina (Firnandes et al., 1998). La muestra se inyecta en la corriente portadora que contiene NaOH para la liberación en línea de los sulfitos unidos. Se introduce ácido sulfúrico para reducir el pH y convertir todos los productos de equilibrio existentes en la forma de dióxido de azufre que luego se difunde a través de una membrana permeable a los gases. A continuación, se hace reaccionar el dióxido de azufre con verde de malaquita o p-rosanilina para dar un producto coloreado que se mide usando un espectrofotómetro. Recientemente se han reportado varias aplicaciones de FIA para la determinación de sulfito en vino por detección espectrofotométrica (Decnop-Weever & Kraak, 1997; Gonçalves et al., 2010; Maquieira et al., 1993; Richter et al., 1993).

Se informa también de un método cronopotenciométrico para la determinación en línea del dióxido de azufre total en la cerveza (Dvořák et al., 2006). Los sulfitos libres y unidos se convierten en aniones sulfito al alcalinizar las soluciones de muestra. Al acidificar la solución, el dióxido de azufre liberado se separa en línea a través de una membrana semipermeable y se transporta mediante un electrolito a la celda de medición y se mide mediante cronopotenciometría de arrastre. Los resultados corresponden bien con los obtenidos con los métodos alternativos de EBC, con la ventaja de ser mucho más rápidos y sencillos. Actualmente, la EBC recomienda un ensayo enzimático que emplea sulfito reductasa, se basa en la oxidación del NADH por el peróxido de hidrógeno formado durante la oxidación del sulfito por la acción de la sulfito oxidasa. Los cambios en la absorbancia de NADH a 340 nm se utilizan para determinar la concentración de sulfito total (Luis F. Guido, 2016).

De igual forma, hay un método para la determinación de rutina de los residuos de dióxido de azufre total y libre en la malta y el SO₂ total en la cerveza utilizando la técnica del espacio de cabeza GC (Munar et al., 1994). Se demuestra que tanto el método colorimétrico como el del espacio de cabeza son comparables. Se informa del uso de un detector de azufre por quimioluminiscencia altamente sensible y selectivo (Burmeister et al., 1992). El detector de quimioluminiscencia de azufre se evalúa como un reemplazo del FPD ya que se encuentra que posee mejor selectividad, sensibilidad y linealidad. No es susceptible a los efectos de extinción

de hidrocarburos mostrados por el detector FPD. Estos métodos tienen la ventaja adicional sobre los métodos colorimétricos para cervezas oscuras. Se demuestra que la cromatografía de exclusión iónica con detección electroquímica es mucho más simple y rápida, los resultados se comparan más favorablemente con la técnica de Monier-Williams y se correlacionan bien con la técnica de p-rosanilina (Wygant et al., 1997). Este método muestra buena reproducibilidad a niveles cercanos a 0.5 mg/L y un tiempo de análisis de aproximadamente media hora. Wagner y McGarrity usan cromatografía de exclusión iónica con detección amperométrica pulsada para evitar la pérdida de sensibilidad del detector que ocurre con el tiempo cuando se usa amperometría directa (H. P. Wagner & McGarrity, 1991; Herbert P Wagner & McGarrity, 1992).

Para la extracción de tioles el ácido p-hidroximercuribenzoico (pHMB) se utiliza para la captura selectiva de tioles. Este compuesto de organomercurio se ha aplicado para determinar tioles polifuncionales en cerveza (Kishimoto et al., 2008; Vermeulen et al., 2006). Normalmente, la sal sódica de pHMB se usa para extraer directamente tioles de muestras acuosas. Los complejos tiol-pHMB se cargan en una columna intercambiadora de aniones fuertemente básica y los tioles volátiles se liberan por filtración de una solución monohidratada de hidrocloreto de L-cisteína. La elución de bebidas (por ejemplo, vino) a través de una columna que contiene un absorbente pHMB es un enfoque alternativo (Tominaga & Dubourdieu, 2006). Los tioles en los extractos de sabor también se pueden enriquecer en gel de agarosa injertado con acetato de p-aminofenilmercúrico y luego con una solución de ditiotreitól 10 mM (Naef et al., 2008).

2.1.13 Análisis voltamperométrico de destilados de cerveza:

Para este tipo de análisis se utiliza bisulfito de sodio (Riedel de Haen), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, como fuente de SO_2 . Se prepara y se calibra una solución madre de 1000 mg/L de SO_2 usando un exceso de solución de yodo estándar, que se titula por retroceso con una solución estándar de tiosulfato de sodio. Se utiliza una marca de cerveza lager comercial, producida a escala industrial. Se prueban un total de 37 cervezas embotelladas con un contenido total de O_2 de $<0,7$ mg/L en diferentes condiciones de almacenamiento. Las cervezas se dividen en tres pruebas: (A) 13 cervezas frescas (mantenidas a 4°C); (B) 10 cervezas envejecidas artificialmente (7 días a 37°C en la oscuridad); (C) 14 cervezas envejecidas naturalmente (6 meses a 20°C en la oscuridad). Los grupos A y C reflejan las condiciones naturales de almacenamiento, por lo que se analiza un mayor número de muestras. Una muestra de 150 ml de cerveza carbonatada se somete a destilación al vapor hasta que se recogen 100 ml de destilado para su posterior análisis. En el análisis voltamétrico, se añaden 5,00 ml de destilado de cerveza a 20,00 ml de tampón acetato 0.1 M, pH 3.8, seguido de 0.5 ml de dihidrocloruro de hidracina 1 M. El voltamograma se corre después de 5 min de reacción de derivatización. Las determinaciones voltamétricas de onda cuadrada se realizan en soluciones desoxigenadas (purgando nitrógeno durante 5 min), utilizando una frecuencia de 25 Hz; el potencial se escanea entre -0,5 y -1,3 V, con una amplitud de pulso de -25 mV y un paso de -2,5 mV. Por último, para el análisis voltamétrico de destilados de

cerveza, las cervezas almacenadas a diferentes temperaturas se someten a destilación al vapor (L. F. Guido et al., 2003).

2.1.14 Procedimiento colorimétrico para la medición de dimetil Sulfuro:

Este método se basa en la formación de un complejo entre DMS y nitroprusiato de sodio. El complejo de DMS-nitroprusiato de sodio que se forma en condiciones alcalinas se vuelve rosado cuando la solución se acidifica. El complejo rosa tiene un máximo de absorción a 520 nm. El nitroprusiato de sodio reacciona con DMS en un medio alcalino para producir un complejo que posee un color rosa después de la acidificación. El producto de reacción tiene una absorbancia máxima a 520 nm y puede usarse para medir la concentración de DMS en un sistema dado. Este complejo, sin embargo, es algo inestable y se descompone lentamente con el tiempo. Para optimizar la sensibilidad, deben usarse celdas de 5 cm y un espectrofotómetro con una lectura de 0,001 unidades de absorbancia. Además del complejo DMS rosa, el reactivo reacciona con el extracto de cerveza para producir un complejo amarillo. También se debe tener en cuenta la contribución de color de este producto interferente. Para establecer correcciones de turbidez, se toman lecturas a 700 nm. La absorbancia se lee a 460 nm como una indicación arbitraria de interferencia del complejo amarillo (Grigsby & Palamand, 1977). Se deben seguir los siguientes pasos para determinar la absorbancia del complejo DMS-nitroprusiato de sodio:

1. La solución de referencia para las determinaciones del color se prepara mezclando 1,2 ml de HCl con 22 ml del reactivo complejante. Se llenan ambas celdas de 5 cm con este blanco de reactivo y se ajusta la absorbancia de 0,000 a 700 nm. Se mide las absorbancias a 520 y 460 nm.
2. Se lee la muestra contra el blanco a 700, 520 y 460 nm. Si la absorbancia a 700 nm es superior a 0,010, la muestra debe aclararse más.
3. Se corrigen los valores de absorbancia a 520 y 460 nm obtenidos en el paso 2 restando la lectura de 700 nm de ambos y luego
4. Se restan los valores respectivos obtenidos en el paso 1. Las absorbancias corregidas de 520 y 460 nm se utilizan luego en el cálculo de la absorbancia del complejo DMS.
5. Se calcula la absorbancia del complejo DMS (XDMS) restando la contribución del complejo amarillo a 520 nm de la absorbancia medida a 520 nm. Para este paso, se determina las contribuciones relativas del complejo amarillo a 520 nm y el complejo DMS a 460 nm (Grigsby & Palamand, 1977).

$$R_1 = \frac{\text{complejo amarillo de absorbancia (520 nm)}}{\text{complejo amarillo de absorbancia (460 nm)}}$$

$$R_2 = \frac{\text{Complejo de absorbancia DMS (460 nm)}}{\text{Complejo de absorbancia DMS (520 nm)}}$$

Se determina Ri analizando la cerveza que se purga con N₂ durante cinco horas. Este procedimiento elimina el DMS, pero retiene las especies interferentes menos volátiles. Se determina Ri analizando una solución estándar de DMS. Una vez que se han establecido los valores de Ri y R2, se pueden utilizar en todos los cálculos posteriores (Grigsby & Palamand, 1977).

Para la cerveza, mosto y muestras acuosas con menos de 250 µg de DMS/l se sigue el procedimiento que se describe a continuación.

1. Preparación de la muestra:
 - a. Cerveza envasada, cerveza filtrada: No se requiere tratamiento.
 - b. Muestras de fermentación en proceso: se centrifuga hasta que la muestra esté clara (20 min a 12.000 rpm, es decir, 23.000 fuerza centrífuga relativa) (Grigsby & Palamand, 1977).
 - c. Muestras de mosto: se mezcla 350 ml de la muestra con 10 ml de solución de tanino al 4%, se centrifuga hasta que quede transparente. Para muestras de mosto con densidades específicas elevadas (17 ° a 20 ° Platón), se diluye la muestra 1:1 con agua destilada.
2. Extracción: Se agrega una muestra de 330 ml y 20 ml de CCl₄ a una botella de cerveza retornable de 12 onzas, corona y se agita durante 4 horas en un agitador alternativo (Grigsby & Palamand, 1977).
3. Recuperación de extracto: Se desecha la fase acuosa y se decanta la fase CCl₄ (junto con la muestra residual) en un embudo de decantación de 60 ml. Se lava el extracto con 10 ml de NaOH al 5% invirtiendo el embudo suavemente 15 veces. Se retira la capa acuosa por aspiración al vacío y se repite el lavado con una segunda porción de 10 ml de NaOH al 5%. (En casos raros, una emulsión puede persistir después de estos tratamientos. Cuando esto ocurre, un tercer lavado con 10 ml HCl rompe la emulsión). Se pasa la fase CCl₄ a través de un papel de filtro de separación de fases (1 PS) en un 50 Tubo de centrifuga Corex de -ml (con tapón de rosca) que contiene el reactivo complejante (Grigsby & Palamand, 1977).

Reacción: se agita el tubo tapado que contiene 20 ml de extracto de CCl₄ y 11 ml de reactivo complejante durante 30 minutos en un agitador de secado automático (Grigsby & Palamand, 1977).

Finalmente, para el desarrollo y aclaración del color se acidifica la muestra mezclando 0,6 ml de HCl 6N, luego se centrifuga hasta que la fase acuosa se aclare (20 min a 1100 de fuerza centrífuga relativa es suficiente). Para el cálculo se determina el color en el sobrenadante transparente y se calcula el DMS (Grigsby & Palamand, 1977).

2.1.15 Determinación del dióxido de azufre total en cerveza mediante espectrofotometría de inyección de flujo utilizando la técnica de difusión de gas y zonas de fusión:

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) recomienda el método colorimétrico utilizando p-rosanilina para la determinación de SO₂ en cerveza. Este método se basa en la reacción entre SO₂, p-rosanilina y formaldehído, previa hidrólisis del SO₂ unido con una solución alcalina. El proceso analítico general es lento y laborioso porque se requiere que la reacción sea completa (que implica un período de reposo de 30 minutos para permitir el desarrollo del color). Para realizar este procedimiento de forma automática, se ha descrito un sistema de análisis de inyección de flujo (FIA) basado en la misma reacción. No obstante, antes de la introducción de la muestra en el sistema de flujo, es necesaria la adición discreta de hidróxido de sodio para liberar el SO₂ ligado (Firnandes et al., 1998).

En este trabajo se describe el sistema FIA para la determinación colorimétrica del dióxido de azufre total en la cerveza. No se requiere tratamiento previo de la muestra y la determinación se basa en la formación de compuesto coloreado entre el analito, formaldehído y p-rosanilina. Las muestras se introducen directamente en el sistema y el aislamiento de SO₂ se realiza mediante membrana de difusión de gas. Con el fin de reducir el consumo de p-rosanilina, su adición se realiza mediante la técnica de las zonas de fusión. Este modo de inyección de flujo se utiliza para reducir el consumo de reactivo, ya que solo se introduce en el sistema la cantidad requerida para la reacción en lugar de su flujo continuo a través del colector (Firnandes et al., 1998).

La solución de p-rosanilina se prepara cada semana disolviendo 0.8 de acetato de p-rosanilina en un litro de 0.3 mol/litro de ácido sulfúrico. Esta solución se filtra y se almacena en una botella de vidrio marrón hermética al aire. Se prepara diariamente una solución al 0.2% (peso/volumen) de formaldehído a partir de una solución de aldehído al 37% (peso / volumen). Las soluciones de ácido sulfúrico se obtienen mediante dilución adecuada de ácido sulfúrico concentrado (d = 1,84; 97%). La solución de hidróxido de sodio 0.1 mol/litro se prepara disolviendo gránulos de hidróxido de sodio en un litro de agua. Se prepara una solución estándar madre de 1000 ppm de SO₂. Se preparan soluciones estándar de trabajo de 2,00, 5,00, 10,00, 15,00 y 20,00 ppm en SO₂ mediante dilución rigurosa de la solución madre (Firnandes et al., 1998).

En el sistema de inyección de flujo, las soluciones son impulsadas por bombas peristálticas Gilson Minipuls y tubos de propulsión Gilson de PVC. Las soluciones se inyectan en el colector con dos válvulas de inyección rotativas de seis vías Rheodyne tipo 5020 conectadas por eje metálico para que el cambio de posición de las válvulas ocurra al mismo tiempo, permitiendo así la inyección simultánea de muestras y / o patrones y la solución p-rosanilina. Se coloca una membrana de teflón. Como sistema de detección se utiliza el espectrofotómetro Unicam 8625 UV / Vis (longitud de onda ajustada a 585 nm), equipado con una celda de flujo Helma 178.713 (8 uL de volumen óptico) y se conecta al registrador gráfico Kipp Zoncn BD 111 (Firnandes et al., 1998).

La configuración del colector de análisis de inyección de baja se diseña para llevar a cabo la reacción de desarrollo de color dentro de los tubos de flujo y permite la medición del SO_2 en cerveza sin preparación previa de la muestra. Para lograr este propósito se incluye una unidad de difusión de gas para aislar el SO_2 de la matriz. Como solo las moléculas gaseosas se difunden a través de la membrana, los compuestos coloreados y otras posibles interferencias no fluyen hacia el detector. Para liberar el SO_2 ligado, el sistema incluye una unidad de prehidrólisis consistente en una cámara de mezcla con dos canales de entrada en los que la muestra se mezcla continuamente con una corriente de 0.1 mol / litro de NaOH y se llena el bucle de la válvula de inyección. Al cambiar la válvula, la muestra hidrolizada se introduce en la corriente portadora de agua, combinada con una solución de H_2SO_4 para proporcionar un medio suficientemente ácido para convertir todas las formas de SO_2 libre; a SO_2 gaseoso y fluye hacia la unidad de difusión de gas. Mientras tanto, la solución de p-rosanilina en el portador de H_2SO_4 (R3) se inyecta (V2), se fusiona con una solución de formaldehído (R4) para formar un aducto intermedio y se dirige a la unidad de difusión de gas. A medida que los tapones de muestra y reactivo fluyen a través de la unidad de difusión de gas simultáneamente, el SO_2 difundido; se mezcla con la solución de reactivo y se forma el complejo coloreado que se mide a 585 nm (Firnandes et al., 1998).

La unidad de prehidrólisis se establece para imitar la etapa de hidrólisis. De esta manera, los caudales en los canales y la longitud de LI se establecen para asegurar un tiempo de residencia de al menos 15 en LI: esto se logra estableciendo ambos caudales en 0.55 ml / min y LI en 56 cm. Además, se utiliza una solución de NaOH 0.1 mol / litro para proporcionar una concentración de hidróxido en LI cercana a la del método de referencia. La disminución del caudal se conduce a una ampliación de la señal analítica y, en consecuencia, a una disminución de la frecuencia de muestreo. Se elige 250 μl de p-rosanilina porque proporciona una buena sensibilidad, minimizando tanto el consumo de reactivos tóxicos como el ancho de pico. La frecuencia de muestreo alcanzada con este colector FIA es de aproximadamente 30 muestras por hora (Firnandes et al., 1998).

2.1.16 Determinación de sulfito en cerveza mediante cromatografía de exclusión iónica y detección amperométrica pulsada:

2.1.16.1 Cromatografía de exclusión iónica:

La cromatografía de exclusión de iones no corresponde a una forma de cromatografía iónica debido a que son especies neutras y no iones los que se separan. Se utilizan columnas de intercambio de iones para realizar las separaciones. La cromatografía de exclusión de iones tiene distintas aplicaciones en la identificación y determinación de especies ácidas en distintas muestras, como leche, café, vino y otros productos manufacturados. Las sales de los ácidos débiles también pueden ser analizadas dado que se convierten en sus ácidos correspondientes

en presencia de los iones hidrógeno del intercambiador. También se logran determinar por cromatografía de exclusión de iones las bases débiles y sus sales. En este caso, la columna que se emplea es un intercambiador aniónico en la forma hidróxido (Skoog et al., 2007).

2.1.16.2 Electroquímica: voltametría

La voltamperometría es una técnica analítica basada en la medida de la corriente que fluye a través de un electrodo sumergido en una solución que contiene compuestos electroactivos, mientras se le impone un escaneo potencial. Generalmente, dicho electrodo tiene una superficie muy pequeña para asumir de manera rápida y precisa el potencial impuesto por el circuito eléctrico. El electrodo puede ser sólido (de materiales como: oro, platino o carbono vídrio) o formado por una gota de mercurio que cuelga de la punta de un capilar. Si el electrodo está formado por una gota de mercurio que cae rítmicamente de un capilar, la técnica analítica se llama Polarografía (Protti, 2001).

Además, la voltamperometría es una técnica versátil, permite buscar en varios aspectos de las reacciones electroquímicas, a saber, aquellas reacciones en las que intervienen intercambios de electrones entre reactivos y productos. Para esas reacciones es posible investigar las leyes que rigen la dependencia de la corriente por el potencial impuesto a un electrodo sumergido en el entorno de reacción. En general, esas leyes son muy complicadas, al igual que las reacciones redox y el entorno en el que tienen lugar. Una de las aplicaciones más importantes de la voltamperometría es el análisis cuantitativo de trazas de metales (o, de esos productos químicos reducibles u oxidables) a niveles de $\mu\text{g/L}$ o menos (Protti, 2001). En este método tiene lugar un consumo mínimo de analito. También, la polarografía difiere de otros tipos de voltametría en que el electrodo de trabajo es el sin par electrodo de goteo de mercurio (DME, por sus siglas en inglés) (Skoog, Holler, & Crouch, 2007).

2.1.16.3 Voltametría diferencial de pulso, DPV

En este tipo de voltametría, si una serie de pulso de potencial constante periódico se superpone a una exploración lineal, se logra una mejora constante de la señal. Además, si se mide la diferencia entre la corriente justo antes y al final del pulso, se puede realizar una lectura menos influenciada por la corriente capacitiva. De esta manera, esta lectura diferencial de la corriente genera un voltamograma en forma de pico (Protti, 2001).

Una ventaja del voltamograma del tipo derivada es que se pueden observar los máximos de picos individuales en el caso de sustancias que tienen potenciales de semionda que difieren en tan sólo 0.04 o 0.05 V; la voltametría diferencial de pulsos aumenta la sensibilidad de la voltametría. Por lo regular, la voltametría diferencial de pulsos proporciona picos bien definidos a un nivel de concentración que es 2×10^{-3} el de la onda voltamétrica clásica (Skoog et al., 2007).

El mayor porcentaje de sensibilidad de la voltametría diferencial de pulsos se puede atribuir a dos orígenes. El primero es el aumento de la corriente faradaica y el segundo es la disminución de la corriente de carga no faradaica. En relación con la primera, hay que considerar los hechos que tienen lugar en la capa superficial que rodea a un electrodo cuando el potencial aumenta de repente a 50 mV. Si una especie reactiva está presente en esta capa, se produce un aumento de la corriente que disminuye la concentración del reactivo a la requerida por el nuevo potencial. Cuando se alcanza la concentración de equilibrio para este potencial, la corriente cae a un nivel apenas suficiente para contrarrestar la difusión; es decir, a la corriente controlada por difusión (Skoog et al., 2007).

La corriente medida contiene tanto un componente controlado por difusión como un componente que tiene que ver con la reducción de la capa superficial respecto a la concentración; la corriente total es casi siempre varias veces mayor que la corriente de difusión. Se debe tener en cuenta que en condiciones hidrodinámicas la solución se vuelve homogénea respecto al analito en el tiempo en que ocurre la siguiente secuencia de pulsos. Por consiguiente, a cualquier potencial aplicado se observa un aumento de corriente idéntico para cada pulso de potencial. Cuando el pulso de potencial se aplica primero al electrodo, también tiene lugar un aumento de la corriente no faradaica a medida que aumenta la carga. Esta corriente disminuye en forma exponencial respecto al tiempo y se aproxima a cero con éste. Por tanto, si se miden las corrientes tan sólo en este momento, la corriente residual no faradaica se reduce mucho y la relación señal-ruido es mayor. El resultado es un aumento de la sensibilidad (Skoog et al., 2007).

Se sugiere la cromatografía de exclusión iónica con detección electroquímica para el análisis de sulfito en alimentos (H. Kim & Kim, 1986; Y. Kim & Kim, 1988). Está bien documentado que la amperometría normal está sujeta a la introducción de errores asociados con la pérdida de sensibilidad del detector, que ocurre cuando el electrodo de trabajo se contamina (Herbert P Wagner & McGarrity, 1992).

Para este análisis se utiliza un cromatógrafo iónico Dionex modelo 4000i, un detector amperométrico pulsado, una celda amperométrica estándar con un electrodo de trabajo de platino versus un electrodo de referencia Ag/AgCl, un muestreador automático, una columna HPICE-AS1 y un integrador Spectra Physics 4270 para el manejo de datos. Las condiciones optimizadas de HPICE son las siguientes: El eluyente, H_2SO_4 10 μl , se prepara con agua desionizada y se filtra usando una membrana de 0,45 μm . El caudal es de 1,0 ml / min. La celda amperométrica estándar se conecta a un detector amperométrico pulsado ajustado en un rango de 300 nA a escala completa. Se aplica un potencial de medición de +0,70 V durante 240 mseg. La atenuación del integrador es de 1.024. Se debe preparar diariamente una solución estándar de SO_2 de 1.000 mg / L (Na_2SO_3 , Fisher Scientific, Toronto, Ontario) en tampón Na_2HPO_4 20 mM (BDH, Toronto) / o-manitol (BDH) 10 mM ajustado a pH 9 con 1.0 M NaOH (Herbert P Wagner & McGarrity, 1992).

Se prepara una solución estándar de calibración diaria (8,0 mg / L de SO₂) diluyendo 80 µl de la solución estándar de 1000 mg / L a 10 ml con el tampón de pH 9 anterior. Este estándar de calibración se diluye 1:20 con el tampón de pH 9 inmediatamente antes de la inyección. Todas las muestras de cerveza se desgasifican mediante filtración a través de papel Whatman No. 4 y se diluyen 1:20 con tampón de pH 9 inmediatamente antes de la inyección (Herbert P Wagner & McGarrity, 1992).

2.1.17 Cuantificación de residuos de dióxido de azufre en malta y cerveza mediante cromatografía de gases de espacio de cabeza

Para este procedimiento todos los productos químicos que se utilizan son de grado analítico; el agua se desioniza y luego se destila. Para la extracción de dióxido de azufre libre de la malta, se utiliza una solución acuosa de glicerol al 1% (v/v). Para la extracción de los residuos totales de dióxido de azufre tanto de la cerveza como de la malta, se prepara hidróxido de sodio 0.125 N en glicerol al 1%. A esto, se añade 50 ml de una solución de sulfato ferroso al 5% (se prepara disolviendo 5 g de FeSO₄ · 7H₂O en 0.01 N de H₂SO₄ para obtener 100 ml) a 950 ml de glicerol alcalino. El hierro se utiliza como antioxidante (Munar et al., 1994).

De la misma forma, se utiliza una solución de ácido fosfórico al 20% (p / p) para la acidificación y así generar dióxido de azufre gaseoso. La solución madre de dióxido de azufre se prepara disolviendo 1.97 g de sulfito de sodio y 0.125 g de ácido etilendiaminotetraacético hasta 1,000 ml en agua. Esta solución contiene aproximadamente 1,000 ppm de SO₂. Esta solución madre se debe estandarizar antes de su uso (Munar et al., 1994).

La solución de trabajo del patrón interno se prepara diluyendo 150 µl de etil metil sulfuro (10,000 mg / L) (preparado disolviendo 240 µl de etil metil sulfuro en 20 ml de etanol) en 20 ml de etanol. Las soluciones de etil metil sulfuro se preparan en viales con espacio de cabeza cerrados con precintos enroscados para minimizar las pérdidas por evaporación. Las muestras de malta que se utilizan en este estudio se obtienen de Fleischmann Kurth Malting. En la planta piloto se preparan muestras de malta que contienen altos niveles de residuos de dióxido de azufre y las muestras de cerveza utilizadas se compran en tiendas locales (Munar et al., 1994).

Para la determinación de SO₂ libre se extrae de la malta pesando 20 g de malta entera que se había limpiado a fondo para eliminar todas las raicillas en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. A esto se le añade glicerol al 1% de modo que el peso final de la muestra más la solución de extracción totalice 100 g. Los matraces se tapan y se dejan extraer por reposo durante 1 hora con turbulencia ocasional. A continuación, se filtra el contenido del matraz a través de papel de filtro Whatman n° 1 y se reciclan los primeros 10 ml de filtrado (Munar et al., 1994).

Por otro lado, el SO₂ total se extrae pesando 10 g de malta entera en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añade glicerol alcalino de modo que el peso total de la malta y la solución de extracción

ascienda a 100 g. Los matraces se tapan y se colocan en un agitador mecánico durante 1 hora con agitación suave (Munar et al., 1994). El SO₂ total se extrae de la cerveza mezclando 25 ml de cerveza con un volumen igual de solución alcalina de glicerol en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. El matraz se tapa y se coloca en un agitador mecánico durante 1 hora con agitación suave (Munar et al., 1994).

Se miden los residuos de SO₂ libre y total en la malta para cada muestra añadiendo una alícuota de 1 ml del filtrado a un vial con espacio de cabeza de 20 ml que contiene ácido fosfórico al 20%. Para el análisis de la cerveza, se añaden 5 ml de cerveza extraída a un vial con espacio de cabeza que contiene 5 ml de H₃PO₄ al 20%. Los viales se cerraron inmediatamente con un cierre hermético, se agitan vigorosamente durante 10 segundos y se colocan en un baño de agua a 60°C durante 20 minutos. Cada muestra se extrae individualmente del baño y se añade 25 µl de la solución de trabajo estándar interna a través de los septos y se agita durante 15 segundos. A continuación, se inyectan 0,5 ml del espacio de cabeza en el cromatógrafo de gases utilizando una jeringa hermética. Con muestras de malta que contienen grandes residuos de dióxido de azufre, se deben agregar 0,5 ml del filtrado a 9,5 ml de solución ácida (Munar et al., 1994).

Cuando se analizan 10 o más muestras a la vez, se añade una muestra al baño de agua cada 4 minutos durante 20 minutos. Tras la adición de la sexta muestra, la primera se retira inmediatamente, se añade el patrón interno, se agita y se inyecta una alícuota del espacio de cabeza en el cromatógrafo de gases (Munar et al., 1994).

Las condiciones de cromatografía incluyen un Chrompak 437A (Raritan, New Jersey) equipado con un detector fotométrico de llama (llama dual); temperatura del puerto de inyección, 100°C; temperatura del detector, 250°C; columna, DB-Wax (J&W Scientific) 30 m X 0,53 mm d.i., 1,0 µm de espesor de película. La aplicación utiliza helio (5 ml/min) como portador y nitrógeno (25 m/min). Los caudales de hidrógeno y aire del detector se ajustan a las especificaciones del instrumento (Munar et al., 1994).

En cuanto a la calibración, se prepara una curva de calibración para SO₂ en malta agregando 20 g de malta sin azufrar a cada uno de los cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml. Luego, cada uno de estos matraces recibe una alícuota de la solución estándar de SO₂ de 1,000 mg/L. Uno de los matraces era el blanco y no recibe patrón, mientras que a los otros se les agregan 1, 2, 3 o 4 ml. El peso de la malta y la alícuota de la solución estándar se lleva a 100 g con glicerol al 1%. A continuación, los estándares se tratan como muestras. Las concentraciones de los estándares son 0, 50, 100, 150 y 200 mg de SO₂/kg de malta, respectivamente. Los estándares para el análisis de cerveza se preparan diluyendo primero la solución madre estándar diez veces con glicerol al 1%. A continuación, se preparan soluciones de trabajo de estándares diluyendo alícuotas de 2, 5, 10 y 20 ml de la solución madre diluida hasta 100 ml en un matraz aforado usando glicerol al 1%. Luego se agregan cinco mililitros de cada solución a un vial con espacio

de cabeza que contiene 5 ml de H_3PO_4 al 20% y se tratan de manera similar a las muestras para la generación de SO_2 . Siendo las concentraciones finales de los estándares 1, 2.5, 5 y 10 mg/L (Munar et al., 1994).

Los residuos de dióxido de azufre se calculan comparando las alturas de los picos de las muestras con una curva de calibración. La altura de pico estándar interna se utiliza para controlar la consistencia del volumen del espacio de cabeza que se inyecta. La curva de calibración se realiza trazando la raíz cuadrada de la altura del pico de los estándares frente a la concentración del estándar correspondiente. Cada estándar y muestra se analiza por duplicado. Durante el transcurso del ensayo, se inyectan estándares periódicamente para controlar el rendimiento del equipo y así se evitan errores (Munar et al., 1994).

Una parte muy crítica del procedimiento es la estandarización de la solución madre. Para medir la cantidad de dióxido de azufre en la solución madre, se añaden 20 ml de yodo 0.1 JV a una alícuota de 5 ml de la solución madre. A esto, se le añaden de dos a tres gotas de almidón soluble al 1% y 3 ml de H_2SO_4 2M. La mezcla resultante se valora con 0.05 N de tiosulfato de sodio. Finalmente, utilizando el procedimiento anterior para controlar la solución stock, esta es estable hasta por dos días. Sin embargo, se recomienda volver a estandarizar la solución antes de cada uso (Munar et al., 1994).

2.1.18 Dióxido de Azufre Libre en Cerveza como la Diferencia Entre Dióxido de Azufre Total y Acetaldehído: Un Método Voltamétrico

En este trabajo se propone un método voltamperométrico para la determinación de los niveles de SO_2 total y libre en cerveza mediante el uso de un electrodo colgante de gota de mercurio. Se realiza una extracción preliminar de aldehídos y luego una extracción de SO_2 de la cerveza. En primer lugar, la muestra de cerveza se diluye y alcaliniza mediante la adición de hidróxido de sodio, lo que provoca la conversión del bisulfito en sulfito y, en consecuencia, la descomposición de los aductos de aldehído. Luego se burbujea una corriente de gas nitrógeno a través de la solución de cerveza, transfiriendo los aldehídos volátiles a la solución que es capaz de atrapar electrolitos en la celda voltamperométrica donde estos compuestos se derivatizan con hidrazina y se determinan los niveles. En segundo lugar, la solución de cerveza restante se acidifica fuertemente con HCl para convertir todo el sulfito en SO_2 . Este (SO_2 total) se purga con nitrógeno y se transfiere a una nueva solución de atrapamiento de electrolitos en la celda voltamétrica donde también se determina el nivel (Almeida et al., 2003).

Se utiliza un soporte voltamétrico Metrohm 663 VA (Metrohm, Herisau, Suiza) en su modo de electrodo colgante de gota de mercurio con un electrodo auxiliar de carbón vítreo y un electrodo de referencia Ag/AgCl (3M KCl). Los voltamogramas de onda cuadrada se obtienen en las siguientes condiciones: potencial inicial, -0.4 V; potencial final, -1.3 V; paso de pulso, 2.5 mV; amplitud de pulso, 25 mV; y frecuencia, 25 Hz. En la preparación de soluciones se usan químicos

de grado reactivo analítico y agua purificada de un sistema Millipore (Simplicity 185; Bedford, MA) (Almeida et al., 2003).

Se utiliza metabisulfito de sodio (Riedel-de-Haen, Seelze, Alemania), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, como fuente de SO_2 . Se prepara y se estandariza una solución madre de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ usando un exceso de solución de yodo estándar que se valora por retroceso con una solución estándar de tiosulfato de sodio (Almeida et al., 2003). A continuación, se diluye una solución comercial de acetaldehído (Aldrich, Milwaukee, WI) para preparar una solución madre. Se prepara diariamente una solución del agente derivatizante, dicloruro de hidrazina (Aldrich), para la determinación del nivel de acetaldehído mediante disolución en soluciones de NaOH 1 M y ajustando el valor de pH a 5. Las soluciones modelo se preparan diluyendo las soluciones madre de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y acetaldehído anteriores en etanol al 5% (Almeida et al., 2003).

En cuanto a la determinación voltamperométrica del nivel de acetaldehído (SO_2 ligado) se prepara una muestra de 20,00 ml de hidróxido de sodio 0,01 M y una muestra de 1,00 ml de cerveza o soluciones modelo se colocan en un tubo de ensayo de muestra. La temperatura de esta solución se ajusta a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ usando un baño termostático. El acetaldehído se purga de esa solución con una corriente de gas nitrógeno (0,5 l por minuto durante 15 minutos) y se recoge en la solución de atrapamiento de electrolitos que se coloca en la celda voltamperométrica. La solución de atrapamiento de electrolitos, que contiene 20,00 mL de tampón acetato (0,1 M, pH 5) y 400 μL de solución de hidrazina 1 M, se desoxigena previamente durante 5 min y se termostatiza a $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente, la cantidad de acetaldehído recogido en la solución de electrolito se determina por voltamperometría después de derivatizar con hidracina (Almeida et al., 2003).

Para la determinación voltamperométrica del nivel de dióxido de azufre total se realiza después de la determinación del nivel de acetaldehído, la solución restante en el tubo de ensayo de muestra se acidifica mediante la adición de 2,0 ml de solución de ácido clorhídrico concentrado. La temperatura de esta solución se ajusta a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ usando un baño termostático. El SO_2 total se purga de la solución con una corriente de gas nitrógeno (0,4 L por min durante 5 min) y se recoge en 20,00 mL de una nueva solución de captura de electrolitos (tampón de acetato 0,1 M, pH 4), que previamente es desoxigenada, colocada en la celda voltamperométrica, y termostatizada a $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente, la cantidad de SO_2 total recogido en la solución de electrolito se determina por voltamperometría. El SO_2 libre se estima como la diferencia entre las concentraciones de SO_2 total y acetaldehído (SO_2 unido) determinadas previamente. El procedimiento que se utiliza para el método espectrofotométrico de para-rosanilina es el del ASBC (Association of Official Analytical Chemists, 1977).

2.1.19 Métodos de destilación para el análisis de SO_2 :

Los métodos de destilación se encuentran entre los procedimientos más utilizados para el análisis de SO_2 en alimentos y bebidas. La mayoría son adaptaciones de la destilación de Monier-Williams

(Monier-Williams, 1927) para convertir el ion bisulfito en el $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ más volátil. La solución se calienta a reflujo y el SO_2 liberado queda atrapado y simultáneamente se convierte en H_2SO_4 por reacción con H_2O_2 . El H_2SO_4 producido se valora frente a NaOH . Este método tiene la ventaja de ser simple y preciso, pero el paso de destilación puede tardar una hora o más. En consecuencia, no es adecuado para situaciones en las que se requiere un rápido cambio de muestras (Ilett, 1995).

2.1.20 Caracterización y clasificación del aroma de muestras de cerveza mediante e-nose MS y herramientas quimiométricas

En este estudio se utiliza una nariz electrónica basada en el acoplamiento del espacio de cabeza (HS) con un espectrómetro de masas (MS) para clasificar y caracterizar una serie de cervezas según su sitio de producción y composición química. Aunque la evaluación sensorial de la cerveza involucra todos los sentidos, el olfato y el gusto son los más importantes. La evaluación olfativa de las cervezas es muy compleja, ya que el aroma resulta de una mezcla compleja de varios compuestos químicos volátiles que pertenecen a grupos muy heterogéneos, por ejemplo, alcoholes, ésteres, compuestos de azufre, cetonas, aldehídos, etc., presentes en concentraciones muy diferentes (Vera et al., 2011).

La nariz electrónica basada en el detector de masas (HS-MS e-nose, también llamado sensor químico) es capaz de realizar análisis en tiempos muy cortos y con una preparación mínima de la muestra. En este instrumento los compuestos volátiles extraídos del espacio de cabeza de las muestras líquidas se introducen en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas, en el que se fragmentan. La fragmentación e ionización de todos los compuestos volátiles se registran como la abundancia de cada ion de diferente relación masa/carga (m/z) en el llamado espectro de masas. Finalmente, los datos espectrales de masas obtenidos para cada muestra se recogen en una matriz de datos, en la que las abundancias m/z son las columnas y las muestras son las filas. Esto permite obtener información química sobre los compuestos responsables de las diferencias entre las muestras analizadas. La interpretación final es posible mediante el uso de quimiometría, que permite la clasificación, diferenciación y caracterización de las muestras. La principal ventaja de estos instrumentos es que los tiempos de ejecución suelen ser muy cortos (1 a 5 min/muestra), principalmente cuando se utiliza un muestreador automático (Vera et al., 2011).

Para el análisis sensorial las muestras de cerveza son evaluadas sensorialmente por un panel de 10 evaluadores capacitados, quienes realizan el análisis sensorial considerando el aroma como una impresión global y solo cuando se detecta una nota organoléptica muy destacable describen esa percepción. Los evaluadores realizan la evaluación sensorial sin conocer el origen o cualquier otra información relacionada con las cervezas (cata a ciegas). La evaluación del perfil aromático de las diferentes muestras se realiza en una escala discontinua de 1 (muy bueno) a 5 (muy malo). El coeficiente de variación para las réplicas de la muestra de los panelistas es aproximadamente

del 15%. A partir de los resultados sensoriales, las cervezas se clasifican en cuatro categorías: la categoría I incluye cervezas evaluadas con valores inferiores a 2.6; la categoría II incluye las cervezas dentro de un rango de puntuación de 2,61 a 2,79; la categoría III incluye las cervezas dentro de un rango de puntuación de 2,8-2,99; y, finalmente, la categoría IV incluye las cervezas con valores superiores a 3 (Vera et al., 2011).

En cuanto a las muestras se propone obtener sesenta y siete muestras de cerveza lager de la misma marca de cuatro fábricas diferentes: 11 de la fábrica A, 15 de la fábrica B, 21 de la fábrica C y 20 de la fábrica D. Para garantizar que las muestras sean representativas, el muestreo se realiza en 6 meses y, para cada muestra, se toma, al azar, tres botellas de cerveza recién embotellada (Vera et al., 2011).

El análisis de cerveza se realiza con un HS-MS de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemania), compuesto por un muestreador de espacio de cabeza estático HP 7694, un cromatógrafo de gases HP 6890 y un espectrómetro de masas cuadrupolo HP 5973 con bomba de difusión. Debido a que la función del cromatógrafo de gases es transferir los volátiles desde el muestreador de espacio de cabeza al detector MS, la columna analítica apolar (HP-5MS) se mantiene a la temperatura adecuada para garantizar la transferencia de los volátiles al MS en menos de 5 min. y evitar la separación cromatográfica (Vera et al., 2011). Para realizar el análisis de cerveza previamente las muestras de cerveza se desgasifican mediante ultrasonidos durante 15 min. Luego, las muestras (5,0 mL) se colocan en viales de 10 mL con NaCl (2 mol/L). Los viales se tapan herméticamente con septos de silicona PTFE bajo una atmósfera de N₂. Todas las muestras se preparan y analizan por triplicado (Vera et al., 2011).

Para lograr el equilibrio de los compuestos volátiles entre el líquido y el espacio de cabeza, las muestras se termostatan a 65°C durante 1 h con agitación constante en el muestreador automático de espacio de cabeza. A continuación, se transfirieren tres mililitros del espacio de cabeza generado al puerto de inyección a través de la línea de transferencia a 90°C. La inyección se realiza en modo splitless durante 1,6 min a 250°C usando una entrada de 1,5 mm de d.i. Se utiliza una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). El programa de temperatura del horno que garantiza la transferencia de los volátiles en el menor tiempo (menos de 5 min) al MS es: 70°C (1 min), 70°C/min, 180°C (2,5 min) (Martí et al., 2004). El gas portador es helio con un caudal de 1,6 mL/min. Los espectros de masas se registran mediante ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV con una temperatura de 230°C en la fuente de iones y 150°C en el cuadrupolo de masas. El rango de relación masa-carga (m/z) que se utiliza es 50-150. Por último, debido a que el etanol es el compuesto volátil más abundante (aproximadamente 5%), no se analizan proporciones inferiores a 50 m/z para evitar la interferencia del etanol (Vera et al., 2011).

2.1.21 Análisis de aldehído-bisulfitos en cerveza mediante fluorescencia-HPLC y Detección con derivatización posterior de columna

Un método analítico se basa en la reacción aldehído-bisulfito (separado por HPLC) con o-ftalaldehído en presencia de acetato de amonio, produciendo un compuesto fluorescente (Hirota Kaneda et al., 1996). Solo el método HPLC-ECD es lo suficientemente sensible como para proporcionar información sobre el sulfito en la cerveza. Si se prepara una muestra en una solución alcalina y se inyecta en la HPLC, se podría medir el sulfito total, incluido el sulfito libre y los aductos con componentes de cerveza. Los niveles de sulfito libre podrían analizarse si se usara una solución ácida para la preparación de la muestra. El límite de detección de sulfito en la cerveza utilizando este método es de 0,6 mM y se ha demostrado que la mayoría de los sulfitos en la cerveza son aductos de bisulfito (Hirota Kaneda et al., 1991).

Para este procedimiento se compran cervezas tipo lager. Las cervezas (se etiquetan de la A a la G) son cervezas que están dentro de 1 mes después de la producción y la cerveza H es una cerveza importada. Entre los reactivos que se utilizan están: El o-ftalaldehído, ácido hidroximetanosulfónico, se sintetizan otros aldehídobisulfitos mediante la reacción de adición de hidrógeno bisulfito de sodio (Wako Pure Chemicals, Ltd) y cada uno de los reactivos de aldehído. El instrumento de HPLC es un controlador del sistema Waters 600 E equipado con un inyector automático de muestras Waters 712 WISP, un horno termostatzado de columna y un detector espectrofluorométrico Shimazu 820-FP. Se utiliza una parte de tubería J (Shimazu, Kyoto. Japón) para mezclar y para reacciones. En cuanto al tratamiento de la muestra, la cerveza se desgasifica por supersonicación y se diluye con ácido acético 10 mM. La muestra se pasa por un filtro de 0,45 mm. Para la concentración de la muestra se utiliza un cartucho Sep Pack C18 (Waters). Se carga la cerveza (5 ml) y se lava con ácido acético 20 mM. La muestra se eluye con 0,5 ml de metanol que incluye ácido acético 20 mM (Hirota Kaneda et al., 1996).

Con respecto al procedimiento de cromatografía, los bisulfitos de formaldehído, acetaldehído y propionaldehído se determinan mediante el Método I y los bisulfitos de aldehído de alto peso molecular se determinan mediante el Método II. Las condiciones cromatográficas son las siguientes:

Para el método I se utiliza una columna, Puresil 5 μ C18 120Å (4,6x250 mm, Waters)x 3; solución de elución, acetato de amonio 10 mM y solución de ácido acético 20 mM (isocrática); caudal, 0,5 ml/min; temperatura de la columna, 20°C. Para el método II: columna, Puresil 5 μ C18 120 Å (4,6x250 mm); solución de elución, acetato de amonio 10 mM y solución de ácido acético 20 mM (solución A) y acetato de amonio 10 mM y solución de metanol al 60% de ácido acético 20 mM (solución B); caudal, 0,7 ml / min; 0–5.00 min, solución isocrática A; 5.01-15.00 min, soluciones de gradiente lineal A – B; 15.01–45.00 min, solución B isocrática; temperatura de la columna, 20°C. solución de reacción, solución metanólica de o-ftalaldehído 10 mM y tampón borato 100

mM (pH 9,8) (1: 4, v/v); caudal, 0.2 ml/min para el método I y 0,3 ml / min para el método II; temperatura de reacción, 50°C; detección de fluorescencia, λ ex.= 320 nm y λ em. = 390 nm. Inyección de muestra; 20 μ L (Hirota Kaneda et al., 1996).

Este análisis es un método post-columna basado en el hecho de que cada aldehído-bisulfito en la cerveza separado por HPLC reacciona con o-ftalaldehído en presencia de acetato de amonio, produciendo un compuesto fluorescente. El sulfito en lluvia reacciona con formaldehído para formar el aducto de formaldehído-bisulfito antes del análisis por HPLC. El aducto de bisulfito se separa mediante cromatografía de exclusión iónica y luego se somete a reaccionar con o-ftalaldehído en presencia de citrato de amonio, produciendo un compuesto fluorescente. En este estudio, se utiliza una columna de ODS para determinar varios bisulfitos de aldehído en cerveza y el citrato de amonio se reemplaza por acetato de amonio para la reacción fluorescente (Hirota Kaneda et al., 1996).

2.1.22 Identificación basada en mediciones cuantitativas y recombinación de aromas de los olores de impacto de carácter en una cerveza bávara tipo Pilsner

Para este estudio se obtienen varios lotes de una cerveza tipo Pilsner de una fábrica de cerveza bávara inmediatamente después de la producción. En el marco de este estudio se han analizado tres lotes diferentes de una misma marca. Para el aislamiento de los volátiles, la cerveza (500 mL) se filtra a través de un papel para evitar la formación de espuma durante la extracción y se extrae repetidamente con éter dietílico (volumen total) 2,4 L. El extracto se seca sobre Na_2SO_4 y finalmente se concentra a 100 ml separando el disolvente por destilación a 38°C usando una columna Vigreux (60 cm x 1 cm de d.i.). Para eliminar el material no volátil, el concentrado se destila usando el método de evaporación de sabor asistido por solvente (SAFE) (Engel et al., 1999). Con tratamiento del destilado con bicarbonato de sodio acuoso (0,5 mol/L, 200 mL), se obtiene una fracción de los volátiles ácidos (AV) y de los volátiles neutros / básicos (NBV) (Schieberle, 1991b). Después de secar sobre Na_2SO_4 , ambas fracciones se concentran mediante microdestilación (Schieberle, 1991b) a 250 μ l (Fritsch & Schieberle, 2005).

Para el procedimiento de espectrometría de masas (HRGC-MS), la HRGC se realiza mediante un cromatógrafo de gases tipo 8000 (Fisons, Mainz, Alemania) y utilizando los siguientes capilares: SE-54 (30 m x 0,32 mm capilar de sílice fundida DB-5, 0,25 μ m) (J&W Scientific, Fisons, Alemania); FFAP de fase de ácido graso libre (capilar de sílice fundida de 30 mx 0,32 mm; 0,25 μ m) (Chrompack, Mühlheim, Alemania); y OV-1701 (capilar DB-1701 de sílice fundida de 30 mx 0,32 mm, 0,25 μ m) (Chrompack). Las muestras se aplican mediante la técnica de frío en columna a 35°C. Después de 2 min, la temperatura del horno se eleva a 40°C/min a 50°C para el SE-54 o a 60°C para los capilares FFAP y OV-1701, respectivamente, se mantiene durante 2 min de forma isotérmica y luego se eleva a 6°C/min a 180°C, finalmente se eleva a 20°C/min a 230°C y se mantiene durante 10 min. El caudal del gas portador helio es de 2,5 ml/min. Al final del capilar, el

efluente se divide 1:1 (en volumen) en un FID y un puerto de aspiración utilizando dos capilares de sílice fundida desactivados, pero no recubiertos (50 cm x 0,32 mm). El FID y el puerto de rastreo se mantienen a 220 y 240°C, respectivamente (Schieberle, 1991b).

La espectrometría de masas (MS) se realiza mediante un MAT 95 S (Finnigan, Bremen, Alemania) en tándem con los capilares descritos anteriormente. Los espectros de masas se generan en el modo de impacto de electrones a 70 eV y en el modo de ionización química a 110 eV con isobutano como gas reactivo (Fritsch & Schieberle, 2005).

Por otro lado, para el análisis de dilución de extracto de aroma (AEDA), los factores de dilución del sabor (FD) de los odorantes se determinan por AEDA de la siguiente serie de diluciones: los extractos que contienen los volátiles neutros / básicos y ácidos (AV y NBV; cada 250 µL) de 500 mL de cerveza se diluyen paso a paso con éter dietílico. La GC-O se realiza con alícuotas (0,5 µL) utilizando los capilares SE-54 (para NBV) y FFAP (para AV). El extracto original debe ser olfateado por al menos cuatro panelistas experimentados para evitar pasar por alto las áreas activas de olor. A continuación, dos panelistas realizan la AEDA en tres lotes diferentes de la misma cerveza y se promedian los factores FD obtenidos. Para el análisis de dilución de aroma (ADA) se pipetea cerveza (50 ml) en un recipiente (volumen) (300 ml), se sella con un tabique y se equilibra durante 20 min a temperatura ambiente. Se extraen muestras de espacio de cabeza de volúmenes decrecientes (de 20 a 0,1 ml) de diferentes recipientes que contienen la misma cantidad de cerveza utilizando una jeringa hermética al gas (Hamilton, Australia) y luego se analizan mediante el espacio de cabeza HRGC-O (Fritsch & Schieberle, 2005).

Para la cuantificación mediante ensayos de dilución de isótopos estables (SIDA) junto con cromatografía de gases bidimensional de alta resolución (TDHRGC SIDA), se pipetea cerveza (1 a 1000 ml, dependiendo de la concentración del odorizante respectivo determinada en un experimento preliminar) en un recipiente (100 a 1000 ml) y se le añade una solución etanólica de los estándares internos. La cantidad del patrón interno respectivo se elige en un rango de concentración similar en comparación con el analito. Las muestras se equilibran durante 15 min con agitación y luego se extraen repetidamente con éter dietílico y se destilan. El destilado se separa en AV y NBV, y ambas fracciones se concentran a 250 µl como se describió anteriormente. La HRGC-MS bidimensional se realiza mediante una serie HRGC Mega 2 (Fisons, Mainz, Alemania) acoplada con una HRGC 5160 (Carlo Erba, Hofheim, Alemania). La separación del extracto en la primera dimensión se logra en una columna SE-54 (NBV) o en un FFAP (AV), respectivamente. El rango de elución que contiene el odorizante respectivo y el estándar interno, respectivamente, se transfiere a la segunda columna por medio del sistema MCSS (cambio de flujo capilar móvil; Thermoquest, Alemania) a través de una trampa fría, que se enfría a -100°C. Con calentamiento a 200°C, el analito y el estándar interno se transfirieren luego a la segunda columna con diferentes polaridades (para NBV, FFAP; y para AV, OV-1701). La cuantificación se

realiza mediante un detector de trampa de iones ITD 800 (Finnigan MAT, Bremen, Alemania), que se acopla al HRGC en modo open-split. Los espectros se generan en el modo de ionización química con metanol como gas reactivo (energía de ionización) 70 eV. do el aparato SAFE (Fritsch & Schieberle, 2005).

Con respecto a la determinación de relaciones enantioméricas, las proporciones enantioméricas en linalol y 2-metilbutanoato de etilo se determinan en el NBV mediante GC bidimensional utilizando una columna quiral (BGB 176, 30 m x 0,25 mm, espesor de película) 0,25 µm) (BGB Analytik, Rothenfluh, Suiza) en segunda dimensión. El programa de temperatura utilizado para la separación quiral comienza a 35°C. Después de 1 min, la temperatura del horno se eleva a 40°C/min a 50°C, se mantiene durante 1 min de forma isotérmica, luego se eleva a 6°C/min a 180°C y finalmente se eleva a 20°C/min a 230°C y se mantiene durante 10 min. El caudal del gas portador, helio, es de 2,5 ml/min. Para el cálculo de la distribución enantiomérica, se registran las intensidades de los iones seleccionados (Fritsch & Schieberle, 2005).

Por otra parte, la cuantificación de componentes altamente volátiles, acetaldehído, sulfuro de dimetilo y 3-metilbutanal es realizada por SIDA usando espacio de cabeza estático acoplado con HRGC-MS. Para ello, se pipetea alícuotas de cerveza (1 mL para la cuantificación de acetaldehído, 10 mL para sulfuro de dimetilo y 20 mL para 3-metilbutanal) en un matraz Erlenmeyer (250 mL) y se adicionan con el estándar marcado isotópicamente. La muestra se equilibra durante 20 min a 45°C, y luego se extraen 5 ml del espacio de cabeza con una jeringa hermética al gas (Hamilton, Australia); los volátiles se crioenfocan en una trampa antes de inyectarlos en una columna capilar SE-54 instalada en un tipo CP-9001 GC (Chrompack, Frankfurt, Alemania). La columna de GC se acopla a un espectrómetro de masas cuadrupolo tipo Incos XL (Finnigan Mat, Bremen), y los espectros de masas se generan en el modo de ionización química (115 eV) utilizando metano como gas reactivo (Fritsch & Schieberle, 2005).

Para la cuantificación de etanol se realiza usando un kit de prueba enzimática de R-Biopharm (Darmstadt, Alemania). La cerveza (10 mL) se desgasifica sobre un filtro y se diluye con agua antes de aplicar la prueba enzimática (Fritsch & Schieberle, 2005). En cuanto a la determinación de los umbrales de olor, todos los olores de referencia se verifican primero por la ausencia de olores contaminantes mediante HRGC-O y se purifican por destilación, si fuera necesario. Se pipetea etanol (10 µL), que contiene una cantidad definida del odorizante respectivo, en 25 ml de agua corriente. Después de 2 min de agitación en vasos de vidrio (altura) (65 mm; d.i., 40 mm; volumen total, 45 mL), la muestra se juzga por un panel de 10 personas por medio de pruebas triangulares usando 25 mL de agua del grifo enriquecida con 10 µL de etanol como control. Las muestras se presentan en orden de concentraciones crecientes de olor (diluciones 1+1), y los umbrales de olor se calculan de acuerdo con el método de la sección 35 LMBG, métodos 00.90-9 y 00.90-7 (Fritsch & Schieberle, 2005).

Para el modelo Aroma Pilsner se carbonata agua del grifo con un SodaMaker y se ajusta el pH a 4.3 (el mismo que el pH de la cerveza investigada), utilizando ácido clorhídrico (0.5 mol / L). La siguiente mezcla de 22 odorantes, disueltos en etanol, se añade a 1 L de agua: 3-metilbutanol (50000 µg), 2-feniletanol (15000 µg), 2-metilbutanol (14400 µg), acetaldehído (5100 µg), ácido butanoico (1740 µg), 3- (metiltio) propanol (998 µg), ácido 3-metilbutanoico (860 µg), 4-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furanona (310 µg), hexanoato de etilo (200 µg), butanoato de etilo (200 µg), octanoato de etilo (160 µg), 4-vinil-2-metoxifenol (140 µg), sulfuro de dimetilo (60 µg), dietoxietano (50 µg), (R) -linalol (45 µg), 2- o 5-etil-4-hidroxi-5- o 2-metil-3 (2H) -furanona (20 µg), 3-metilbutanal (5 µg), 2 metilpropanoato de etilo (3,2 µg), (E) - α - damascenona (2,3 µg), 3-hidroxi 4,5-dimetil-2 (5H) -furanona (1 µg), 4-metilpentanoato de etilo (0,28 µg) y 3-metil-2-buten-1-ol (0,01 µg). El contenido de etanol (compuesto aromático número 23) del modelo de aroma se ajusta finalmente a 40 g/L (Fritsch & Schieberle, 2005).

A continuación, en la prueba de perfil descriptivo la muestra de cerveza y el modelo de aroma de Pilsner son evaluados orthonasalmente por 10 panelistas entrenados, a quienes se les pide que clasifiquen la intensidad de los siguientes atributos de olor: maltoso, parecido a la miel, afrutado, parecido a los cítricos, lúpulo y sudoroso. Las respectivas intensidades de olor se califican como 0 (no perceptible), 1 (débil), 2 (significativo) y 3 (fuerte) utilizando una escala de 0, 0.5, 1.0, 1.5, etc (Fritsch & Schieberle, 2005).

Por último, los panelistas reciben capacitación sobre las cualidades e intensidades del olor utilizando soluciones acuosas que contienen el respectivo olor responsable de un determinado atributo de olor, por ejemplo, fenilacetaldehído para miel, en diferentes concentraciones (Fritsch & Schieberle, 2005).

2.1.23 Optimización de un método de extracción dinámica en fase sólida (SPDE) para la elaboración de perfiles volátiles de cerveza

En comparación con las técnicas de extracción más tradicionales, como la extracción con disolventes y la concentración por destilación al vapor, la SPME presenta muchas ventajas. Es rápido, fácil de automatizar y requiere bajos volúmenes de muestra. Sin embargo, el SPME posee ciertas desventajas, como el daño de los recubrimientos debido al raspado y la flexión de la aguja durante la agitación, la flexibilidad limitada en la longitud de la fibra y el espesor del recubrimiento limitado, lo que da como resultado cantidades bajas de polímero que recubre la fibra de SPME (Bicchi et al., 2004; Laaks et al., 2012). Para superar algunas de las desventajas de SPME, se desarrolló la extracción dinámica en fase sólida (SPDE). SPDE se basa en los mismos principios que SPME, pero utiliza una aguja de acero revestida internamente en lugar de una fibra para la extracción y preconcentración de compuestos del espacio de cabeza de la solución (Sieg et al., 2008). El muestreo dinámico se realiza pasando continuamente el espacio de cabeza de la muestra a través del recubrimiento de polímero en el interior de la jeringa hermética a los gases

un número predeterminado de veces (Bicchi et al., 2004). Comparado con SPME, SPDE tiene las ventajas de una mayor capacidad de sorción debido a la mayor cantidad de fase estacionaria, cinco a seis veces la cantidad de fase estacionaria en comparación con SPME. SPDE también permite una extracción más rápida debido al bombeo activo, por lo que no solo se basa en la difusión sino también en la estabilidad mecánica (Castro et al., 2015).

Para este estudio las muestras de cerveza se compran en una tienda local y se mantienen a 4°C hasta que sea el momento del análisis. Estas muestras de cerveza se seleccionan porque se piensa que representan una amplia gama de cervezas disponibles comercialmente con una variedad de compuestos volátiles. Los estilos de cerveza que se seleccionan incluyen ale, lager, stout, trigo e India pale ale (IPA) (Castro et al., 2015).

Los parámetros del sistema HS-SPDE consisten en el equipo SPDE que cuenta con jeringas y agujas SPDE adjuntas además una estación de servicio adicional para aspirar gas de desorción (Chromtec, Idstein, Alemania). Estos componentes se instalan en un muestreador automático CTC-Combi-PAL (CTC Analytics, Alemania) equipado con un mezclador de imán único calentable. Todos los pasos del método SPDE son completamente automatizados y controlados por el software CTC-Combi-PAL. Las agujas SPDE (50 mm × 0,8 mm, D.I. 0,53 mm, punta de aguja cónica con puerto lateral) se conectan a una jeringa hermética al gas de 2,5 ml con un puerto lateral para la descarga de gas (Hamilton, Darmstadt, Alemania). La estación de servicio y la jeringa se conectan al suministro de gas nitrógeno para enjuagar y se regulan con el inyector automático. La gasolinera se utiliza para adquirir un volumen definido de nitrógeno antes de la desorción. Adicionalmente, el calentador del adaptador de jeringa se ajusta a 55°C (Castro et al., 2015).

Para la selección del revestimiento interno de la aguja SPDE, se requiere que antes de la optimización de los parámetros de extracción de SPDE, se comparan dos agujas de SPDE disponibles comercialmente (50 µm de polidimetilsiloxano (PDMS), 50 µm de polidimetilsiloxano al 90% / 10% de carbón activado (PDMS / AC) para determinar su rendimiento en la extracción de HS-SPDE. Ambas agujas se acondicionan previamente antes de su uso, con el PDMS calentado a 250°C durante 0,5 h, y el PDMS / AC se calienta a 300°C durante 2 h. La aguja SPDE que presenta el perfil más completo de compuestos volátiles de la cerveza se utiliza luego para optimizar los parámetros de extracción de SPDE (Pinho et al., 2006; Saison et al., 2008). Por otro lado, el rendimiento de la aguja se compara agregando 10 ml de cerveza comercial (ale) a un vial con espacio de cabeza de 20 ml que contiene 1.0 g de NaCl y una barra de agitación magnética (Malherbe et al., 2009). Los viales se sellan herméticamente con un tapón de rosca y un tabique revestido de teflón y se equilibran durante 20 min a 24°C agitando a 250 rpm (Castro et al., 2015).

Estas condiciones de equilibrio son optimizadas previamente por Pinho y sus colaboradores (Pinho et al., 2006) para el análisis de la fracción volátil de la cerveza. Después del equilibrio de

la muestra, el muestreo del espacio de cabeza para la evaluación del rendimiento de la aguja SPDE se lleva a cabo en condiciones de extracción previamente publicadas para el análisis SPDE de fracciones volátiles de matrices de alimentos (Bicchi et al., 2004), y son las siguientes: volumen de extracción 1 mL, temperatura del agitador 50°C, temperatura de la jeringa del espacio de cabeza 55°C, número de golpes 50, velocidad de llenado / expulsión 50 $\mu\text{L/s}$, volumen de nitrógeno para desorción 1 ml y velocidad de desorción 15 $\mu\text{L/s}$. Después del muestreo del espacio de cabeza, la aguja se retira del vial de muestra y se inserta inmediatamente en la estación de servicio, donde se introducen 500 μL de gas nitrógeno en la jeringa. Para la desorción de los analitos atrapados, la aguja se inserta completamente en el puerto de inyección del GC a 250°C y el nitrógeno se bombea a través de la aguja al interior a 15 $\mu\text{L/s}$. Los analitos se vierten en el instrumento de GC y se analizan mediante el método de GC / MS. Todos los análisis se realizan por triplicado (Castro et al., 2015).

Para el diseño experimental de optimización, con la aguja SPDE seleccionada, se optimizan los siguientes parámetros de extracción: carreras de extracción, temperatura de extracción y velocidad de llenado / expulsión. La optimización de los parámetros se lleva a cabo mediante un enfoque multivariado (Castro et al., 2015).

Primero, se realiza un diseño factorial completo preliminar de dos niveles que incluye la temperatura de extracción, los golpes de extracción y la velocidad de llenado / expulsión para evaluar la extracción simultánea de los compuestos volátiles de la muestra. Los factores que tienen un efecto significativo en la respuesta del área del pico de GC se optimizan aún más utilizando una metodología de superficie de respuesta a través de una matriz de Doehlert. Para ambos diseños de optimización, la suma de las áreas de los picos se utiliza como respuesta para la optimización de las condiciones de extracción (Pellati et al., 2005; Pinho et al., 2006).

Procedimiento HS-SPDE: Para optimizar los parámetros de SPDE, se colocan 10 ml de cerveza comercial (ale) en un vial con espacio de cabeza de 20 ml que contenía 1,0 g de NaCl y una barra de agitación magnética (Malherbe et al., 2009). Los viales se sellan herméticamente con un tapón de rosca y un tabique revestido de teflón. Luego, las muestras se incuban a las temperaturas correspondientes (de 30 a 60°C) durante 10 minutos antes de la extracción de SPDE y se agitan a 250 rpm. El muestreo del espacio de cabeza se lleva a cabo utilizando diferentes valores de temperatura de extracción, velocidad de llenado / expulsión y carreras de extracción (Castro et al., 2015).

Las siguientes condiciones se mantienen constantes durante todo el procedimiento de optimización: temperatura de la jeringa del espacio de cabeza 55°C, volumen de nitrógeno para desorción de 1 ml y velocidad de desorción de 15 $\mu\text{L/s}$. Todos los análisis se realizaron por triplicado (Castro et al., 2015). Después del muestreo del espacio de cabeza, la aguja se retira del vial de muestra y se inserta inmediatamente en la estación de servicio, donde se introducen

500 μL de gas nitrógeno en la jeringa. Para la desorción de los analitos atrapados, la aguja se inserta completamente en el puerto de inyección del GC a 250°C y el nitrógeno se bombea a través de la aguja al interior a 15 $\mu\text{L/s}$. Los analitos se vierten en el instrumento de GC y se analizan mediante el método de GC / MS (Castro et al., 2015).

Procedimiento HS-SPDE optimizado: las condiciones optimizadas para el análisis HS-SPDE-GC son las siguientes: se añaden 10 ml de muestra de cerveza, 1,0 g de NaCl y una barra de agitación a viales de 20 ml que se sellan con tapón de rosca y un tabique revestido de teflón. La extracción se automatiza y se realiza mediante un sistema CombiPal (CTC Analytics, Alemania), equipado con una aguja SPDE de polidimetilsiloxano (PDMS) de 50 μm (Chromtec, Alemania). Las muestras se equilibran durante 15 min a 60°C y se utilizan las siguientes condiciones: velocidad de agitación 250 rpm, temperatura de extracción 60°C, carreras de extracción 55, volumen de extracción 1 mL, temperatura de fibra 55°C, velocidad de llenado / expulsión 50 $\mu\text{L/s}$, y volumen de desorción 1 mL (Castro et al., 2015).

Método GC-MS: Los compuestos volátiles se analizan usando un cromatógrafo GC 6890N acoplado con un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización por impacto de electrones (EI). El sistema GC / MS está equipado con el software ChemStation (versión D.03.00.611). La separación de los compuestos se realiza en un HP-5MS (longitud 30 m, diámetro interno 0,32 mm, espesor de película 0,25 μm ; Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, EE. UU.). Con todas las inyecciones realizadas en modo splitless. El caudal de gas portador (helio) es de 1 ml/min. El programa de temperatura del horno es el siguiente: 35°C durante 5 min, aumentado a 100°C a 2°C/min, aumentado a 200°C a 30°C/min (tiempo total de ejecución 40,83 min). La detección se realiza mediante espectrometría de masas. El espectrómetro de masas se debe equipar con una fuente de ionización por impacto de electrones (EI), para las condiciones del detector selectivo de masas, la fuente de iones se mantiene a 280°C y la línea de transferencia y el inyector a 250°C. El espectrómetro de masas se hace funcionar en el cromatograma de iones totales (TIC) a 70 eV. Se recogen datos de 33 a 350 m/z. Los componentes del espacio de cabeza se identifican mediante la comparación de los espectros de masas con los datos espectrales de masas de la biblioteca espectral de masas del NIST (Revisión 2011) (Castro et al., 2015).

Análisis de los datos: Se utiliza un análisis de varianza de tres vías (ANOVA) con la separación media HSD de Tukey para determinar qué parámetros de extracción en el modelo factorial completo de dos niveles influyen significativamente en la extracción de los componentes volátiles. Todos los análisis se realizan utilizando XLSTAT (Addinsoft, París, Francia). La significancia se define como $p \leq 0.05$. Los datos experimentales para la optimización del método mediante el uso del diseño Doehlert se procesan utilizando Sigma Plot, versión 11.0.0. (Systat Software Inc., San José, CA EE. UU.) Y GNU Octave (versión 3.2.4.), Un lenguaje de programación de código abierto gratuito diseñado principalmente para cálculos numéricos similares a Matlab (Castro et al., 2015).

El material de sorción dentro de la aguja es un parámetro importante a considerar para la optimización y extracción por SPDE, ya que las características de polaridad y volatilidad del material de sorción determinarán la naturaleza química y concentración de los compuestos volátiles extraídos (Charry-Parra et al., 2011; Rodrigues et al., 2008). Por último, se prueban dos agujas (PDMS y PDMS / AC) para determinar su rendimiento en la extracción de compuestos volátiles de la cerveza. La comparación del rendimiento de las dos agujas probadas muestra que se detectan más compuestos cuando se usa el revestimiento interno de PDMS (Castro et al., 2015).

CAPÍTULO III

3.1 Influencia de los compuestos azufrados en las características de la cerveza

El sabor de la cerveza es el resultado de una interacción compleja entre centenares de compuestos químicos y esto incluye también los receptores olfativos y gustativos. Los compuestos que imparten sabor se pueden sentir directamente en la lengua, mientras que el aroma se refiere a cualquier compuesto volatilizado que se pueda percibir ya sea a través de la nariz o retronasalmente a través de la parte posterior de la boca. Es así que la percepción del sabor o el aroma o una combinación de ambos se describe como sabor. Sin embargo, los constituyentes químicos que imparten este sabor particular no están en equilibrio químico en la cerveza fresca y tienen lugar muchas reacciones químicas como producto terminado y durante el almacenamiento, lo que da como resultado una disminución de las notas de sabor fresco y la aparición de sabores típicos añejados (Saison et al., 2009).

En la actualidad, el sabor a envejecimiento tiene una gran relevancia dentro de la industria cervecera. Por un lado, es obvio que el perfil de sabor fresco se ve perturbado por la aparición de varios sabores añejados y, por otro lado, se observa un aumento o disminución de muchos compuestos durante el envejecimiento (Saison et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, dentro de los procesos de elaboración de la cerveza se producen una gran variedad de compuestos que influyen ya sea de una manera positiva o negativa en el sabor de la cerveza, es por esto que es necesario describir como estos compuestos alteran las características organolépticas de esta bebida. Entre los compuestos volátiles con sabor activo se encuentra el sulfuro de dimetilo (DMS) el cual es un tioéter (Hansen, 1999a), “los tioéteres en general son aceites, con olores desagradables en todas las concentraciones excepto en las más bajas” (B. J. Anness & Bamforth, 1982). Además, “es el compuesto de azufre más abundante en la cerveza con valores típicos de 14-144 $\mu\text{g/L}$, según el estilo, y un umbral sensorial de 30-45 $\mu\text{g/L}$ ” (Meilgaard, 1982). En niveles bajos, el DMS contribuye a la plenitud del paladar y al aroma general de la cerveza. Sin embargo, el DMS tiene un fuerte olor desagradable cuando está presente en niveles altos, lo que le da a la cerveza un olor a vegetal cocido o repollo (Scarlata & Ebeler, 1999). Por encima del nivel del umbral de sabor, pero por debajo de aproximadamente 100 mg/litro, el DMS contribuye al sabor distintivo de algunas cervezas lager. Cuando está presente en cantidades superiores, el DMS puede impartir un sabor habitualmente indeseable descrito como "maíz dulce cocido" (Dickenson, 1983). El uso de maltas ligeramente horneadas que contienen altos niveles de SMM, junto con períodos amplios de sedimentación del mosto caliente, puede resultar en cantidades de DMS en el mosto muy por encima del nivel del umbral de sabor. La proporción de DMS presente en la cerveza constituye la cantidad que está presente en el mosto que sobrevive a la fermentación y la que se forma por la acción de la levadura. Solo

en circunstancias radicales e inusuales no se formará DMS a lo largo del proceso de fermentación (B. J. Anness & Bamforth, 1982).

El 3-metil-2-buteno-1-tiol (MBT), también conocido como preniltercaptano o sabor a luz, como compuesto puro tiene un olor acre aparente a un puerro o "skunk" al disolverse en agua (Holscher et al., 1992). "En la cerveza, el MBT tiene un sabor ligeramente menos activo, con umbrales de diferencia informados de 1.25 a 2.5 ng/L" (Goldstein et al., 1993). Gracias a la alta actividad de sabor del MBT, las exigencias de cualquier técnica utilizada para medirlo son considerables. Aun cuando los cerveceros consideran al MBT como un carácter indeseable en la cerveza, no se han alcanzado análisis adecuados sobre las características hedónicas de este compuesto (Lermusieau & Collin, 2003).

En cuanto al tioacetato de S-metilo (MeSAc), que tiene un olor desagradable el cual recuerda a vegetales podridos, se identificó y determinó recientemente en la cerveza como otra posible fuente de sabor azufrado (Matsui & Amaha, 1981). Por otro lado, el DMSO es muy soluble en agua y, por lo tanto, se extrae fácilmente durante la maceración. Además, es termoestable y no volátil (p.f. 189°C), por lo que no se pierde durante la ebullición del mosto (B. J. Anness & Bamforth, 1982).

Por otra parte, el SO₂ es de gran relevancia para la estabilidad del sabor de la cerveza, ya que actúa como un antioxidante, pero en cantidades excesivas provoca un sabor indeseable y quizás constituya un peligro para la salud de los consumidores. El SO₂ tiene la característica de formarse a partir del sulfato del mosto durante la biosíntesis de levadura de los aminoácidos cisteína y metionina (Stratford & Rose, 1986). Asimismo, el H₂S tiene un umbral de sabor muy bajo (5–10 ppb) y puede generarse en la cerveza lager en concentraciones de hasta 20 ppb. El umbral de sabor del SO₂ en la cerveza es más alto (25 ppm) que el H₂S (Landaud et al., 2007). Además, "el exceso de SO₂ puede tener un efecto blanqueador sobre el color de la cerveza, aunque el alcance de dicho efecto blanqueador todavía no está claro y merece una mayor investigación" (S. Liu, 2015). Por lo general, las cervezas de alta fermentación tienen niveles de dióxido de azufre significativamente más bajos que las cervezas de baja fermentación. Los aminoácidos que incluyen azufre en su estructura y son absorbidos por la levadura pueden descomponerse todavía más y el exceso de azufre se elimina en forma de sulfuro de hidrógeno, que puede ser responsable del olor a huevo podrido (S. Liu, 2015).

Del mismo modo, el trisulfuro de dimetilo (DMTS) es un sabor clave en muchos productos alimenticios como el coñac, el whisky, el vino y la cerveza (Nedjma & Hoffmann, 1996; Williams & Gracey, 1982a, 1982b). El DMTS es de gran importancia debido a su umbral de detección muy bajo (0.1 ppb) y su característico olor a "cebolla fresca" (Landaud et al., 2007). Aunque está cerca de su valor umbral en la cerveza fresca, el nivel de DMTS puede ser mucho más alto después del almacenamiento y podría impartir un sabor desagradable a la cerveza añejada (Gijs et al.,

2000). Este es uno de los compuestos que más aporta con el sabor oxidado de la cerveza (Lusk et al., 2012). Frecuentemente el disulfuro de dimetilo y dimetil trisulfuro se originan en cervezas expuestas a la luz (Marsili et al., 2007).

En cuanto al metional se sabe que es un compuesto clave, responsable del mal sabor en las cervezas sin alcohol y su umbral de olor se reduce drásticamente en ausencia de etanol (Landaud et al., 2007). Por el contrario, la concentración de metionol en la cerveza, que usualmente se encuentra por debajo de su umbral de olor, no se considera importante para el sabor de la cerveza (Gijs & Collin, 2003). Este aldehído que contiene azufre y metionol también es precursor del trisulfuro de dimetilo en las cervezas añejadas (que desprenden olores a cebolla, papa cocida y ajo) (Gijs et al., 2000). Cuando el metionol está presente por encima de su nivel umbral (1 ppm), provee un aroma a "coliflor" y "repollo" (Mestres et al., 2000). Existe evidencia de que pequeñas cantidades del metional altamente potente (olor a papa cruda) con un umbral de detección muy bajo a unas pocas ppb (0.2-40 ppb) pueden secretarse fuera de las células de levadura (S. Q. Liu & Crow, 2010; Seow et al., 2010; Tan et al., 2012). Además, se sabe que metional produce metanotiol por irradiación con luz, lo que influye en la descripción posterior del sabor golpeado por el sol, en consecuencia, el metanotiol posee un olor potente y desagradable (Hughes, 1999).

Se informa que el 2-metilbutanoato de S-metilmetilo tiene un umbral de sabor en la cerveza de ppb, en cuya concentración produce notas aromáticas a cebolla y ajo y un sabor astringente (T. L. Peppard, 1981). Por otro lado, se informa que glutatión (GSH) induce el llamado sabor kokumi (sensación en la boca), que se ve reforzado por ácido glutámico (Glu), monofosfato de inosina (IMP) (Y. Maruyama et al., 2012; Ueda et al., 1997). Posiblemente el GSH, Glu y los nucleótidos pueden tener un efecto sinérgico sobre el sabor de la cerveza (S. Liu, 2015).

En cuanto al sulfato, este tiene un efecto positivo en la degradación del almidón y las proteínas, lo que favorece la filtración del mosto y la sedimentación. Puede proporcionar un paladar seco y fresco a la cerveza y aumentar el amargor percibido, pero si es en exceso, el producto final puede tener un carácter áspero, salado y laxante. Las light ales amargas e incluso las suaves se caracterizan por la presencia de sulfato en el agua de elaboración (Buiatti, 2009).

Por otro lado, el etanotiol tiene un umbral de 1.2 µg/L, que imparte un sabor característico a huevo podrido (H. Li et al., 2008). También se le ha descrito como perjudicial debido a que puede tener aroma a cebolla sintetizado mediante la reacción de sulfuro de hidrógeno y etanol o acetaldehído (Rauhut, 1993). Al mismo tiempo, un estudio reciente muestra que el sulfuro de dietilo también se encuentra en pequeñas cantidades en la cerveza y contribuye al aroma. Sin embargo, solo se encuentran grandes cantidades de sulfuro de dimetilo y sulfuro de dietilo cuando el mosto está infectado por bacterias resistentes a las condiciones del proceso de fermentación. Estas cervezas infectadas exhiben un aroma de cebolla dulce y astringente, que se demostró sintéticamente mediante la adición de los dos sulfuros (Shankaranarayana et al., 1974). Del mismo modo, el dietil

sulfuro tiene un umbral de sabor de 3ppb y su presencia causa un sabor parecido a vegetales cocidos o también se ha descrito como de cebolla (Yonezawa & Fushiki, 2002). Por último, el dimetil disulfuro provoca sabores de repollo cocido o cebolla y tiene un umbral de sabor de 3 a 50 ppb (Soltoft, 1988). El metil tioacetato tiene un olor desagradable que recuerda a verduras podridas (Matsui & Amaha, 1981). A continuación, en la tabla 4 se presenta un resumen de los compuestos azufrados generados en la cerveza con sus concentraciones y descriptores de sabor.

Tabla 4: compuestos azufrados presentes en la cerveza

| Compuestos azufrados en la cerveza | | | |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Compuesto azufrado | Concentración (µg/l) | Umbral de sabor (µg/L) | Descriptor de sabor |
| Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S) | 1–20 | 8 | Huevos podridos |
| Dióxido de azufre (SO ₂) | 200–20,000 | >25,000 | Sulfídico, Fósforo quemado |
| Disulfuro de carbono | 0.01–0.3 | >50 | - |
| Metanotiol | 0.2–15 | 2.0 | Putrefacción, desagües |
| Sulfuro de etileno | 0.3–2 | >20 | - |
| Etanotiol | 0–20 | 1.7 | Putrefacción |
| Propanotiol | 0.1–0.2 | 0.15 | Putrefacción, caucho |
| Dimetil sulfuro (DMS) | 10–100 | 30 | Maíz dulce, tomates enlatados |
| Dietil sulfuro | 0.1–1 | 1.2 | Vegetales cocidos |
| Dimetil disulfuro | 0.1–3 | 7.5 | Verduras podridas |
| Dietil disulfuro | 0–0.01 | 0.4 | Ajo, caucho quemada |
| Dimetil trisulfuro | 0.01–0.8 | 0.1 | Verduras podridas, cebolla |
| Metil tioacetato | 5–20 | 50 | Repollo |
| Etil tioacetato | 0–2 | 10 | Repollo |
| Metionol | 50–1,300 | 2000 | Patatas crudas |
| Metional | 20–50 | 250 | Puré de patatas |
| 3-metil-2buteno-1tiol (MBT) | 0.001–0.1 | 0.01 | Zorrillo |

(E.D. Baxter & Hughes, 2001).

3.2 Microbiología en la cerveza

La importancia de los microorganismos en los alimentos es evidente. “La producción de alimentos por técnicas microbiológicas es una actividad de larga historia: los microorganismos alteran los constituyentes de los alimentos de forma que los estabilizan permitiendo su mayor duración y, además, proporcionan compuestos que confieren sabores característicos a los alimentos” (Andino & Castillo, 2010). Si bien las levaduras son uno de los principales ingredientes para la elaboración de la cerveza, existen otros microorganismos que pueden estar presentes en esta bebida y representan una amenaza, afectando así las características organolépticas de la misma o, por otro lado, en el caso de microorganismos patógenos, constituyen un peligro desde el punto de vista de la salud pública. Muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a medidas higiénicas inadecuadas en la producción, preparación y conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos que producto de su actividad y haciendo uso de las sustancias nutritivas presentes en éste, lo transforman volviéndolo inaceptable (Andino & Castillo, 2010).

Por ejemplo, *Fusarium* spp. y varios hongos patógenos de la cebada y otros cereales son capaces de producir micotoxinas que sobreviven al proceso de elaboración y pueden detectarse en la cerveza terminada (Kostelanska et al., 2009; Wolf-Hall, 2007). Sin duda alguna, la infección por hongos de la cebada también causa un problema con consecuencias más inmediatas para el consumidor, un evento inusual llamado “el chorro”. Este fenómeno es causado por péptidos de hongos hidrofóbicos (hidrofobinas), que sirven como sitios de nucleación para las burbujas de CO₂ en la cerveza, lo que resulta en la liberación espontánea de gas y la formación de espuma una vez que se abre el empaque (Deckers et al., 2011).

En general, el crecimiento de microbios durante la germinación es perjudicial para la calidad de la malta, y los microbios que residen en la superficie de los granos de cebada pueden competir por el oxígeno con el embrión, lo que resulta en la inhibición del proceso de germinación (Briggs & McGuinness, 1992; Doran & Briggs, 1993) también disminuye el crecimiento de las raicillas y la actividad de la alfa-amilasa (Kelly & Briggs, 1992). Además, “varias bacterias y hongos aislados de la cebada podrían producir cantidades significativas de la hormona vegetal indol-3-acetato in vitro, así como bajas cantidades de ácido giberélico y ácido abscísico, lo que podría afectar la germinación y la producción de enzimas” (Tuomi et al., 1995).

Habitualmente, el crecimiento bacteriano a lo largo del macerado puede tener consecuencias beneficiosas, y la acidificación del macerado por bacterias del ácido láctico puede mejorar la extracción, fermentabilidad y rendimiento de nitrógeno del mosto, la estabilidad de la espuma, el color y el sabor de la cerveza (Lowe et al., 2005). Sin embargo, “el crecimiento de *Clostridium* en el puré o en el mosto puede producir altos niveles de ácido butírico, lo que le da a la cerveza un aroma similar al del queso” (Hawthorne et al., 1991).

Los “spoilers” de mosto más prevalentes son las enterobacterias gramnegativas, especialmente las especies de *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Obesumbacterium* y *Escherichia* (Priest et al., 1974). En el mosto, estas bacterias producen DMS, ácidos orgánicos y 2,3-butanodiol en abundancia, dando a la cerveza un desagradable aroma afrutado o vegetal (Priest et al., 1974; Van Vuuren et al., 1980).

Por su parte, el mosto oxigenado y enfriado se bombea a fermentadores, donde se agregan cepas de *Saccharomyces* para convertir rápidamente el mosto en cerveza a través de la fermentación de maltosa y otros azúcares en etanol y dióxido de carbono. Las condiciones resultantes son hostiles al crecimiento de la mayor parte de los microorganismos: la cerveza tiene un alto contenido de etanol y dióxido de carbono, contiene compuestos antimicrobianos derivados del lúpulo, y tiene un pH, oxígeno y nutrientes residuales bajos. De igual forma, el mosto de malta consiste en oligosacáridos que no son utilizados por *Saccharomyces* y varios cerveceros sienten que contribuyen a la sensación en boca y el sabor de la cerveza, además de favorecer el deterioro microbiano potencial (Bokulich & Bamforth, 2013).

Ahora bien, los LAB son frecuentes en la naturaleza, asociados con materia vegetal (incluida la cebada y la malta) y los seres humanos. Así, su entrada en la cervecería es frecuente e inevitable, y su dispersión generalizada en polvo de malta, aerosoles y equipos es incuestionable. Afortunadamente, se evita que la mayoría de las LAB se desarrollen en la cerveza debido a la actividad antibacteriana de los compuestos derivados del lúpulo. Sin embargo, *L. brevis* y *P. damnosus* probablemente representan la mayor amenaza para la cerveza, siendo los contaminantes más comúnmente reportados de las cervezas terminadas. La mayoría de las especies de LAB muestran altos grados de tolerancia al etanol, pero la tolerancia al etanol se conserva dentro de las especies, y la resistencia al lúpulo juega un papel más predominante al conferir la capacidad de deterioro de la cerveza (Pittet et al., 2011). Por tanto, los LAB implicados en otras fermentaciones de alimentos y bebidas, como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, no se han aislado de la cerveza. También, LAB echa a perder la cerveza a través de la acidificación, la formación de neblina y / o la producción de diacetilo, lo que le da a la cerveza un aroma intenso a mantequilla artificial. Muchas cepas también pueden producir exopolisacáridos (EPS) en la cerveza, dando una consistencia aceitosa o, en casos extremos, la formación de limo (Pittet et al., 2011; Van Oevelen & Verachter, 1979).

Debido a su asociación típica con la fermentación de alimentos, los LAB han adquirido el estado GRAS, es decir, "generalmente se consideran seguros". LAB produce una variedad de sustancias antimicrobianas, que se sabe que inhiben las bacterias patógenas y que deterioran los alimentos. Dichos compuestos antimicrobianos producidos por LAB son responsables de la acción bioconservante en los alimentos e incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y compuestos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Ciertos LAB poseen una

serie de propiedades que los hacen adecuados para su uso en la industria cervecera. La cepa de LAB ideal que se aplicará durante el malteado o la elaboración de cerveza debe mostrar los siguientes atributos: no estropear la cerveza, crecer en mosto sin lúpulo, acidificar el mosto sin lúpulo, ser homofermentativo y producir una gran proporción de ácido L (+) - láctico como producto final metabólico, no produce diacetil, ser un aislado natural de cebada o malta. El cambio microbiológico más significativo que ocurre durante el proceso de malteado es el aumento del recuento de LAB en comparación con los cambios que se producen en los recuentos microbianos de pseudomonas, coliformes y hongos (Douglas & Flannigan, 1988; Flannigan, 1996; O'Sullivan et al., 1999; Petters et al., 1988). Los LAB se han explotado durante siglos en la elaboración de cerveza y fermentaciones de vino. Las cervezas lambic belgas son un gran ejemplo debido a que no utilizan cepas de levadura como únicos agentes fermentadores. La fermentación lambic es espontánea y las especies de LAB que están presentes naturalmente juegan un papel importante en el proceso (Anne Vaughan et al., 2005).

La aplicación del ácido láctico producido por LAB para la acidificación biológica del mosto ofrece muchas ventajas y se ha realizado durante siglos en las fábricas de cerveza donde se observa estrictamente la Ley de Pureza alemana o "Reinheitsgebot". Los objetivos del puré y la acidificación del mosto son niveles de pH definidos en el puré, el mosto y la cerveza resultante que están fuera del alcance del cervecero, sin el uso de alguna fuente adicional de ácido (Lewis, 1998). El pH del macerado o mosto se puede ajustar por medio de la adición de malta ácida al macerado, obteniendo extracto de malta ácida o usando una porción de mosto para fermentación por una cepa LAB, luego se devuelve al mosto restante sin fermentar (Oliver-Daumen, 1988). Además de las mejoras tecnológicas y organolépticas que pueden atribuirse a la acidificación biológica, existen algunos beneficios relacionados con la mejora de la estabilidad biológica. La reducción del pH del mosto sin lúpulo creará un ambiente hostil a muchas bacterias que estropean la cerveza. Una menor competencia de los microorganismos con la levadura de cerveza por los nutrientes puede resultar en fermentaciones más eficientes (Lewis, 1998). En la mayoría de los casos, los lactobacilos moderadamente termófilos, homofermentativos y que no estropean la cerveza, como *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactobacillus amylovorus*, se aplican para bioacidificación a 48°C. Entre los efectos positivos de la bioacidificación se encuentran: extensa vida útil y el característico sabor refrescante de la cerveza Berliner Weisse se han atribuido al ácido láctico producido durante la acidificación biológica y al bajo pH de la cerveza (Rehberg & Berliner, 1969). No obstante, una desventaja de la acidificación biológica es que el mosto debe hervirse durante más tiempo para minimizar los compuestos aromatizantes indeseables como dimetilsulfuro (DMS) y precursores de DMS. Otra desventaja es que la utilización del lúpulo no será tan eficiente y, como consecuencia, se necesitarán más lúpulos para alcanzar los niveles de amargor requeridos en la cerveza. Dichos efectos negativos pueden minimizarse mediante la adición tardía de mosto acidificado durante la ebullición del este (Anne Vaughan et al., 2005).

Con relación a las bacteriocinas, estas son péptidos bioactivos o complejos de péptidos sintetizados ribosómicamente, liberados extracelularmente, que poseen un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras especies (Jack et al., 1995; Nes et al., 1996). En los últimos tiempos, se han aislado cepas productoras de bacteriocina a partir de carne (Schillinger & Lücke, F, 1989), ensilaje y verduras fermentadas (Ohmomo et al., 2001), raíz de ajo y jengibre (Janes et al., 1999), masa ácida (Larsen et al., 1993), vino tinto (Navarro et al., 2000) y materiales y productos de malteado y elaboración de cerveza (Hartnett et al., 2002; O'Mahony et al., 2000; Skyttä et al., 1993; A Vaughan et al., 2001). Las bacteriocinas producidas por LAB suelen inhibir especies que están relacionadas filogenéticamente con la cepa productora (Marciset et al., 1997). Esto es particularmente relevante para la industria cervecera, ya que los LAB causan un gran porcentaje de incidentes de deterioro en los productos cerveceros (Back, 1994b; Hollerová & Kubizniaková, 2001). Es imperativo que los LAB productores de bacteriocina seleccionados para su uso no crezcan en la cerveza ni la echen a perder, y que no posean ninguna característica como tolerancia / resistencia al lúpulo que les permita convertirse en microorganismos de deterioro (Anne Vaughan et al., 2005).

Las bacteriocinas procedentes de LAB se han clasificado previamente en tres clases, de las cuales las clases I y II son las más prevalentes, según su composición, tamaño, modo de acción, mecanismo de exportación y espectro inhibitorio (Eijsink et al., 2002; Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996). Las bacteriocinas de clase I, los lantibióticos, se modifican postraduciblemente e incluyen nisina y lacticina. Las bacteriocinas de clase II son pequeños no lantibióticos termoestables que se subdividen en tres subcategorías. Los miembros de la Clase III se han definido como grandes bacteriocinas proteicas (Eijsink et al., 2002). El modo de acción de las bacteriocinas puede diferir, pero se supone que la mayoría de las bacteriocinas actúan creando poros en la membrana de sus células diana. Esto conduce a la disipación de la fuerza motriz del protón, el agotamiento de ATP y / o la fuga de nutrientes y metabolitos en las células afectadas (Ennahar et al., 2000). Las bacteriocinas varían en especificidad desde un estrecho espectro inhibitorio hasta aquellas como la nisina que tienen una amplia gama de actividad (Jack et al., 1995). Estudios recientes han revelado una variación en el número de diferentes bacteriocinas producidas por cepas individuales de LAB26 y una considerable flexibilidad genética en la organización de los grupos de genes responsables de la producción de bacteriocina (Eijsink et al., 2002). Un locus de bacteriocina típico incluye genes que codifican tres funciones diferentes: actividad de bacteriocina e inmunidad asociada, transporte y procesamiento de bacteriocina y regulación de la producción de bacteriocina (Eijsink et al., 2002; Ennahar et al., 2000; Anne Vaughan et al., 2003).

La síntesis de bacteriocina está relacionada con muchos factores, como la composición de carbohidratos, nitrógeno y fósforo del medio, el pH del medio y la temperatura de fermentación (Guerra & Pastrana, 2003). "El mosto es un medio complejo, rico en azúcares, particularmente

maltosa" (Hough, 1985), y puede favorecer el crecimiento de muchos LAB. Sin embargo, para que se produzcan y liberen algunas bacteriocinas en el mosto, se requiere un estricto control del pH y la suplementación del mosto con fosfatos y extracto de levadura (Nauth & Kraft Food Holdings Inc., 2002). El pH final del caldo de fermentación puede influir tanto en la adsorción de las bacteriocinas a las células productoras como en el procesamiento postraduccional de la prebacteriocina para producir bacteriocina activa (Biswas et al., 1991). La nisina, una bacteriocina lantibiótica de clase I, es la bacteriocina más conocida y caracterizada, y es la única que se utiliza comercialmente. Varios estudios han demostrado que la nisina puede inhibir los microorganismos que deterioran la cerveza sin afectar negativamente a las levaduras cerveceras (K. Ogden, 1986; K. Ogden & Tubb, 1985). La adición de nisina a las fermentaciones no tuvo ningún efecto adverso sobre el sabor de las cervezas (K. Ogden, 1986). Sin embargo, el costo de la adición de nisina a todas las fermentaciones sería bastante caro, pero quizás tenga un papel si se usa como una medida correctiva para tratar fermentaciones contaminadas (B. K. Ogden et al., 1988).

Con referencia a las AAB (bacterias aeróbicas gramnegativas del ácido acético) que incluyen *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans*. Estas bacterias estropean la cerveza por medio de la oxidación del etanol a acetato, transformando efectivamente la cerveza en vinagre. Mientras las concentraciones de oxígeno disuelto disminuyen en las cervezas con la introducción de técnicas modernas, una nueva amenaza reemplazó a aquellos enemigos. Estos nuevos contaminantes fueron los organismos anaeróbicos obligados *Veillonellaceae*, incluidos *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* y *Zymophilus*. La mayor parte de los organismos *Veillonellaceae* se hallan en sedimentos acuáticos o intestinos de mamíferos, pero los mencionados anteriormente se han reportado solo para la cerveza, donde causan deterioro por medio de la formación de turbidez, producción de ácido propiónico, ácido acético, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, e inhibición de levadura y producción de alcohol (Chowdhury et al., 1997).

Del mismo modo, *Zymomonas mobilis* es un inconveniente en las cervezas que contienen azúcares adjuntos. Esta bacteria tiene la capacidad de crecer en condiciones de pH (<3,4) y contenido de etanol (<10% [p / vol]) extremos, estropea la cerveza mediante la producción de acetaldehído y sulfuro de hidrógeno, lo que le da a la cerveza un aroma de huevos podridos. Sin embargo, esta bacteria no puede fermentar maltosa o maltotriosa, los carbohidratos primarios del mosto y la cerveza, por lo que no es un contaminante común en esta bebida (Jespersen & Jakobsen, 1996).

En efecto, cualquier organismo que no haya sido introducido intencionalmente por el cervecero se considera un organismo de deterioro. Por lo tanto, la forma principal de contaminación por levaduras silvestres en la cerveza proviene de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Van der Aa Kühle & Jespersen, 1998). Éstos echan a perder la cerveza a través de la producción de sabores

extraños (POF) de ésteres o compuestos fenólicos, la formación de turbidez o sedimentos, lo cual conduce a la sobrecarbonatación. En *Saccharomyces* y otras levaduras, la POF es causada por la descarboxilación del ácido p-cumárico y el ácido ferúlico a 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol, respectivamente, una propiedad engendrada por el gen POF1 (Meaden & Taylor, 1991). Estos compuestos dan a la cerveza un aroma medicinal o picante inusual a clavo y son atípicos para la mayoría de las cervezas, aunque se consideran un rasgo marcador de las cervezas de trigo alemanas y algunas ales belgas, ya que las levaduras utilizadas en estas cervezas son positivas para POF (Bokulich & Bamforth, 2013).

Las levaduras *Brettanomyces*, incluidas *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces custersii* y *Brettanomyces anomalus*, son contaminantes nefastos de la mayoría de las cervezas y otras bebidas alcohólicas. Estas levaduras estropean la cerveza como consecuencia de la producción de compuestos fenólicos altamente volátiles como 4-etilguayacol y 4-etilfenol, que le brindan el aroma de vendas, sudor y humo. Diversos metabolitos, incluida la producción de acetato en presencia de oxígeno (Aguilar Uscanga et al., 2003), dan como resultado una amplia gama de sabores desagradables producidos por estas levaduras. A pesar de su reputación, *Brettanomyces* es un componente deseado de ciertas cervezas, particularmente la lambic belga y las cervezas de frutas, en las que su actividad β -glicosidasa mejora el aroma de la fruta (Daenen et al., 2008). De la misma forma, un gran número levaduras distintas de *Saccharomyces* son capaces de crecer en la cerveza, pero su potencial de deterioro es limitado en condiciones óptimas de almacenamiento, debido a los factores ambientales hostiles, toxicidad por etanol y competencia con *Saccharomyces* (Bokulich & Bamforth, 2013).

Por otro lado, la contaminación primaria puede venir de las materias primas para la elaboración de cerveza, como la malta, el lúpulo y los complementos (cereales sin maltear utilizados como ingredientes complementarios) tienen su propia microbiota, como se ha demostrado para la malta (O'Sullivan et al., 1999). El agua que se utiliza en una infusión se hierve durante la ebullición del mosto, pero las adiciones posteriores deben ser estériles para impedir la contaminación microbiana. Es fundamental que la levadura de cerveza se manipule con sumo cuidado para evitar la contaminación. Debido a la naturaleza de su contenido y las complejas tuberías, los recipientes de la sala de cocción son fuentes de contaminación microbiana si no se mantienen o limpian adecuadamente. Las materias primas de envasado (botellas, toneles y barriles) pueden estar muy contaminadas con microbios cuando se devuelven del comercio, porque contienen pequeñas cantidades de cerveza en las que el crecimiento microbiano puede haber ocurrido durante un período de tiempo prolongado (Anne Vaughan et al., 2005).

En cuanto a la contaminación secundaria, todos los puntos de contacto con botellas limpias o llenas, pero sin sellar, son probables fuentes de contaminación secundaria. Los microorganismos en el aire pueden contaminar la cerveza en el departamento de llenado a lo largo del transporte

de botellas abiertas desde el lavador de botellas hasta la llenadora y desde la llenadora hasta el punto en que la botella está sellada (Erna Storgårds, 2000). Dicha contaminación es un problema significativo en las cervecerías que no operan con pasteurización en envases (Back, 1997). Se ha observado una relación directa y proporcional entre la humedad del aire y los microorganismos en el aire, lo que confirma que una humedad relativa alta conduce a un mayor número de microorganismos en el aire (Henriksson & Haikara, 1991; Oriet & Pfenninger, 1998). La contaminación persistente en la sala de llenado puede resultar del crecimiento secuencial de microorganismos diferentes pero interdependientes que se adhieren a las superficies en forma de biopelículas (Back, 1994a; E. Storgårds, 1997; Erna Storgårds, 2000).

Estas biopelículas consisten en consorcios complejos de microorganismos que proporcionan entornos específicos para comunidades microbianas adicionales. Inicialmente, las bacterias del ácido acético y las enterobacterias proliferan en lugares donde se acumulan los residuos de los productos intermedios del proceso, la cerveza u otros productos. Estas bacterias por sí mismas pueden no ser particularmente dañinas en el producto terminado, pero debido a que forman lodo protegen a los microorganismos acompañantes de la deshidratación y destrucción por desinfectantes. Si los residuos del producto no se alteran durante períodos de tiempo más prolongados, las levaduras comienzan a crecer junto con las bacterias del ácido acético. Las levaduras, a su vez, pueden producir metabolitos que crean un ambiente adecuado para el crecimiento de LAB, mientras que el ácido láctico producido por dicho LAB puede ser metabolizado a ácido propiónico por especies anaeróbicas como *Pectinatus* spp. (International, 1997). La proliferación de estas poblaciones microbianas en las proximidades de botellas sin sellar aumenta significativamente el riesgo de contaminación secundaria (Anne Vaughan et al., 2005).

3.3 Ocratoxina A (OTA)

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas producidas principalmente por cepas de algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. La ocratoxina A (OTA) se informó por primera vez en Sudáfrica como un metabolito secundario producido por una cepa de *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965). “La OTA es nefrotóxica, hepatotóxica, genotóxica, teratogénica e inmunotóxica para los animales y su carcinogenicidad en ratas y ratones machos está bien establecida” (Castegnaro et al., 1998; Pfohl-Leszkowicz et al., 1998). Asimismo, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó a la OTA como posible carcinógeno para los seres humanos (grupo 2B) (IARC, 1993).

La OTA se transporta con los productos contaminados, principalmente cebada para malta, pero quizás también con los adjuntos, a las cervecerías. Los procesos de elaboración varían de una industria a otra, pero la forma en que la toxina se transfiere a la cerveza es básicamente la misma. La OTA es estable al proceso de ebullición. Después de la maceración, se recupera algo de OTA

en los granos gastados, pero el mosto contiene OTA. Después de la fermentación, las levaduras retienen parte del contenido original de OTA y el resto se transmite a la cerveza (Scott, 1996). En la actualidad, las encuestas realizadas en varios países han demostrado que la OTA es un contaminante habitual de la cerveza debido a la presencia de cepas ocratoxigénicas de *Penicillium verrucosum* o *A. ochraceus* en los cereales (Mateo et al., 2007).

CAPÍTULO IV

4.1 Importancia de los compuestos azufrados presentes en cerveza

La formación de los compuestos aromatizantes son el resultado de muchas interacciones entre los componentes de la materia prima (malta y lúpulo) y el metabolismo de la levadura. Aparte de la concentración de compuestos volátiles, su estabilidad también es de gran importancia para el sabor final de la cerveza. Las interacciones con oxígeno o diferentes productos químicos (detergentes, ácidos, metales pesados) y contaminantes microbianos tienen la posibilidad de desestabilizar los volátiles en la cerveza y generar sabores desagradables altamente repulsivos para el consumidor. Además del oxígeno, la luz ultravioleta, el tiempo de almacenamiento y las variaciones de temperatura también pueden contribuir al deterioro de ciertos compuestos y desarrollar los malos sabores de la cerveza (Pavlečić et al., 2012).

El sabor de la cerveza embotellada cambia con el tiempo de almacenamiento. El envejecimiento de la cerveza se considera un problema de calidad importante, gracias a los sabores de envejecimiento que se desarrollan describiéndose principalmente como desagradables. Además, el tipo de evolución del sabor durante el almacenamiento es incontrolable, lo cual dificulta que los cerveceros aseguren una calidad constante del producto o satisfagan las expectativas de los consumidores con respecto al sabor (Stephenson & Bamforth, 2002). En los últimos 30 años, solo unos pocos informes han manejado cambios sensoriales en la cerveza durante el almacenamiento, sin embargo, los avances en los equipos y métodos analíticos han revelado el aumento de varios compuestos y ahora es notable que numerosas reacciones químicas ocurren simultáneamente como la oxidación de ácidos grasos y alcoholes superiores, reacciones de Maillard, degradación de Strecker, condensación aldólica, formación de éter furánico, degradación de ácidos amargos de lúpulo y ésteres de acetato, oxidación de terpenoides, hidrólisis de glucósidos y síntesis de ésteres volátiles y trisulfuro de dimetilo, entre otras (Vanderhaegen et al., 2006).

Evidentemente, el pH parece ser un factor clave que influye en el envejecimiento de la cerveza. Optimizar este parámetro es una tarea bastante difícil para la industria debido a su impacto en cada paso del proceso de elaboración (C. W Bamforth, 2001). Se sabe que un pH menor mejora diversas actividades de las enzimas de la malta durante el macerado, para aumentar la tasa de bioconversión del acetolactato en diacetilo y para limitar la producción de sulfuro de dimetilo durante la fermentación. Por otro lado, aumentar el pH del mosto hirviendo promueve una mejor utilización del lúpulo y una clarificación más eficiente. Un pH más alto al final de la fermentación también favorece la producción de ésteres (García et al., 1994) y la floculación de la levadura. Igualmente, se sabe que la acidez mejora la resistencia al deterioro microbiano debido a que la actividad antimicrobiana de los compuestos amargos del lúpulo necesita un pH bajo (Dickenson, 1983). Con respecto a las propiedades organolépticas de la cerveza, un pH más

alto parece aumentar la suavidad del paladar (C. W Bamforth, 2001). Además, cuando el pH es <4 , las cervezas se tornan más amargas. A pH $<3,7$, hay un sabor posterior metálico en el paladar, mientras que especialmente cuando el pH es $>4,4$, se reportan notas jabonosas y cáusticas. Por lo contrario, un pH más alto conduce a un recubrimiento de la boca y el sabor a “galleta” o “tostado” (D. G. Taylor, 1990).

En cuanto a la formación de algunos compuestos como DMS, las levaduras *Saccharomyces* poseen una actividad enzimática dependiente de NADPH que reduce el DMSO a DMS (B. B. J. Anness et al., 1979; B. J. Anness, 1980; Zinder & Brock, 1978). En un estudio se aísla metionina sulfóxido (MetSO) reductasa de levadura (Black et al., 1960; Porqué et al., 1970) y puede ser responsable de la actividad de la DMSO reductasa (B. B. J. Anness et al., 1979; B. J. Anness, 1980; C. W Bamforth & Anness, 1981). Esta enzima tiene una mayor afinidad por MetSO que por DMSO (C. W Bamforth & Anness, 1979, 1981) y MetSO inhibe la reducción de DMSO (B. B. J. Anness et al., 1979; B. J. Anness, 1980; C. W Bamforth & Anness, 1981). Por lo tanto, el grado de formación de MetSO durante el proceso de preparación del mosto influye en el grado de reducción de DMSO (Hansen, 1999b).

También, el contenido de nitrógeno del medio de crecimiento afecta la formación de DMS. Los altos niveles de nitrógeno de fácil asimilación mantienen la actividad de la DMSO reductasa a un nivel reducido, mientras que la actividad enzimática aumenta en condiciones de limitación de nitrógeno (Gibson & Large, 1985). El elevado contenido de nitrógeno de la mayor parte de los mostos debería mantener la reducción de DMSO en el nivel basal durante la fermentación (Hansen, 1999b).

Existen varias incertidumbres que podrían impedir distinguir con claridad los orígenes del DMS en la cerveza y la mejor forma de controlar su concentración. Estos son: el número e identidad de las fuentes de DMS en la malta; cómo se comportan estas fuentes en la producción de mosto; y qué controla el DMS formado en el mosto. Además, es particularmente importante aclarar cómo y en qué medida se puede formar DMS durante la fermentación. Finalmente, aún no es posible definir las medidas que deben tomar las malterías y las cervecerías para controlar la aparición de DMS en la cerveza. Estas medidas pueden involucrar: elección de materias primas (variedades de cebada), condiciones de germinación, condiciones de horneado, procedimiento brewhouse, condiciones de fermentación, elección de la cepa de levadura, otros tratamientos de cerveza (Dickenson, 1983).

Por otra parte, se sabe que el 3-metil-2buteno-1tiol (MBT), compuesto formado por la exposición a la luz, le confiere sabores desagradables a la cerveza es por esto que aparte del consumo inmediato o el almacenamiento de la cerveza en envases a prueba de luz (vidrio oscuro o latas), la fotosensibilidad puede evitarse mediante la reducción de los isoácidos, por lo que se prohíbe el proceso fotoquímico deletéreo (Burns et al., 2001). Asimismo, los antioxidantes, en particular

los que reaccionan con los radicales libres, también se pueden utilizar para controlar el desarrollo de este compuesto en la cerveza. Los constituyentes que poseen los enlaces 1,8 éter, como el 1,8-cineol, reducen la sensibilidad de esta bebida a la luz (Palamand, 1983). La fuente del átomo de azufre en MBT aún no se ha identificado claramente. Los experimentos en los que la cerveza se dializa contra agua en membranas de celofán indican que las moléculas donantes son de alto y bajo peso molecular, por lo que las proteínas, los polipéptidos y los aminoácidos libres pueden participar en la reacción del deslumbramiento hasta cierto punto (Kuroiwa et al., 1963). Este problema se puede minimizar protegiendo la cerveza de la luz ultravioleta (UV) de onda larga o mediante el uso de un producto de lúpulo estable a la luz (Drost et al., 1990).

Últimamente, se han desarrollado extractos de lúpulo especializados (producidos utilizando CO₂ líquido o etanol como disolvente) para combatir esta sensibilidad a la luz (Wilson et al., 2001). En esencia, los pares de átomos de hidrógeno se añaden catalíticamente a los ácidos iso- α isomerizados. Hay tres tipos principales de extractos de este tipo (llamados extractos reducidos) actualmente disponibles en el mercado: ácidos Rho iso- α , ácidos tetrahydro-iso- α y ácidos hexahydro-iso- α . Todos estos materiales son amargos en diversos grados, algunos mejoran la adherencia de la espuma de cerveza y estabilidad y protege la cerveza contra los sabores “skunk” inducidos por el sol. Normalmente, todos estos materiales se utilizan como una adición posterior a la fermentación para lograr el beneficio máximo y la utilización óptima. Es así que para alcanzar una protección completa contra golpes de luz, no se puede utilizar ningún isoácido en ninguna otra parte del proceso (G G Stewart, 2016).

Por otra parte, se sabe que en el momento en que la cerveza sale de la fábrica, está fuera del control de los cerveceros y está sujeta a las condiciones que los distribuidores, minoristas y consumidores le imponen. El paquete puede estar expuesto a fluctuaciones de temperatura, luz y / o turbulencia, todo lo cual degrada la calidad del producto interno y promueve el crecimiento microbiano. Incluso en condiciones de almacenamiento óptimas, un volumen significativo de cerveza puede pasar varios meses en el envío y almacenamiento antes de su consumo, lo que aumenta la probabilidad de deterioro microbiano, dada la escala y la distancia de la distribución mundial de cerveza contemporánea. Hace mucho tiempo que la industria abordó este problema mediante la estabilización del producto con ayuda de procesos tales como la filtración, pasteurización o la combinación de los mismos. Sin embargo, la creciente demanda de cervezas no pasteurizadas en los últimos años ha aumentado la incidencia de contaminación microbiana en la cerveza envasada por microbios como *Pectinatus* (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Además, la mejor manera para prevenir el deterioro microbiano de la cerveza es controlar el acceso de contaminantes a los materiales dentro de la cervecería (Hammond et al., 1999). Sin embargo, el proceso de elaboración de la cerveza no es aséptico y no es posible la eliminación completa de los microorganismos de descomposición de todos los materiales de elaboración. Se

pueden adoptar varias estrategias para minimizar el riesgo de contaminación de los mostos y cervezas. El primer paso para controlar la microbiota en la cervecería es obtener materias primas que porten bajos niveles de carga microbiana o que sean inofensivas. Después de esto, las materias primas se deben procesar con ayuda de métodos como la filtración de cerveza, el uso de temperaturas elevadas durante la maceración, el hervido del mosto, la pasteurización de la cerveza, el almacenamiento de levadura y cerveza a bajas temperaturas (Anne Vaughan et al., 2005).

De la misma forma, “las instalaciones de producción y envasado de cerveza deben estar diseñadas higiénicamente para eliminar los problemas de contaminación que puedan surgir en equipos como tanques, tuberías, juntas y accesorios” (Erna Storgårds, 2000). Una elección adecuada de equipos y materiales, y la eliminación o minimización de espacios muertos y superficies rugosas, la construcción correcta, la distribución del proceso y la automatización es crucial para minimizar los riesgos de contaminación (Holah, 1992; Kumar & Anand, 1998; Mattila-Sandholm & Wirtanen, 2009). Además, la llenadora puede resultar como un punto crítico, especialmente en la operación de envasado aséptico, donde puede ocurrir la contaminación del producto, por lo que es crucial mantener altos estándares de higiene. La importancia de los procedimientos de limpieza y desinfección para las pequeñas y grandes cervecías se ha incrementado significativamente debido a la vulnerabilidad microbiológica de ciertos productos como las cervezas no pasteurizadas y las cervezas bajas en alcohol y amargor (Kretsch, 1994).

Igualmente, uno de los aspectos más importantes en la producción de esta bebida es mantener en óptimas condiciones todos los equipos que entran en contacto con la cerveza o sus precursores mediante la limpieza regular con detergentes aprobados, no solo dentro de la cervecería, sino también en el punto de dispensación en el caso de cerveza de barril (Buggey et al., 2002; Cords & Watson, 1998). Se propone que, al explotar las actividades antimicrobianas de los componentes de la cerveza, como el dióxido de carbono disuelto y los compuestos fenólicos, se podría reducir la susceptibilidad de la cerveza al deterioro y así minimizar los efectos de la contaminación casual. Con la actitud de rechazo actual de los consumidores hacia la conservación química de los alimentos y las regulaciones más estrictas con respecto a su uso, la explotación de componentes inhibidores de origen natural ofrece un medio alternativo y atractivo para mejorar la estabilidad microbiológica de la cerveza (Hammond et al., 1999).

A pesar de que hay muchos factores que influyen en la estabilidad del sabor de la cerveza, el nivel de oxígeno en el paquete final es de suma importancia. Es fundamental que este nivel en la cerveza, inmediatamente antes del envasado, sea lo más bajo posible (menos de 100 mg/L) y que la acumulación de oxígeno durante el llenado sea mínima. Los efectos adversos de la oxidación en el sabor de la cerveza terminada se conocen desde hace mucho tiempo y algunos cerveceros agregan bisulfitos u otros antioxidantes, como el ácido ascórbico, antes del envasado

lo que contribuye a mejorar la estabilidad del sabor. La eficacia del bisulfito, además de sus propiedades antioxidantes y su actividad antimicrobiana, es también su capacidad para unir compuestos de carbonilo (muchos con sabores no deseados) en compuestos de sabor neutro (Barker et al., 1983), la reacción es reversible y el exceso de bisulfito aumentará los rendimientos (G G Stewart, 2016).

Asimismo, la adición de bisulfito a la cerveza fresca minimiza el aumento de la concentración de aldehído libre durante el envejecimiento. Por otro lado, cuando se agrega a la cerveza rancia, el bisulfito reduce la concentración de aldehídos libres y afecta la eliminación del sabor a cartón. Sin embargo, con el tiempo, el bisulfito se oxida a sulfato, aumentando así la concentración de aldehídos libres nuevamente y restaurando el carácter de sabor rancio de la cerveza (Barker et al., 1983).

En cuanto a la contribución del sulfito a la estabilización de la cerveza, se han propuesto dos mecanismos principales: primero, el sulfito inhibe la oxidación de la cerveza durante el almacenamiento, actuando como antioxidante. El segundo mecanismo es la acción de enmascaramiento del sulfito para envejecer el sabor (Narziss et al., 1993). Adicionalmente se demostró que el sulfito inhibe la producción de oxígeno activo y el progreso de las reacciones de radicales libres en la cerveza, lo que conduce a la estabilidad del sabor en la cerveza (H. Kaneda et al., 1991). Sin embargo, el sulfito producido por la levadura durante la fermentación del mosto se combina con varios carbonilos para producir aductos de sulfito en la cerveza y el sulfito pierde su poder estabilizador al formar los dichos constituyentes (Chapon et al., 1981). Además, el sulfito tiene la capacidad de combinarse fácilmente con los componentes de la cerveza, especialmente el acetaldehído, y forma aductos de bisulfito estables (Brenner & Stern, 1970; Delcour et al., 1982; Nordiov, 1985). También, se sabe que el equilibrio de acetaldehído se alcanza rápidamente y se obtiene una conversión casi completa incluso en ausencia de bisulfito en exceso (Fieser & Fieser, 1952).

Por lo tanto, cada tipo diferente de cerveza envejece de una manera típica, determinada por las materias primas, los parámetros de producción, las técnicas de envasado y las condiciones de almacenamiento. Es así que un agente de envejecimiento importante es el oxígeno, que está presente en niveles bajos en las botellas de cerveza. Aunque los equipos modernos no permiten más de 20 a 50 ppb (g/l) de oxígeno en la cerveza embotellada, es imposible tener el espacio libre de oxígeno (De Schutter et al., 2009).

Ahora está claro que la estabilidad del sabor está influenciada por todas las etapas del proceso de elaboración de la cerveza (Narziss, 1986): conservación de las sustancias reductoras minimizando la captación de oxígeno durante la maceración, la filtración (Dalgliesh, 1977) y la ebullición del mosto, eliminación de sustancias propensas a reaccionar con compuestos aromatizantes como los carbonilos mediante buenos procedimientos de maceración y separación

del mosto, prevención de la acumulación de iones, como hierro y cobre (Irwin et al., 1991); y exposición controlada del mosto al calor para limitar la formación de productos de reacción de Maillard (Collin et al., 1991) y sustancias relacionadas (Graham G Stewart, 2004).

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES:

Después de revisar los artículos de Scarlata & Ebeler, 1999; Holsscher, 1992; Anness & Bamforth, 1982; Stratford & Rose, 1986; Landaud y colaboradores, 2007; Gijs & Collin, 2003; H. Li y colaboradores, 2008; Yonezawa & Fushiki, 2002 se puede afirmar que los aromas indeseables en la cerveza se originan principalmente por la presencia de los siguientes compuestos: sulfuro de dimetilo, 3-metil-2-buteno-1-tiol, dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno, trisulfuro de dimetilo, metional, etanotiol y dietil sulfuro. Generalmente cuando sus concentraciones son mayores a 100 µg/L, 2,5 µg/L, 25ppm, 10 ppb, 0.8 µg/L, 40 ppb, 1.2 µg/L, 3ppb respectivamente, lo que caracteriza a ciertas cervezas debido al impacto sensorial que estos compuestos le otorgan a esta bebida, siendo responsables de la aceptación o rechazo por parte de los consumidores.

Durante el proceso fermentativo de la cerveza se originan una gran cantidad de compuestos entre los que se encuentran el dióxido de azufre y los sulfitos. Stratford & Rose, 1986 afirman que el primero es esencial para la estabilidad del sabor de la cerveza, debido a que actúa como antioxidante, protegiéndola de los radicales libres, sin embargo, se ha visto que en cantidades excesivas puede provocar un sabor indeseable o al mismo tiempo, puede resultar un peligro para la salud de los consumidores. Por otro lado, los sulfitos como el sulfuro de hidrógeno, son compuestos que se encuentran comúnmente en las cervezas tipo lager como lo afirma Landaud y colaboradores, 2007, además, puede ser el responsable del olor indeseable a huevo podrido por lo que es necesario controlar la concentración de estos compuestos en la cerveza.

En cuanto al 3-metil-2-buteno-1-tiol (MBT) que le imparte a la cerveza un sabor desagradable descrito como zorrillo o sabor a luz, se origina en esta bebida por exposición a la luz ultravioleta visible como lo indica Buiatti, 2009. El umbral de sabor de este compuesto es muy bajo, es decir, que en concentraciones mínimas es capaz de estropear irreversiblemente la calidad de esta bebida. Es por esto que se ha demostrado por parte de Burns y colaboradores, 2001 que aparte del consumo inmediato o el almacenamiento de la cerveza en envases a prueba de luz, la fotosensibilidad puede evitarse mediante la reducción de los isoácidos.

También se generan compuestos de sabor activo que son relevantes en lo que respecta a la calidad de la cerveza, aquí se puede mencionar al dimetil sulfuro o DMS que es un tioéter y es uno de los compuestos más abundantes en la cerveza. Scarlata & Ebeler, 1999 mencionan que este compuesto en niveles bajos contribuye a la plenitud del paladar y al aroma en general de la cerveza. No obstante, en concentraciones altas, tiene un fuerte olor desagradable y otorga un olor a vegetales cocidos y principalmente un sabor descrito como maíz dulce. Otro de los compuestos es el trisulfuro de dimetilo (DMTS) el cual es un sabor clave en muchos alimentos incluida la cerveza. Landaud y colaboradores, 2007 también afirmaron que es un compuesto de gran importancia debido a que su umbral de detección es bastante bajo y le imparte a la cerveza

un olor característico a cebolla fresca. Con respecto al etanotiol, Li y colaboradores, 2008 y Rauhut, 1993, han afirmado que por encima de su umbral atribuye a la cerveza un sabor a huevo podrido y un aroma a cebolla lo que le hace perjudicial para la calidad de esta bebida. Por otro lado, el metional cuando está presente por encima de su nivel umbral se caracteriza debido a que proporciona un aroma a coliflor y repollo así lo indican Mestres y colaboradores, 2000.

Después de revisar todos los métodos y técnicas se puede decir que los compuestos tales como dióxido de azufre total y libre ya sea en mosto o en la cerveza, los sulfitos, el sulfuro de hidrógeno y los compuestos volátiles azufrados se pueden determinar mediante el uso de espectrometría de inyección de flujo combinada con la técnica de difusión de gas, también con cromatografía de exclusión iónica, cromatografía de gases con detección de ionización de llama (FID), cromatografía con espacio de cabeza, cromatografía de gases por olfatometría, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de gases, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, nariz electrónica basada en el acoplamiento del espacio de cabeza con espectrómetro de masas, microextracción de fase sólida combinada con cromatografía de gases y detección por quimioluminiscencia. Por otro lado, con los métodos potenciométricos se analizan dióxido de azufre y sulfitos presentes en la cerveza.

Estos métodos y técnicas se han desarrollado dentro de la industria cervecera para la determinación y cuantificación de los compuestos volátiles azufrados siendo una herramienta útil para asegurar la calidad de esta bebida. Con respecto a las cromatografías, se puede ver que se usan ampliamente en este campo gracias a su gran capacidad de resolver muestras complejas como es el caso de la cerveza. Asimismo, permite la identificación de los compuestos, los resultados que proporciona son confiables, son técnicas sensibles y poseen una gran capacidad de separación, son técnicas donde hay una fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, son fácil automatización, además son ideales para la identificación de los analitos que se encuentran en bajas concentraciones. Entre las desventajas de las cromatografías se puede encontrar que en algunos casos se puede requerir un pretratamiento o la destrucción de la muestra, pueden requerir volúmenes relativamente grandes de solvente, algunos equipos pueden ser bastante complejos y caros.

Por otra parte, los métodos potenciométricos como la voltamperometría se caracterizan por ser bastante específico, permite la identificación de un gran número de cationes y aniones, los instrumentos a utilizar son de bajo precio, sensibles, selectivos y es versátil, por otra parte, también puede presentar inconvenientes como requerir correcciones por interferencias y tiempo relativamente largo para realizar los estudios.

Es por todo esto que el análisis y cuantificación de los compuestos volátiles azufrados es de gran interés en la industria cervecera debido a que sus bajos umbrales de sabor pueden conferir sabores y aromas desagradables en esta bebida, sin embargo, en cantidades por debajo del

umbral de sabor, estos compuestos son esenciales para desarrollar el sabor característico de cada tipo de cerveza. Asimismo, con el pasar de los años se vuelve cada vez más relevante determinar la presencia y cantidad de estos constituyentes de sabor por lo que la combinación de los métodos y técnicas ya existentes o el desarrollo de un método rápido, preciso y sensible sería de gran utilidad y provecho para esta tecnología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aguilar Uscanga, M. G., Délia, M.-L., & Strehaiano, P. (2003). Brettanomyces bruxellensis: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 157–162. doi: 10.1007/s00253-002-1197-z
- Allen, C., & Parks, O. W. (1975). Evidence for Methional in Skim Milk Exposed to Sunlight. *Journal of Dairy Science*, 58(11), 1609–1611. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(75)84758-8
- Andino, F., & Castillo, Y. (2010). *Curso Microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria* (pp. 1–63). Universidad Nacional de Ingeniería (UNI).
- Angelino, S. A. G. F. (1991). *Volatile Compounds in Foods and Beverages* (Marcel Dek, Vol. 46). Beer. In H. Marse. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=_OvXjhLUz-oC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Volatiles+compounds+in+foods+and+beverages&ots=fAmFaysoAI&sig=IR9PJcYZ7nGig1R7-ENOIhRW7D0#v=onepage&q=Volatiles compounds in foods and beverages&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=_OvXjhLUz-oC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Volatiles+compounds+in+foods+and+beverages&ots=fAmFaysoAI&sig=IR9PJcYZ7nGig1R7-ENOIhRW7D0#v=onepage&q=Volatiles+compounds+in+foods+and+beverages&f=false)
- Anness, B. B. J., Bamforth, C. W., & Wainwright, T. (1979). THE MEASUREMENT OF DIMETHYL SULPHOXIDE IN BARLEY AND MALT AND ITS REDUCTION TO DIMETHYL SULPHIDE BY YEAST. *Journal of the Institute of Brewing*, 85, 346–349.
- Anness, B. J. (1980). The reduction of dimethyl sulphoxide to dimethyl sulphide during fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 86, 134–137.
- Anness, B. J., & Bamforth, C. W. (1982). Dimethyl sulphide—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 88, 244–252.
- Arctander, S. (1969). *Perfume and Flavor Chemicals. Published by the Author.*
- Association of Official Analytical Chemists. (1977). *Food Composition Additives; Natural Contaminants, Chapter 27, Malt Beverages and Brewing Materials*. (17th ed.). The Association.
- Atanassov, G. T., Lima, R. C., Mesquita, R. B. R., Rangel, A. O. S. S., & Tóth, I. V. (2000). *Spectrophotometric determination of carbon dioxide and sulphur dioxide in wines by flow injection*. 77–82.
- Back, W. (1994a). Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt International*, 4, 326–333.
- Back, W. (1994b). Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt International*, 4, 326–333.

- Back, W. (1997). Technical and technological prerequisites for 'cold sterile' bottling. *Brauwelt International*, 15, 192–201.
- Ballance, P. E. (1961). PRODUCTION OF VOLATILE COMPOUNDS RELATED TO THE FLAVOUR OF FOODS FROM THE STRECKER DEGRADATION OF DL-METHIONINE. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 532–536.
- Bamforth, C. W. (2001). pH in Brewing: An Overview. *MBAA Tech. Q.*, 38, 1–9.
- Bamforth, C. W, & Anness, B. J. (1981). THE ROLE OF DIMETHYL SULPHOXIDE REDUCTASE IN THE FORMATION OF DIMETHYL SULPHIDE DURING FERMENTATIONS. *Journal of the Institute of Brewing*, 87, 30–34.
- Bamforth, Charles W. (2000). *Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology*. 4171(00), 102–112.
- Barker, R. L., Gracey, D. E. F., Irwin, A. J., Pipasts, P., & Leiska, E. (1983). Liberation of staling aldehydes during storage of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 89, 411–415.
- Baxter, E. Denise. (1982). Lipoxidases in Malting and Mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, 88(6), 390–396. doi: 10.1002/j.2050-0416.1982.tb04130.x
- Baxter, E.D., & Hughes, P. S. (2001). Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspect. In *The Royal Society of Chemistry*. (Vol. 14).
- Baxter, P. Sh. E. D. (2001). *Beer: Quality, safety and nutritional aspects*. RSC Paperbacks. http://ubblab.weebly.com/uploads/4/7/4/6/47469791/beer_quality_safety_and_nutritional_aspects.pdf
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., & Sgorbini, B. (2004). Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices. *Journal Of Chromatography A*, 1024, 217–226. doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.009
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991). Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1265–1267.
- Black, S., Harte, E. M., Hudson, B., & Wartofsky, L. (1960). A specific Enzymatic Reduction of L(-)Methionine Sulfoxide and a Related Nonspecific Reduction of Disulfides. *Journal of Biological Chemistry*, 235(10).
- Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. doi: 10.1128/MMBR.00060-12

- Brenner, M. W., & Stern, H. (1970). Dissolved oxygen and antioxidants. *Technical Quarterly-the Master Brewer Association of Americas*, 150–157.
- Briggs, D. E., & McGuinness, G. (1992). Microbes on Barley Grains. *Journal of the Institute of Brewing*, 98, 249–255.
- Buggey, L. A., Bennett, S. J. E., & Pain, M. (2002). Beer quality at the point of sale – a trouble-shooting guide. *The Brewer Int.*, 2, 15–19.
- Buiatti, S. (2009). Beer Composition: An Overview. *Beer in Health and Disease Prevention*, 213–225.
- Burmeister, M. S., Drummond, C. J., Pfisterer, E. A., Hysert, D. W., Sin, Y. O., Sime, K. J., & Hawthorne, D. B. (1992). Measurement of Volatile Sulfur Compounds in Beer Using Gas Chromatography with a Sulfur Chemiluminescence Detector. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 50(2), 53–58. doi: 10.1094/ASBCJ-50-0053
- Burns, C. ., Heyerick, A., De Keukeleire, D., & Forbes, M. D. E. (2001). Mechanism for Formation of the Lightstruck Flavor in Beer Revealed by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance. *Chemistry -A European Journal*, 7(21), 4553–4561.
- Caldeira, M., Rodrigues, F., Perestrelo, R., Marques, J. C., & Camara, J. S. (2007). Comparison of two extraction methods for evaluation of volatile constituents patterns in commercial whiskeys Elucidation of the main odour-active compounds. *Talanta*, 74, 78–90. doi: 10.1016/j.talanta.2007.05.029
- Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl - Leszkowicz, A., Estéve, J., Steinmann, J., Tillmann, T., Michelon, J., & Bartsch, H. (1998). SEX- AND STRAIN-SPECIFIC INDUCTION OF RENAL TUMORS BY OCHRATOXIN A IN RATS CORRELATES WITH DNA ADDUCTION. *International Journal of Cancer*, 77, 70–75.
- Castro, L. F., Ross, C. F., & Vixie, K. R. (2015). Optimization of a Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) Method for Beer Volatile Profiling. *Food Analytical Methods*, 2115–2124. doi: 10.1007/s12161-015-0104-z
- Chan, F., & Reineccius, G. A. (1994). Kinetics of the Formation of Methional , Dimethyl Disulfide , and 2-Acetylthiophene via the Maillard Reaction. *Sulfur Compounds in Foods*, 127–137.
- Chapon, L., Chapon, S., & Djeuga, N. (1981). Free sate in beers-Kinetic studies. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 40, 31–39.
- Charalambous, G. (1975). *Phenolic, Sulfur, and Nitrogen Compounds in Food Flavors*.
- Charry-Parra, G., DeJesus-Echevarria, M., & Perez, F. J. (2011). Beer Volatile Analysis:

- Optimization of HS/SPME Coupled to GC/MS/FID. *Journal of Food Science*, 76(2), 205–211. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01979.x
- Cherest, H., Talbot, G., & Robichon-Szulmajster, H. (1970). Role of homocysteine synthetase in an alternate route for methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 102(2), 448–461. doi: 10.1128/jb.102.2.448-461.1970
- Chowdhury, I., Watier, D., Leguerinel, I., & Hornez, J. (1997). Effect of *Pectinatus cerevisiiphilus* on *Saccharomyces cerevisiae* concerning its growth and alcohol production in wort medium. *Food Microbiology*, 14, 265–272.
- Clapperton, J. F., Dalglish, C. E., Meilgaard, M. C. (1976). PROGRESS TOWARDS AN INTERNATIONAL SYSTEM OF BEER FLAVOUR TERMINOLOGY Submitted on behalf of the E . B . C . Flavour Terminology Working Group , and the Joint Working Party of the A . S . B . C . and the I n an attempt to bring order into the existing chaos. *Journal of the Institute of of Brewing*, 82, 7–13.
- Collin, S., Montesinos, M., Meersinan, E., Swinkels, W., & Dufour, J.-P. (1991). *Proceedings of the European Brewing Convention* (pp. 409–416). 23rd Congress.
- Cords, B., & Watson, J. (1998). Single phase cleaning from brewhouse to bright beer tank. In *Proceedings of the Institute of Brewing Convention* (pp. 139–142).
- Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2008). Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research*. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00421.x
- Dalglish, C. G. (1977). *Proceedings of the European Brewing Convention* (pp. 623–659.). 16th Congress.
- De Schutter, D. P., Saison, D., Delvaux, F., Derdelinckx, G., & Delvaux, F. R. (2009). The Chemistry of Aging Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*, 375–388.
- Deckers, S. M., Lorgouilloux, Y., Gebruers, K., Baggerman, G., Verachtert, H., Neven, H., Michiels, C., Derdelinckx, G., & Delcour, J. A. (2011). Dynamic Light Scattering (DLS) as a Tool to Detect CO₂-Hydrophobin Structures and Study the Primary Gushing Potential of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 144–149.
- Decnop-Weever, L. G., & Kraak, J. C. (1997). Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection. *Analytica Chimica Acta*, 337, 125–131.

- Delcour, J. A., Caers, J. M., Dondeyne, P., & Delvaux, F. (1982). AN ENZYMATIC ASSAY FOR THE DETERMINATION OF ACETALDEHYDE IN BEERS. *Journal of the Institute of Brewing*, 88, 384–386.
- Dickenson, C. J. (1983). CAMBRIDGE PRIZE LECTURE DIMETHYL SULPHIDE — ITS ORIGIN AND CONTROL IN BREWING. *Journal of the Institute of Brewing*, 89, 41–46.
- Doran, P. J., & Briggs, D. E. (1993). Microbes and grain germination. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 165–170.
- Douglas, P. E., & Flannigan, B. (1988). A microbiological evaluation of barley malt production. *Journal of the Institute of Brewing*, 94(2), 85–88.
- Drost, B. W., Van Den Berg, R., Freijee, F. J. M., Van Der Velde, E. G., & Hollemans, M. (1990). Flavor Stability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(4), 124–131. doi: 10.1094/ASBCJ-48-0124
- Duan, W., Roddick, F. A., Higgins, V. J., Rogers, P. J., Duan, W., Roddick, F. A., Higgins, V. J., Rogers, P. J., Duan, W., Roddick, F. A., Engineering, C., Higgins, V. J., Ramaciotti, V., Genomics, F., Sciences, B., South, N., & Rogers, P. J. (2018). *The Science of Beer A Parallel Analysis of H₂S and SO₂ Formation by Brewing Yeast in Response to Sulfur-Containing Amino Acids and Ammonium Ions A Parallel Analysis of H₂S and SO₂ Formation by Brewing Yeast in Response to Sulfur-Containing Amino Aci.* 0470.
- Dufour, J., Leus, M., Baxter, A. J., Hayman, A. R., Leus, M., Baxter, A. J., Hayman, A. R., Dufour, J., Leus, M., Baxter, A. J., & Science, F. (2018). Characterization of the Reaction of Bisulfite with Unsaturated Aldehydes in a Beer Model System Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 137–144.
- Dvořák, J., Dostálek, P., Štěřba, K., Čejka, P., Kellner, V., & Beinrohr, E. (2006). Determination of Total Sulphur Dioxide in Beer Samples by Flow-Through Chronopotentiometry. *Journal of the Institute of Brewing*, 308–313.
- Eijsink, V. G. H., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., & Nes, I. F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 639–654.
- Engel, W., Bahr, W., & Schieberle, P. (1999). Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology*, 237–241.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins:

- biosynthesis , structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 84–106.
- Evans, T. J., Butzke, C. E., & Ebeler, S. E. (1997). Analysis of 2, 4, 6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, 786, 293–298.
- Eyres, G., Marriott, P. J., & Dufour, J. (2007). The combination of gas chromatography – olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. *Journal Of Chromatography A*, 1150, 70–77. doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.019
- Fazio, T., & Warner, C. R. (1990). A review of sulphites in foods: Analytical methodology and reported findings. *Food Additives and Contaminants*, 7(4), 433–454. doi: 10.1080/02652039009373907
- Ferreira, M., & Guido, F. (2018). *Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review*. 1–13. doi: 10.3390/fermentation4020023
- Fieser, L. F., & Fieser, M. (1952). *Aldehydes and Ketones*. (pp. 197–198). In Textbook of Organic Chemistry.
- Firnandes, S. M. V, Rangel, A. O. S. S., & Lima, J. L. F. C. (1998). Determination of total sulphur dioxide in beer by flow injection spectrophotometry using gas-diffusion and the merging zones technique. *Journal of the Institute of Brewing*, 203–205.
- Firor, R., & Quimby, B. (2001). A Comparison of Sulfur Selective Detectors for Low Level Analysis in Gaseous Streams. In Application. *Agilent Technologies*.
- Flannigan, B. (1996). *The microflora of barley and malt*. In: *Brewing Microbiology* (2 edición). F.G. Priest and I. Campbell Eds.
- Fogo, J., & Popowsky, M. (1949). Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide. *Analytical Chemistry*, 732–734.
- Fritsch, H., & Schieberle, P. (2005). Identification Based on Quantitative Measurements and Aroma Recombination of the Character Impact Odorants in a Bavarian Pilsner-type Beer. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 7544–7551.
- García, A. I., García, L. A., & Diaz, M. (1994). Prediction of ester production in industrial beer fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 66–71.
- Gibson, R. M., & Large, P. J. (1985). THE INFLUENCE OF ASSIMILABLE NITROGEN COMPOUNDS IN WORT ON THE ABILITY OF YEAST TO REDUCE DIMETHYL SULPHOXIDE. *Journal of the Institute of Brewing*, 9, 401–405.

- Gijs, L., & Collin, S. (2003). Occurrence et voies de formation des arômes soufrés dans la bière. 3. Les terpènes et hétérocycles soufrés. *Cerevisiae*, 28, 31–39.
- Gijs, L., & Collin, S. (2018). Effect of the Reducing Power of a Beer on Dimethyltrisulfide Production during Aging. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 2–5. doi: 10.1094/ASBCJ-60-0068
- Gijs, L., Perpete, P., Timmermans, A., & Collin, S. (2000). 3-Methylthiopropionaldehyde as Precursor of Dimethyl Trisulfide in Aged Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6196–6199.
- Goldstein, H., Rader, S., & Murakami, A. A. (1993). Determination of 3-Methyl-2-Butene-1-Thiol in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470. doi: 10.1094/ASBCJ-51-0070
- Gonçalves, L. M., Grosso Pacheco, J., Magalhães, P. J., Rodrigues, J. A., & Araújo Barros, A. (2010). Determination of free and total sulfites in wine using an automatic flow injection analysis system with voltammetric detection. *Food Additives and Contaminants: Part A, March 2015*, 37–41. doi: 10.1080/19440040903261547
- Grigsby, J. H., & Palamand, S. R. (1977). A Colorimetric Procedure for the Measurement of Dimethyl Sulfide in Water, Wort, and Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 43–48. doi: 10.1094/ASBCJ-35-0043
- Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2009). Hop Allylic Alcohols Are Precursors of Sulfur-Containing Odorants in Fresh Beer. 273–278.
- Guerra, N. P., & Pastrana, L. (2003). Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 51–55.
- Guido, L. F., Fortunato, N. A., Rodrigues, J. A., & Barros, A. A. (2003). Voltammetric Assay for the Aging of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3911–3915.
- Guido, Luis F. (2016). Sulfites in beer: Reviewing regulation, analysis and role. *Scientia Agricola*, 73(2), 189–197. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0290
- Gustafsson, L. (1960). DETERMINATION OF ULTRAMICRO AMOUNTS OF SULPHATE AS METHYLENE BLUE-I The colour reaction. *Talanta*, 4, 227–235.
- Hammond, J., Brennan, M., & Price, A. (1999). The Control of Microbial Spoilage of Beer *. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(2), 113–120.
- Hansen, J. (1999a). Inactivation of MXR1 Abolishes Formation of Dimethyl Sulfide from Dimethyl

- Sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society for Microbiology*, 65(9), 3915–3919.
- Hansen, J. (1999b). Inactivation of MXR1 Abolishes Formation of Dimethyl Sulfide from Dimethyl Sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3915–3919.
- Hartnett, D. J., Vaughan, A., & Sinderen, D. Van. (2002). Antimicrobial-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Barley and Sorghum. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(2), 169–177.
- Hawthorne, D. B., Shaw, R. D., Davine, D. F., Kavanagh, T. E., & Clarke, B. J. (1991). Butyric Acid Off-Flavors in Beer: Origins and Control. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 4–8. doi:10.1094/ASBCJ-49-0004
- Henriksson, E., & Haikara, A. (1991). Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of Beer. *Monatssch. Brauwiss*, 44, 4–8.
- Herderich, M. J., Francis, I. L., Ugliano, M., Siebert, T. E., Jeffery, D. W. (2011). *Analysis and Formation of Key Sulfur Aroma Compounds in Wine*. 267–286.
- Hill, P. G., & Smith, R. M. (2000). *Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection*. 872, 203–213.
- Holah, J. T. (1992). *Industrial monitoring: hygiene in food processing*. In: *Biofilms - Science and Technology* (Kluwer Aca).
- Hollerová, I., & Kubizniaková, P. (2001). Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(6), 355–358.
- Holscher, W., Vitzthum, O. G., & Steinhart, H. (1992). Prenyl Alcohol-Source for Odorants in Roasted Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 655–658.
- Horák, T., Kellner, V., Jurková, M., Pavel, Č., & Čulík, J. (2007). Determination of Some Beer Flavours by Stir Bar Sorptive Extraction and Solvent Back Extraction. *Journal of the Institute of Brewing*, 154–158.
- Hough, J. S. (1985). The biotechnology of malting and brewing. *FEBS Letters*, 190(1), 180–180.
- Hughes, P. (1999). The lightstruck. *Cerevisia*, 24, 21–25.
- Hysert, D. W., & Morrison, N. M. (1976). Sulfate Metabolism during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 34(1), 25–31. doi:

10.1080/03610470.1976.12006180

- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993). Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amine and Mycotoxins. In *International Agency for Research on Cancer* (Vol. 56, p. 489).
- Ilett, D. R. (1995). Aspects of the Analysis, Role, and Fate of Sulphur Dioxide in Beer - A Review. *Technical Quarterly*, 32(4), 213–221.
- International, E. (1997). Physiology and development of *Pectinatus cerevisiiphilus* and *Pectinatus frisingensis*, two strict anaerobic beer spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 29–39.
- Irwin, A. J., Barker, R. L., & Pipasts, P. (1991). The Role of Copper, Oxygen, and Polyphenols in Beer Flavor Instability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49(3), 140–149.
- Irwin, A. J., Bordeleau, L., & Barker, R. L. (1993). Model Studies and Flavor Threshold Determination of 3-Methyl-2-Butene-1-Thiol in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52, 1–3.
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Grampositive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 171–200.
- James, N., Stahl, U., James, N., & Stahl, U. (2014). *BrewingScience Authors Amino Acid Permeases and their Influence on Flavour Compounds in Beer*. 67(October), 120. http://www.lowoxygenbrewing.com/wp-content/uploads/2017/04/BrewingScience_0910_James_2014.pdf
- Janes, M. E., Nannapaneni, R., & Johnson, M. G. (1999). Identification and Characterization of Two Bacteriocin-Producing Bacteria Isolated from Garlic and Ginger Root †. *Journal of Food Protection*, 62(8), 899–904.
- Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 139–155.
- Johnson, C. R., Bacon, C. C., & Rigau, J. J. (1972). Chemistry of sulfoxides and related compounds. XXXVII. Reduction of sulfoxides with sodium hydrogen sulfite. *The Journal of Organic Chemistry*, 37(6), 919–920.
- Jorge, K., & Trugo, L. C. (2003). Discrimination of Different Hop Varieties Using Headspace Gas Chromatographic Data. *Journal of the Brazilian Chemical*, 14(3), 411–415.

- Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., & Koshino, S. (1991). *Role of active oxygens on deterioration of beer flavour* (pp. 433–440). Proceedings of the 23rd Congress, European Brewery Convention.
- Kaneda, Hirota, Kano, Y., & Kamimura, M. (1991). A study of beer staling using chemiluminescence analysis. *Journal of the Institute of of Brewing*, *97*, 105–109.
- Kaneda, Hirota, Takashio, M., Osawa, T., Kawakishi, S., & Koshino, S. (1996). Analysis of Aldehyde-bisulfites in Beer by HPLC- Fluorescence Detection with Post-column Derivatization. *Journal of Food Science*, *61*(1), 105–108.
- Katajamaa, M., & Orešič, M. (2005). Processing methods for differential analysis of LC / MS profile data. *BMC Bioinformatics*, *12*. doi:10.1186/1471-2105-6-179
- Keeler, J. (2010). *Understanding NMR Spectroscopy* (Second). A John Wiley and Sons.
- Kelly, L., & Briggs, D. E. (1992). THE INFLUENCE OF THE GRAIN MICROFLORA ON THE GERMINATIVE PHYSIOLOGY OF BARLEY. *Journal of the Institute of Brewing*, *98*, 395–400.
- Kerjan, P., Cherest, H., & Surdin-Kerjan, Y. (1986). Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. *Nucleic Acids Research*, *14*(20), 7861–7871.
- Kim, H., & Kim, Y. (1986). Analysis of Free and Total Sulfites in Food by Ion Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Food Science*, *51*(5), 5–6.
- Kim, Y., & Kim, H.-J. (1988). *Rapid extraction, separation, and detection method for a separate analysis of free and total sulfites in foods by ion chromatography*.
- Kishimoto, T., Kobayashi, M., Yako, N., Iida, A., & Wanikawa, A. (2008). Comparison of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one Contents in Hop Cultivars from Different Growing Regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1051–1057.
- Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., & Shibata, K. (2006). Comparison of the Odor-Active Compounds in Unhopped Beer and Beers Hopped with Different Hop Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *3*(28588), 8855–8861.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiology Reviews*, *12*(1–3), 39–85.
- Kostelanska, M., Hajslova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P. M., Berthiller, F. B., & Krska, R. (2009). Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3187–3194.

- Kretsch, J. (1994). Practical considerations for brewery sanitation. *Technical Quarterly-the Master Brewer Association of Americas*, 31, 124–128.
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9–27.
- Kuroiwa, Y., Hashimoto, N., Hashimoto, H., Kokubo, E., & Nakagawa, K. (1963). *Factors Essential for the Evolution of Sunstruck Flavor*. 21(1), 181–193. doi: 10.1080/00960845.1963.12006717
- Laaks, J., Letzel, T., Schmidt, T. C., & Jochmann, M. A. (2012). Fingerprinting of red wine by headspace solid-phase dynamic extraction of volatile constituents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2429–2436. doi: 10.1007/s00216-012-5909-7
- Landaud, S., Helinck, S., & Bonnarne, P. (2007). *Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food*. 1191–1205. doi: 10.1007/s00253-007-1288-y
- Larsen, A. G., Vogensen, F. K., & Josephsen, J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 113–122.
- Latimer Jr., G. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (19th Editi).
- Lermusieau, G., & Collin, S. (2003). Volatile Sulfur Compounds in Hops and Residual Concentrations in Beer — A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470.
- Lewis, D. (1998). Biological mash and wort acidification. *The New Brewer*, 15, 36–45.
- Li, H., Jia, S., & Zhang, W. (2008). Rapid Determination of Low-Level Sulfur Compounds in Beer by Headspace Gas Chromatography with a Pulsed Flame Photometric Detector. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 188–191. doi: 10.1094/ASBCJ-2008-0629-01
- Li, J., Schieberle, P., & Steinhaus, M. (2012). Characterization of the Major Odor-Active Compounds in Thai Durian (*Durio zibethinus* L. ‘ Monthong ’) by Aroma Extract Dilution Analysis and Headspace Gas Chromatography – Olfactometry. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 11253–11262.
- Liu, S. (2015). Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. *Brewing Microbiology*, 355–374. doi: 10.1016/B978-1-78242-331-7.00017-4
- Liu, S. Q., & Crow, V. L. (2010). Production of dairy-based, natural sulphur flavor concentrate by

- yeast fermentation. *Food Biotechnology*, 24(1), 62–77. doi: 10.1080/08905430903562724
- Lowe, D. P., Ulmer, H. M., Barta, R. C., Goode, D. L., & Arendt, E. K. (2005). Biological Acidification of a Mash Containing 20% Barley Using *Lactobacillus Amylovorus* FST 1.1: Its Effects on Wort and Beer Quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. doi: 10.1094/ASBCJ-63-0096
- Lusk, L. T., Kay, S. B., Porubcan, A., & Ryder, D. S. (2012). Key Olfactory Cues for Beer Oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(4), 257–261.
- Lusk, L. T., Murakami, A., Nielsen, L., Kay, S., & Ryder, D. (2009). Beer Photooxidation Creates Two Compounds with Aromas Indistinguishable from 3-Methyl-2-butene-1-thiol. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 10, 10–13.
- Madruga, M. S., & Mottram, D. S. (1995). The Effect of pH on the Formation of Maillard-Derived Aroma Volatiles Using a Cooked Meat System. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 305–310.
- Malherbe, S., Watts, V., Nieuwoudt, H. H., Bauer, F. F., & Toit, M. (2009). Analysis of Volatile Profiles of Fermenting Grape Must by Headspace Solid-Phase Dynamic Extraction Coupled with Gas Chromatography - Mass Spectrometry (HS-SPDE GC-MS): Novel Application To Investigate Problem Fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5161–5166. doi: 10.1021/jf900532v
- Maquieira, A., Casamayor, F., & Puchades, R. (1993). Determination of total and free sulphur dioxide in wine with a continuous-flow microdistillation system. *Analytica Chimica Acta*, 283, 401–407.
- Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B., & Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a Nontypical Antilisterial Poration Complex Bacteriocin, That Functions without a Receptor*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 14277–14284.
- Marsili, R. T., Laskonis, L. C., & Kenaan, C. (2007). Evaluation of PDMS-Based Extraction Techniques and GC-TOFMS for the Analysis of Off-Flavor Chemicals in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 129–137. doi: 10.1094/ASBCJ-2007-0617-01
- Martí, M. P., Busto, O., & Guasch, J. (2004). Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *Journal Of Chromatography A*, 1057, 211–217. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.143
- Martin, N., Collin, S., Gijs, L., & Khan, J. A. (1999). *Combinatorial Approach to Flavor Analysis* . 2 . *Olfactory Investigation of a Library of S- Methyl Thioesters and Sensory*. 3274–3279.

- Maruyama, F. T. (1970). Identification of dimethyl trifulfide as a major aroma component of cooked Brassicaceous vegetables. *Journal of Food Science*, 35, 540–543.
- Maruyama, Y., Yasuda, R., Kuroda, M., & Eto, Y. (2012). Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells. *PLoS ONE*, 7(4), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0034489
- Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E. M., Mateo, F., & Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 79–83. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.029
- Matsui, S., & Amaha, M. (1981). Production of S-Methyl Thioacetate from Methyl Mercaptan by Brewer's Yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864728>
- Matsui, S., & Amaha, M. (2014). *Production of S -Methyl Thioacetate from Methyl Mercaptan by Brewer ' s Yeast*. 1369. doi:10.1080/00021369.1981.10864728
- Mattila-Sandholm, T., & Wirtanen, G. (2009). Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8(4), 573–603.
- Meaden, P. G., & Taylor, N. R. (1991). Cloning of a yeast gene which causes phenolic off-flavours in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 97, 353–357.
- Meilgaard, M. C. (1982). Prediction of Flavor Differences between Beers from Their Chemical Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1009–1017.
- Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal Of Chromatography A*, 881, 569–581.
- Miracle, R. E., Ebeler, S. E., & Bamforth, C. W. (2005). The Measurement of Sulfur-Containing Aroma Compounds in Samples from Production-Scale Brewery Operations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 129–134. doi: 10.1094/ASBCJ-63-0129
- Monier-Williams, G. W. (1927). *The determination of sulphur dioxide in foods*.
- Munar, M., Maurice, M.-J., & Kluessendorf, A. (1994). Quantitation of Sulfur Dioxide Residues in Malt and Beer by Headspace Gas Chromatography. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 1–5. doi: 10.1094/ASBCJ-52-0168
- Mussinan, C. J., & Keelan, M. E. (1994). *Sulfur Compounds in Foods*. 1–6. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0564.ch001>
- Naef, F., Velluz, A., & Jaquier, A. (2008). New Volatile Sulfur-Containing Constituents in a

- Simultaneous Distillation - Extraction Extract of Red Bell Peppers (*Capsicum annum*).
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 517–527.
- Nakazawa, N., Ashikari, T., Goto, N., Amachi, T., Nakajima, R., Harashima, S., & Oshima, Y. (1992). Partial restoration of sporulation defect in sake yeasts, kyokai no. 7 and no. 9, by increased dosage of the IME1 gene. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(4), 265–270. doi: 10.1016/0922-338X(92)90180-3
- Narziss, L. (1986). Technological Factors of Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 92, 346–353.
- Narziss, L., Miedaner, H., Graf, H., Eichhorn, P., & Lustig, S. (1993). Technological approach to improve flavor stability. *Technical Quarterly-the Master Brewer Association of Americas*, 30, 48–53.
- Nauth, K. R., & Kraft Food Holdings Inc. (2002). Prevention of lactic acid bacteria spoilage of beer through the use of bacteriocin containing fermented wort. In *U.S. Patent*.
- Navarro, L., Zarazaga, M., Sáez, J., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 44–51.
- Nedjma, M., & Hoffmann, N. (1996). Hydrogen Sulfide Reactivity with Thiols in the Presence of Copper (II) in Hydroalcoholic Solutions or Cognac Brandies: Formation of Symmetrical and Unsymmetrical Dialkyl Trisulfides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3935–3938.
- Nes, I. E., Diep, D. B., Hävarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113–128.
- Noba, S., Yako, N., Kobayashi, M., Masuda, S., & Watanabe, T. (2017). Search for compounds contributing to onion-like off- flavor in beer and investigation of the cause of the flavor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx), 1–6. doi:10.1016/j.jbiosc.2017.05.009
- Noba, S., Yako, N., Sakai, H., Kobayashi, M., & Watanabe, T. (2018). Identification of a precursor of 2-mercapto-3-methyl-1-butanol in beer. *Food Chemistry*, 255(October 2017), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.092>
- Nordiov, H. (1985). *Formation of sulphur dioxide during beer fermentation*. (pp. 291-298.). Proceedings of the 20th European Brewery Convention.
- Nyborg, M., Outtrup, H., & Dreyer, T. (1999). Investigations of the Protective Mechanism of

- Sulfite Against Beer Staling and Formation of Adducts with Trans -2-Nonenal. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 24–28. doi:10.1094/ASBCJ-57-0024
- O'Mahony, A., O'Sullivan, T., Walsh, Y., Vaughanh, A., Maher, A., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2000). Characterisation of Antimicrobial Producing Lactic Acid Bacteria from Malted Barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(6), 403–410.
- O'Sullivan, T. F., Walsh, Y., O'Mahony, A., Fitzgerald, G. F., & Sinderen, D. (1999). A Comparative Study of Malthouse and Brewhouse Microflora. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(1), 55–61.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Daishima, S., Heiden, A., & Hoffmann, A. (2003). Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, 986, 101–110.
- Ogden, B. K., Waites, M. J., & Hammond, J. R. M. (1988). Nisin and brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 94(4), 233–238.
- Ogden, K. (1986). NISIN: A BACTERIOCIN WITH A POTENTIAL USE IN BREWING. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(4), 379–383.
- Ogden, K., & Tubb, R. S. (1985). Inhibition of beer-spolage lactic acid bacteria by nisin. *Journal of the Institute of Brewing*, 91, 390–392.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M., & Nakanishi, K. (2001). Purification and some characteristics of enterocin ON-157 , a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 81–89.
- Oliver-Daumen, B. (1988). Biological acidification in the brewing process. Part II: Production process. *Brauwelt International*, 4, 370–375.
- Olsen, A., Christensen, B. W., & Madsen, J. (1988). ONION-LIKE OFF-FLAVOUR IN BEER : ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE CULPRITS. *Carlsberg Research Center*, 53(7), 1–9.
- Omura, F., Shibano, Y., Fukui, N., & Nakatani, K. (1995). Reduction of Hydrogen Sulfide Production in Brewing Yeast by Constitutive Expression of MET25 Gene. *Jornal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 58–62. doi:10.1094/ASBCJ-53-0058
- Oriet, P., & Pfenninger, H. (1998). Determination of the germ content of environmental air using an air sampler in microbiologically sensitive areas of beer production in Swiss breweries.

Monatssch. Brauwiss, 51, 161–164.

- Palamand, S. R. (1983). *Method for Controlling Light Stability in Malt Beverages and Products Thereof*.
- Patton, S. (1954). The Mechanism of Sunlight Flavor Formation in Milk with Special Reference to Methionine and Riboflavin. *Journal of Dairy Science*, 37(4), 446–452.
doi:10.3168/jds.S0022-0302(54)91278-3
- Pavlečić, M., Tepalović, D., Ivančić Šantek, M., Rezić, T., & Šantek, B. (2012). The effect of total oxygen concentration in the bottle on the beer quality during storage. *Hrvatski Časopis Za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam*, 7, 118–125.
- Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D., & Rossi, M. C. (2005). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography – mass spectrometry analysis of the volatile compounds of Evodia species fruits. *Journal Of Chromatography A*, 1087, 265–273.
doi:10.1016/j.chroma.2005.01.060
- Peppard, T. L. (1981). Volatile Organosulphur Compounds in Hops and Hop Oils: a Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 87(6), 376–385. doi:10.1002/j.2050-0416.1981.tb04054.x
- Peppard, Terence Leonard. (1980). *The Chemistry of hop-derived sulphur compounds*.
- Perpète, P., & Collin, S. (1999). Contribution of 3-Methylthiopropionaldehyde to the Warty Flavor of Alcohol-Free Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2374–2378.
- Petters, H. I., Flannigan, B., & Austin, B. (1988). Quantitative and qualitative studies of the microflora of barley malt production. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 279–297.
- Pfohl-Leskowicz, A., Pinelli, E., Bartsch, H., Mohr, U., & Castegnaro, M. (1998). Sex-and Strain-Specific Expression of Cytochrome P450s in Ochratoxin A-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity in Rats. *Molecular Carcinogenesis*, 23, 76–85.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. . O., & Santos, L. H. M. L. M. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal Of Chromatography A*, 1121, 145–153. doi:10.1016/j.chroma.2006.04.013
- Pittet, V., Morrow, K., & Ziola, B. (2011). Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria , Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene gtf. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57–61.
- Porqué, P. G., Baldesten, A., & Reichard, P. (1970). The involvement of the thioredoxin system

- in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 2371–2374.
- Priest, F. G., Cowbourne, M. A., & Hough, J. S. (1974). Wort enterobacteria-A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 342–356.
- Protti, P. (2001). Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques. *AMEL Electrochemistry*.
- Prove, S. (2019). *Manual Analysis Methods for the Brewery Industry*.
- Rauhut, D. (1993). Yeasts-production of sulfur compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 6, 183–223.
- Rehberg, R., & Berliner, W. (1969). *Brauwelt*. 109, 313–316.
- Richter, P. I., Castro, M. D. L., & Valcárcel, M. (1993). Spectrophotometric flow-through sensor for the determination of sulphur dioxide. *Analytica Chimica Acta*, 283, 408–413.
- Roberts, D. D., Pollien, P., & Milo, C. (2000). Solid-Phase Microextraction Method Development for Headspace Analysis of Volatile Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2430–2437.
- Roberts, J. K. M., & Jardetzky, O. (1985). Chapter 1 Nuclear magnetic resonance spectroscopy in biochemistry. *Modern Physical Methods in Biochemistry*, 1, 1–67.
- Rodrigues, F., Caldeira, M., & Camara, J. S. (2008). Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC – qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*, 9, 82–104.
doi:10.1016/j.aca.2007.12.041
- Saison, D., De Schutter, D. P., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, 1190, 342–349. doi:10.1016/j.chroma.2008.03.015
- Saison, D., Schutter, D. P. De, Uyttenhove, B., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*, 114(4), 1206–1215.
doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.078
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Scarlata, C. J., & Ebeler, S. E. (1999). Headspace Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Dimethyl Sulfide in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2505–2508.
- Schieberle, P. (1991a). *Original paper Primary odorants of pale lager beer*. 558–565.
- Schieberle, P. (1991b). Primary Odorants in Popcorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1141–1144.
- Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901–1906.
- Scott, P. . (1996). Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of AOAC International*, 79, 875–882.
- Seow, Y. X., Ong, P. K. C., & Liu, S. Q. (2010). Production of flavour-active methionol from methionine metabolism by yeasts in coconut cream. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 235–240. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.003
- Shankaranarayana, M. L., Raghavan, B., Abraham, K. . . , Natarajan, C. P., & Brodnitz, H. H. (1974). Volatile sulfur compounds in food flavors. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 37–41.
- Sharpe, F. R., & Laws, D. R. J. (1981). THE ESSENTIAL OIL OF HOPS A REVIEW. *Journal of the Institute of of Brewing*, 87(April), 96–107.
- Sieg, K., Fries, E., & Wilhelm, P. (2008). Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and n -aldehydes in melted snow water via solid-phase dynamic extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *Journal Of Chromatography A*, 1178, 178–186. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.025
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007). *Principios de análisis instrumental* (Sexta Edic). Books/Cole.
- Skyttä, E., Haikara, A., & Mattila-Sandholm, T. (1993). Production and characterization of antibacterial compounds produced by *Pediococcus damnosus* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 134–142.
- Soltoft, M. (1988). Flavour active sulphur compounds in beer. *Brygmesteren*, 2, 18–24.
- Spinnler, H. E., Martin, N., & Bonnarne, P. (2002). Generation of Sulfur Flavor Compounds by Microbial Pathways. *Heteroatomic Aroma Compounds*, 54–72.
- Steinhaus, M., Fritsch, H. T., & Schieberle, P. (2003). Quantitation of (R) - and (S) -Linalool in Beer Using Solid Phase Microextraction (SPME) in Combination with a Stable Isotope

- Dilution Assay (SIDA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7100–7105.
- Stephenson, W. H., & Bamforth, C. W. (2002). The impact of lightstruck and stale character in beers on their perceived quality: A consumer study. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(4), 406–409.
- Stewart, G G. (2016). Beer Shelf Life and Stability. In *The Stability and Shelf Life of Food*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-08-100435-7.00010-1
- Stewart, Graham G. (2004). The Chemistry of Beer Instability. *Journal of Chemical Education*, 81(7), 963–968.
- Storgårds, E. (1997). *Microbiological quality of draught beer – is there a reason for concern? Proceedings of the European Brewing Convention Symposium Draught Beer, Packaging and Dispense, EBC Monograph XXV* (pp. 92–103).
- Storgårds, Erna. (2000). *Process hygiene control in beer production and dispensing*. VTT Technical Research Centre of Finland.
- Stratford, M., & Rose, A. H. (1986). Transport of Sulphur Dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 1–6.
- Tan, A. W. J., Lee, P. R., Seow, Y. X., Ong, P. K. C., & Liu, S. Q. (2012). Volatile sulphur compounds and pathways of L-methionine catabolism in *Williopsis* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 1011–1020. doi:10.1007/s00253-012-3963-x
- Taylor, D. G. (1990). The importance of pH control during brewing. *MBAA Tech. Q.*, 27, 131–136.
- Taylor, P., Vermeulen, C., Gijs, L., Collin, S., & Collin, S. (2005). Sensorial Contribution and Formation Pathways of Thiols in Foods : A Review Sensorial Contribution and Formation Pathways of Thiols in Foods : A Review. *Food Reviews International*, August 2012, 69–137. doi:10.1081/FRI-200040601
- Teranishi, R., Takeoka, G. R., & Guntert, M. (1992). Flavor Precursors: Thermal and Enzymatic Conversions. *Journal of Food Biochemistry*, 16(2), 131–132. doi:10.1111/j.1745-4514.1992.tb00440.x
- Tominaga, T., & Dubourdieu, D. (2006). A Novel Method for Quantification of 2-Methyl-3-furanthiol and 2-Furanmethanethiol in Wines Made from *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29–33.
- Tuomi, T., Laakso, S., & Rosenqvist, H. (1995). Plant hormones in fungi and bacteria from malting barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 101, 351–357.

- Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M., & Miyajima, R. (1997). Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(12), 1977–1980. doi:10.1271/bbb.61.1977
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Lebensmittel-Untersuchung Und - Forschung*, 277–282.
- Uinard, J. E. A. N. A. G., & Beler, S. U. E. E. (2004). Yield Effects on 2-Methoxy-3-Isobutylpyrazine Concentration in Cabernet Sauvignon Using a Solid Phase Microextraction Gas Chromatography / Mass Spectrometry Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5432–5435.
- Ullrich, F., & Grosch, W. (1988). Identification of the Most Intense Odor Compounds Formed During Autoxidation of Methyl Linolenate at Room Temperature. *Journal of the American Oil Chemists, May*, 1313–1317.
- Valenzuela, P., Bell, G. I., Venegas, A., Sewell, T. E., Masiarz, F. R., Degennaro, L. J., Weinberg, F., & Rutter, W. (1977). Ribosomal RNA Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(25), 8126–8135.
- Van der Aa Kühle, A., & Jespersen, L. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 205–213.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., & Fourie, L. (1965). Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112–1113.
- Van Halbeek, H. (1994). ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains of glycoproteins. *Guide to Techniques in Glycobiology*, 230(1990), 132–168.
- Van Oevelen, D., & Verachter, H. (1979). Slime Production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37, 34–37.
- Van Vuuren, H. J. J., Cosser, K., & Prior, B. A. (1980). The influence of *Enterobacter agglomerans* on beer flavour. *Journal of the Institute of Brewing*, 86, 31–33.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachttert, H., & Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging– a critical review. *Food Chemistry*, 95(3), 357–381. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.006
- Vaughan, A., Eijsink, V. G. H., O’Sullivan, T. F., O’Hanlon, K., & Van Sinderen, D. (2001). An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 131–138.

- Vaughan, Anne, Eijsink, V. G. H., & Van Sinderen, D. (2003). Functional Characterization of a Composite Bacteriocin Locus from Malt Isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7194–7203. doi:10.1128/AEM.69.12.7194
- Vaughan, Anne, O' Sullivan, T., & Sinderen, D. Van. (2005). Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), 355–371.
- Vera, L., Aceña, L., Guasch, J., Boqué, R., & Mestres, M. (2011). Characterization and classification of the aroma of beer samples by means of an MS e-nose and chemometric tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2073–2081. doi:10.1007/s00216-010-4343-y
- Verhagen, L. C., & Strating, J. (1987). Analysis of E-2-nonenal in beer at the ultra trace level by high-performance liquid chromatography using precolumn derivatization and column switching techniques. *Journal of Chromatography A*, 393(1), 85–96. doi:10.1016/S0021-9673(01)94206-2
- Vermeulen, C., Lejeune, I., Tran, T. T. H., & Collin, S. (2006). Occurrence of Polyfunctional Thiols in Fresh Lager Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5061–5068.
- Wagner, H. P., & McGarrity, M. J. (1991). The use of pulsed amperometry combined with ion-exclusion chromatography for the simultaneous analysis of ascorbic acid and sulfite. *Journal of Chromatography A*, 546, 119–124.
- Wagner, Herbert P, & MCGarrity, M. J. (1992). Determination of sulfite in beer using Ion-Exclusion Chromatography and pulsed Amperometric Detection. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 1–3. doi:10.1094/ASBCJ-50-0001
- Wainwright, T., McMahon, J. F., & McDowell, J. (1972). Formation of Methional and Methanethiol from Methionine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 911–914.
- Wakatsuki, T., Imahara, H., Kitamura, T., & Tanaka, H. (1979). On the Absorption of Copper into Yeast Cell. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1687–1692. doi:10.1080/00021369.1979.10863693
- Williams, R. S., & Gracey, D. E. F. (1982a). Beyond Dimethyl Sulfide: The Significance to Flavor of Thioesters and Polysulfides in Canadian Beers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 68–71. doi:10.1094/ASBCJ-40-0068
- Williams, R. S., & Gracey, D. E. F. (1982b). The Science of Beer Factors Influencing the Levels of Polysulfides in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 0470, 71–74. doi:10.1094/ASBCJ-40-0071
- Wilson, R. J. H., Roberts, I., Smith, R. J., & Bieng, M. (2001). Improving hop utilization and

- flavour control through the use of pre-isomerized products in the brewery. *Technical Quarterly-the Master Brewer Association of Americas*, 38, 11–21.
- Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 228–237. doi:10.1016/j.trac.2007.12.001
- Wolf-Hall, C. E. (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 89–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.030
- Wygant, M. B., Statler, J. A., & Henshall, A. (1997). Improvements in Amperometric Detection of Sulfite in Food Matrixes. *Journal of AOAC International*, 80(6), 1374–1380.
- Yang, S. F., Ku, H. . ., & Pratt, H. K. (1967). Photochemical Production of Ethylene from Methionine and Its Analogues in the Presence of Flavin Mononucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(22), 5274–5281.
- Yeliz, P., & Nuray, G. (2004). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Applications - Forensic. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*, 168, 315–321. doi:10.1016/B0-12-369397-7/00423-4
- Yonezawa, T., & Fushiki, T. (2002). Testing for Taste and Flavour of Beer. *Analysis of Taste and Aroma*, 29–45.
- Zinder, S. H., & Brock, T. D. (1978). Dimethyl Sulphoxide Reduction by Micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 105, 335–342.

ANEXOS

Método oficial AOAC 963.11

Dióxido de azufre en la cerveza

Método colorimétrico

Primera acción 1963

Acción final 1964

A. Reactivos

(a) Reactivo de color. —Pésese 100 mg de p-rosanilina • HCl en un matraz aforado de 250 mL y disuelva en aproximadamente 200 mL de H₂O. Agregue 40 ml de HCl (I + I), mezcle y diluya a volumen con H₂O. Deje reposar unos 15 minutos antes de usar. Almacenar en un frasco marrón con tapón de vidrio en el refrigerador (Latimer Jr., 2012).

(b) Solución de formaldehído. Diluya 5 ml de solución de HCHO al 40% a 1 L con H₂O y guárdelo en una botella marrón con tapón de vidrio en el refrigerador. (c) Solución estabilizadora de mercurio. Disuelva 27.2 g de HgCl₂ y 11.7 g de NaCl en H₂O y diluya a 1 L con H₂O.

B. Calibración

Pese con precisión aproximadamente 250 mg de NaHSO₃ en exactamente 50 ml de solución de I₂ 0,1 M en un matraz con tapón de vidrio. Deje reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Añadir 1 ml de HCl y valorar el exceso de I₂ con Na₂S₂O₃ 0,1 M, usando una solución acuosa de almidón al 1% como indicador (1 ml de I₂ 0,1 M consumido = 3,203 mg de SO₂ o 5,20 mg de NaHSO₃). A partir de los resultados del ensayo de NaHSO₃, prepare una solución que contenga 10 mg de SO₂ / mL (aprox. 8,6-9,0 g de NaHSO₃ / 500 mL) (Solución 1).

Transferir 100 ml de solución estabilizadora de Hg a un matraz aforado con tapón de vidrio de 500 ml. Agregue 1.00 mL de Solución I y diluya a volumen con H₂O (1 mL = 20 ug SO₂) (Solución II).

Con un graduado de 10 mL que contenga 1 gota de alcohol n-hexílico como antiespumante, transfiera porciones de 10 mL de cerveza fría sin gasificar (preferiblemente de bajo contenido de SO₂) a una serie de ocho matraces aforados de 100 ml. A la serie agregue 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 8.0 mL de Solución II (0-160 µg SO₂). Diluir a volumen con H₂O y mezclar. Transfiera alícuotas de 25 mL de cada solución para separar matraces aforados de 50 mL. A cada matraz, agregue 5 mL de reactivo de color. Mezclar y agregar 5 mL de solución de HCHO. Mezclar, diluir a volumen con H₂O, mezclar y mantener en un baño de agua a 25 ° C durante 30 min. Leer el color en el espectrofotómetro a 550 nm o en un fotómetro con relleno verde. Trace A como

ordinales contra $\mu\text{g SO}_2$ agregado a la cerveza como abscisas (el color sigue la ley de Beer sobre el rango). Calcule el factor de calibración F, convirtiendo las lecturas a μg de SO_2 en la alícuota de 25 mL utilizada, o conviértala directamente a $\mu\text{g} / \text{mL}$ de SO_2 (Latimer Jr., 2012).

C. Preparación de la solución de prueba

Con pipetas, agregue 2 mL de solución estabilizadora de Hg y 5 ml de H_2SO_4 0,05 M a un matraz aforado de 100 mL. Mida 10 mL de cerveza fría sin gasificar en un recipiente graduado de 10 mL que contenga 1 gota de alcohol n-hexílico y añádalo al matraz aforado. Agite suavemente y agregue 15 mL de NaOH 0.1M. Gire y mantenga 15 s. Agregue 10 mL de H_2SO_4 0.05 M, luego H_2O a volumen y mezcle bien. Transfiera una alícuota de 25 mL a un matraz aforado de 50 mL (Latimer Jr., 2012).

D. Determinación

Para disolver en un matraz aforado de 50 mL, agregue 5 mL de reactivo de color, agite, agregue 5 mL de solución de HCHO, agite y diluya a volumen con H_2O . Mezclar y mantener en baño a 25°C 30 min. Lea el color como en B, usando celdas del mismo tamaño y la misma configuración del instrumento (Latimer Jr., 2012).

Corrija para el blanco de la siguiente manera: Mida 10 mL de cerveza fría sin gasificar en un matraz aforado de 100 ml. Agregue 0,5 ml de solución acuosa de almidón al 1%, luego solución de I_2 0,05 M, gota a gota hasta que persista un dedo azulado permanente. Agregue 1 gota más, diluya a volumen y mezcle bien. Cuando el azul se desvanece, desarrolle el color en una alícuota de 25 mL como se indicó anteriormente.

(Las lecturas de color para los espacios en blanco de I_2 suelen ser bajas y uniformes; cuando la prueba se realiza en una serie de cervezas similares, las pruebas en blanco en todas pueden ser innecesarias) (Latimer Jr., 2012).

$$\text{SO}_2, \mu\text{g} / \text{mL} = (\text{As} - \text{Ab}) \times F$$

donde As = A de la solución de prueba (o lectura fotométrica con filtro verde equivalente a A), Ab = A del blanco de I_2 y F = factor derivado de B para convertir A en $\mu\text{g SO}_2$ en alícuotas, o directamente en SO_2 (Latimer Jr., 2012).

Referentes: Methods of Analysis (1992) 8th Ed., American Society of Brewing Chemists, 3340 Pilot Knob Rd, St. Paul, MN 55121, Estados Unidos, Beer 21. JAOAC 46, 291 (1963). CAS-7446-09-5 (dióxido de azufre).

Método oficial AOAC 985.28**Aminoácidos de azufre en alimentos, ingredientes para piensos y alimentos
procesados****Método cromatográfico de intercambio iónico****Primera acción 1985****Acción final 1986****Primera acción revisada 1988****A. Principio**

La proteína se oxida con ácido per fórmico para formar ácido cisteico y metionina sulfona, luego se hidroliza con HCl 6M. El ácido cisteico y la metionina sulfona se miden mediante cromatografía de intercambio iónico (Latimer Jr., 2012).

B. Reactivos y aparatos

(a) Ácido per fórmico. — Agregue 1 volumen de H₂O₂ al 30% a 9 volúmenes de ácido fórmico al 88% en un Erlenmeyer con tapón de vidrio y deje reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora, agitando frecuentemente. Después de 1 h, coloque el matraz en un baño de hielo durante 30 min. Prepare justo antes de usar (Latimer Jr., 2012).

(b) Tampón. — Según lo recomendado por el proveedor del analizador de aminoácidos.

(c) Tampón de elución de citrato de sodio 2. — pH 4,25, 0,2 M (Pierce Chemical Co.). Filtrar dos veces a través de un filtro de 0,45 μ m.

(d) Solución estándar de ácido cisteico-metionina sulfona. -2,5 μ moles / ml. Disuelva 93,6 mg de ácido L-cisteico (Sigma Chemical Co.), 90,6 mg de L-metionina sulfona (ICN K&K Laboratories Inc., División de ICN Biomedicals, PO Box 28050, Cleveland, OH 44128-0250, EE. UU., O equivalente) y 1 gota de conservante tampón "pHix"; diluir a 200 mL con H₂O.

(e) Soluciones estándar internas de norleucina. — (1) Solución madre.-10 μ moles / mL. Disuelva 0.328 mg de norleucina en H₂O y diluya a 250 mL con H₂O. (2) Solución de trabajo. -1,5 μ moles / mL. Diluir 75 ml de solución madre a 500 ml con H₂O.

(f) Solución estándar variada de aminoácidos. Disuelva 1,77 g de ácido L-aspártico, 0,40 g de L-treonina, 0,53 g de L-serina, 0,58 g de L-valina, 0,66 g de L-isoleucina, 1,32 g de L-leucina, 0,38 g glicina y 0,45 g de L-alanina en H₂O y diluir a 1 L con H₂O (Latimer Jr., 2012).

(g) Analizador de aminoácidos. — Operado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Latimer Jr., 2012).

C. Preparación de la porción de prueba

Triturar la muestra de laboratorio en Brinkmann mili con pantalla de 1 mm y mezclar bien. Pesar la porción de prueba que contenga 7.5-25 mg de proteína, pero no > 75 mg de porción de prueba, en un matraz de ebullición de 125 mL. Pípete 2.00 mL de solución estándar de ácido cisteico-metionina sulfona en cada uno de dos matraces de ebullición de 125 mL y evaporar hasta sequedad a 37 ° C en un evaporador rotatorio de vacío (Latimer Jr., 2012).

D. Preparación de hidrolizado oxidado

Coloque los matraces que contienen las porciones de ensayo y los patrones en hielo durante 30 min. Añada 10 ml de ácido per fórmico frío a cada uno, no agite los matraces de cierre y colóquelos en un baño de hielo durante 16 h.

Agregue a cada matraz 3 mL de HBr al 48% y 3 gotas de 1-octanol, agite y deje reposar en un baño de hielo durante 30 min. Evaporar hasta sequedad a 37 ° C en un evaporador rotatorio de vacío. Coloque los matraces en el colector de vacío y evacue a <25 mm Hg durante ≥ 15 min, o hasta que esté completamente seco. Retire los matraces del colector, agregue 15 ml de HCl 6 M, purgue con N₂ seco 1 min, tape y coloque en el horno a 110 ° \pm 0,5 ° C durante 18 h (Latimer Jr., 2012).

Deje enfriar los matraces, agregue 4.0 mL de solución de trabajo estándar interna 8 mL H₂O y 3 gotas de 1-octanol, y evapore hasta sequedad en un evaporador rotatorio de vacío a <50 ° C. Repita la adición de 8 ml de H₂O y la evaporación 2 veces más. Agregue 15 ml de tampón de carga de citrato de sodio y agite en un agitador orbital durante 30 min. Ajuste el pH a 2,2 \pm 0,05 con NaOH 2M. Añada 1,5 ml de solución estándar de aminoácidos surtidos a matraces que contengan estándares de ácido cisteico-metionina sulfona. Transfiera cuantitativamente la solución de prueba y los estándares a matraces aforados de 25 ml, enjuague con tampón de carga de citrato de sodio y diluya a volumen. Filtrar la solución de prueba y las soluciones estándar a través de papel de fibra de vidrio (Whatman GF / A), transferir el filtrado a un tubo de centrifuga y centrifugar 5 min a 15 000 rpm (Latimer Jr., 2012).

E. Determinación

Cargue 40 μ L de solución de prueba o solución estándar en la unidad de retención de muestras del analizador de aminoácidos. Opere el analizador de aminoácidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante e inyecte la solución estándar de ácido cisteico-metionina sulfona. Ajuste las condiciones cromatográficas según sea necesario para obtener una resolución > 90% para el pico de metionina sulfona. Inyectar soluciones de prueba y estándares, inyectar estándares después de cada 5 soluciones de prueba y al principio y al final del conjunto de prueba (Latimer Jr., 2012).

F. Cálculos

Mida las áreas de los picos (no la altura) para el ácido cisteico y la metionina sulfona para las porciones de prueba y los estándares. Calcule el factor de respuesta para el ácido cisteico (K_C) y la metionina sulfona (K_M).

$$K_C = (\text{área de estándar interno} / \text{área de ácido cisteico}) \times (0.20 \mu\text{moles} / \text{mL} \times 25 \text{ mL} \times \text{MW} \times 100)$$

Calcule el factor de respuesta para la metionina (K_M) de manera similar. Para cisteína, use 121,2 $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ para MW. Para el metionme, 149,2 $\mu\text{g}/\mu\text{mole}$ (Latimer Jr., 2012).

Calcule el % de cisteína:

% Cisteína =

$$\frac{K_C \times \text{área ácido cisteico}}{\text{área estándar interno} \times \text{mg porcion de prueba} \times 100 \mu\text{g}/\text{mg}}$$

Calcule el % de metionina utilizando K_M .

Referencias: JAOAC 68, 826 (1985); 71, 127 (1988). CAS-13100-82-8 (ácido cisteico) CAS-63-68-3 (L metionina).

Método oficial AOAC 990.29

Sulfito (total) en alimentos y bebidas

Método de análisis de inyección de flujo

Primera acción 1990

Acción final 1997

(Aplicable a la determinación de $\geq 5 \mu\text{g}/\text{g}$ de SO_2 total en camarones, patatas, piña y vino blanco).

Resultados del estudio entre laboratorios que respalda la aceptación del método:

$$s_r = 23,5; s_R = 35,1; \text{RSD}_r = 7,5\%; \text{RSD}_R = 14,0\%$$

A. Principio

El sulfito se determina mediante análisis de inyección de flujo (FIA) usando reacción con verde de malaquita. En el sistema FIA, la solución de prueba se hace reaccionar primero con NaOH para liberar sulfito unido al aldehído. Luego, la corriente de prueba se acidifica para producir gas SO_2 , que se difunde a través de la membrana de teflón en la celda de difusión de gas hacia una corriente fluida de verde malaquita, que se decolora. El grado de decoloración del verde de malaquita es proporcional a la cantidad de sulfito en la solución de prueba (Latimer Jr., 2012).

B. Aparato

(a) Analizador de inyección de flujo. Construya de acuerdo con la Figura 990.29, usando una bomba peristáltica (baja pulsación, 8-10 rodillos), válvula de inyección de solución de prueba de 6 puertos (Rheodyne No. 7010 o equivalente), celda de difusión de gas de bajo volumen. (Control Equipment Corp., No. 8200 020) equipado con una membrana de teflón de 0,45 μm de tamaño de poro (p. Ej., Gore Tex, WL Gore and Associates, Inc. ; www.gore.com), detector de LC UV-Vís ajustado a aproximadamente 615 nm y registrador de gráficos que proporciona un tramo de 250 mm. Retire cualquier tubo de diámetro pequeño en la celda de flujo del detector para reducir la contrapresión al mínimo. Monte el colector utilizando todos los tubos de teflón (0,5 mm de di) y T de bajo volumen, excepto el tubo de la bomba peristáltica, que es un tubo de bomba de PVC estándar. Seleccione los tamaños de tubería que proporcionen los flujos especificados en la Figura 990.29. Anude el tubo de la bobina de reacción en una serie de pequeños nudos para promover la mezcla de reactivos (Latimer Jr., 2012).

(b) Licuadora. — Tipo Waring.

(c) Centrifugar. — Capaz de ca 2000 x g.

C. Reactivos

(a) Soluciones de verde de malaquita .— (1) Solución de reserva. — Suspense 200 mg de verde de malaquita (ya sea sal de oxalato o clorhidrato, No. M-6880 o M-9636, respectivamente, Sigma Chemical Co.) y 8.5 g de KH_2PO_4 en 1 L H_2O . Mezclar bien y dejar reposar durante la noche para asegurar la completa disolución del reactivo. Filtrar la solución preparada a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm y almacenar a $<5^\circ \text{C}$. La solución es estable al menos 1 mes. (2) Solución de reactivo. — Use una dilución de la solución madre en agua que proporcione A de 2.0 ± 0.2 AU. Determine la dilución adecuada de la siguiente manera: diluya la solución madre 1:50 en agua y mida A de la solución diluida a 615 nm frente al aire. Luego, use la siguiente fórmula para determinar la dilución adecuada de la solución madre para usar en todas las preparaciones posteriores de solución de reactivo de verde de malaquita de ese lote particular de solución (Latimer Jr., 2012).

$$D = \left(\frac{A}{2}\right) \times 50$$

donde D = dilución adecuada de la solución madre y A = absorbancia o dilución 1:50.

Prepare una solución de reactivo verde de malaquita diluida fresca todos los días.

(b) Solución de tetracloromercurato de sodio (TCM). -Hg 0,01 M. Disuelva 2,35 g de NaCl, 5,45 g de HgCl_2 y 13,6 g de KH_2PO_4 en aproximadamente 1900 ml de H_2O y diluya a 2 L.

(c) Reactivo tampón fosfato-0,3M. Disuelva 104.4 g de KH_2PO_4 en aproximadamente 1800 mL de H_2O , ajuste a pH 8.0 ± 0.1 con ácido fosfórico concentrado y diluya a 2 L. Almacene a $<5^\circ \text{C}$ y equilibre a temperatura ambiente antes de usar en el sistema FIA.

(d) Reactivo de ácido sulfúrico.-1M. Agregue 110 mL de H_2SO_4 concentrado a 1908 mL de H_2O .

(e) Reactivo de hidróxido de sodio. 0.2M. Disuelva 16 g de NaOH en 1890 mL de H_2O y agregue 20 mL de etanol absoluto.

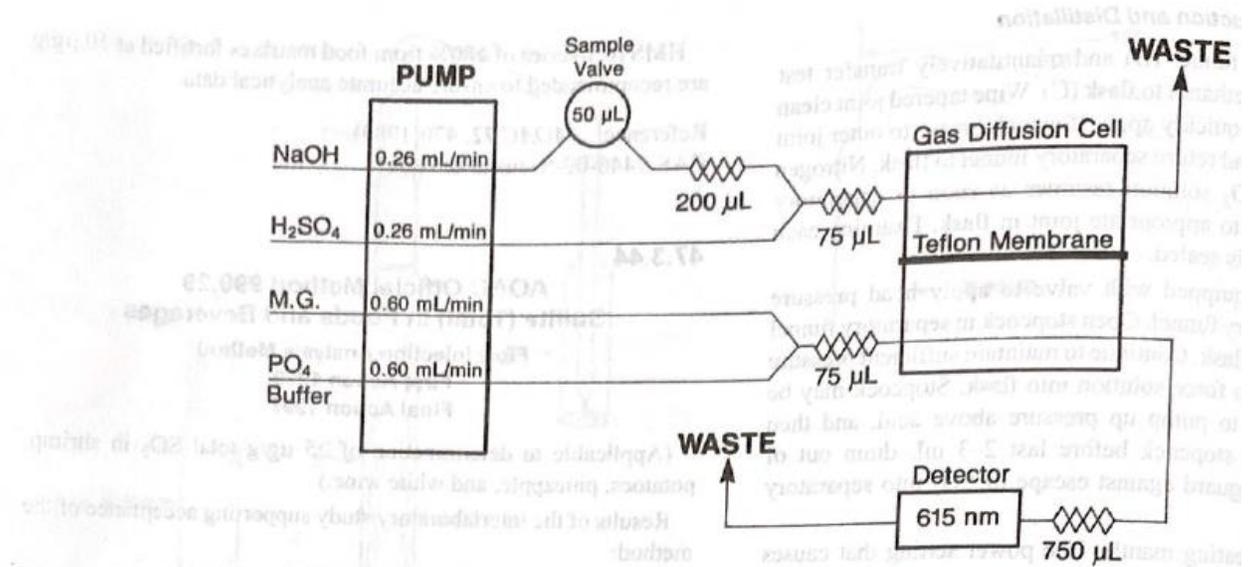
(f) Reactivo de enjuague FIA. -NaOH 0,04M. Disuelva 1,6 g de NaOH en 1 L de H_2O . **(g)** Soluciones estándar de sulfito.— (1) Solución madre. -500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ como SO_2 . Disolver 98,4 mg de Na_2SO_3 en aproximadamente 90 ml de solución TCM, (b), en un matraz aforado de 100 ml y diluir a volumen. Preparar fresco todos los días. (2) Solución intermedia. -20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ como SO_2 . Diluir la solución madre con solución TCM para obtener 20,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de SO_2 . (3) Trabajando solutivos. ---- 0-10 ppm como SO_2 . Diluir la solución intermedia con la solución TCM para obtener estándares de 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 y 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$, SO_2 (Latimer Jr., 2012).

Tabla 5: Temporización del partero para lograr una deflexión del registrador de 60-90% de escala completa.

| Tiempo transcurrido, s | Acción |
|------------------------|--|
| 0 | Inyectar solución de prueba o estándar |
| 60 | Inyectar 50 μL 1M H_2SO_4 |
| 70 | Enjuagar la válvula de muestra con 300 μL H_2O |
| 120 | Inyectar la siguiente solución de prueba o estándar Repetir el procedimiento de muestreo y lavado para cada puerto de prueba o estándar |

(Latimer Jr., 2012)

Figura 1: diagrama de flujo para el sistema FIA para la determinación de sulfitos totales



D. Preparación de la solución de prueba

(a) Alimentos sólidos. -Pésar y transferir a la porción de prueba representativa de la licuadora. Agregue el peso de la solución de TCM, C (b), a 3-30 veces el Chal de la porción de prueba: Use una cantidad de reactivo que resulte en una concentración de SO_2 en el extracto final que esté dentro del rango de estándares y también resulte en una suspensión semilíquida en la licuadora. Mezclar hasta que la lechada sea homogénea (aproximadamente 2 min) y centrifugar (Latimer Jr., 2012).

(b) Vid blanca. — Pesar la porción de prueba representativa (1-2 g) en un tubo desechable de 50 ml tarado. Agregue la solución de TCM al nivel 19 veces el peso de la porción de prueba, tape el tubo y mezcle bien. Centrifugue si la solución está turbia (Latimer Jr., 2012).

E. Determinación

(a) Puesta en marcha del sistema. Comience a bombear 2 reactivos donantes, C (d) y (e), y reactivos receptores, C (a) (2) y (e), a través de las pestañas de la bomba especificadas en la Figura 990.29. Una vez que se establece el flujo y el sistema se ha equilibrado (aproximadamente 10-20 min), ponga a cero el detector y el monitor A a 615 nm con el detector ajustado a 0,1 AUFS y el registrador a aproximadamente 0,5 cm / min. El ruido de la línea de base (pico a pico) debe ser <3 mm; si no es así, determine la fuente del ruido excesivo y realice las correcciones necesarias. (Nota: algunos detectores son propensos a atrapar burbujas de aire que deben purgarse de la celda de flujo). Si el detector tiene un filtro electrónico variable, este se puede ajustar a aproximadamente 1-5 s para reducir el ruido de la línea de base. Verifique los índices de flujo de los reactivos del donante y del receptor para asegurarse de que cumplan con las especificaciones de la Figura 990.29 (Latimer Jr., 2012).

(b) Análisis de la solución de prueba. — Inyecte repetidamente 10 µg / mL de solución estándar de trabajo de sulfito, C (g) (3), hasta que la altura del pico sea aceptable y la deflexión del registrador sea de aproximadamente 60-90% de escala completa. Puede ser necesario ajustar el intervalo del registrador para lograr la altura máxima deseada (consulte la Tabla 990.29). Después de cada inyección de solución de prueba o estándar en el sistema FIA, lave la válvula de muestra y el primer serpentín de reacción haciendo una inyección de H₂SO₄, C (d) 1 M para eliminar cualquier óxido de mercurio que pueda precipitar dentro del serpentín de reacción. A continuación, se muestra un patrón de temporización típico que se puede utilizar para garantizar un lavado adecuado de la válvula y la bobina sin superposición de la solución de prueba y H₂SO₄ 1M:

Las inyecciones repetidas de estándar de 10 µg / ml deben producir una serie de picos con derivación estándar relativa para una altura de pico ≤5% (n = 5). si no se logra esta precisión, determine y corrija la fuente del problema (Latimer Jr., 2012).

Una vez que el sistema se haya estabilizado, inyecte una serie de soluciones estándar de sulfito, C (g) (3), una vez cada una. Inyecte las soluciones de prueba preparadas, teniendo cuidado de inyectar solo sobrenadante transparente (o ligeramente turbio). Inyecte todas las soluciones de prueba por duplicado y asegúrese de incluir el procedimiento de lavado de H₂SO₄ 1 M entre cada inyección. Después de aproximadamente 10 inyecciones de solución de prueba (5 soluciones de prueba por duplicado), repita la serie de estándares. Para cualquier solución de prueba con una altura de pico que exceda la altura de pico del estándar de SO₂ de 10 µg / mL, diluya la solución de prueba con la solución TCM, C (b), en un rango analítico (1-10 µg / mL) (Latimer Jr., 2012).

Después de que se hayan analizado todas las soluciones de prueba y los estándares, enjuague a fondo el colector FIA bombeando agua a través de las 4 líneas durante 15 minutos, seguido del reactivo de enjuague FIA, C (f), durante 15 minutos. El colector se puede almacenar con este reactivo. Libere la tensión de los rodillos de la bomba para prolongar la vida útil de la tubería (Latimer Jr., 2012).

(c) Reducción de datos. — Determine la altura máxima de cada prueba e inyección de solución estándar a ± 0,5 mm. Si la inyección en blanco produjo un pico, reste esta altura de pico de todas las soluciones estándar y de prueba. Alturas de pico promedio de cada inyección para concentraciones estándar individuales y graficar ptg / mL vs altura de pico (Latimer Jr., 2012).

Determine la concentración de SO₂ en los extractos de prueba a partir de la curva estándar y calcule la concentración en la porción de prueba de la siguiente manera:

$$SO_2, \mu g/g = C \times (F / S)$$

donde C = concentración en el extracto de prueba, F = peso total final de la suspensión de la porción de prueba y S = peso inicial de la porción de prueba tomada (Latimer Jr., 2012).

Referencia: JAOAC 73, 35 (1990). CAS-7446-09-5 (dióxido de azufre).

Método oficial AOAC 990.31

Sulfitos en alimentos y bebidas

Método cromatográfico de exclusión iónica

Primera acción 1990

Acción final 1995

Método AOAC adoptado por el Codex *

(Aplicable a la determinación de SO₂ a $\geq 10\mu\text{g} / \text{g}$. No aplicable a alimentos o ingredientes de color oscuro donde el SO₂ está fuertemente ligado, por ejemplo, color caramelo. El método no detecta el sulfito de origen natural). Resultados del estudio interlaboratorio que respalda la aceptación del método: $s_r= 4,7$; $s_R=8,9$; $RSD_f = 12,3\%$; $RSD_R=21,2\%$

A. Principio

El SO₂ se libera por extracción alcalina directa. Las porciones de prueba diluidas de líquidos o los filtrados diluidos de sólidos se inyectan en LC o en un sistema cromatográfico de exclusión de aniones equipado con una columna de exclusión de aniones y un detector electroquímico (Latimer Jr., 2012).

B. Aparato

(a) Cromatógrafo de exclusión de iones. Se puede utilizar cualquier sistema cromatográfico de líquidos o cromatográfico de iones equipado con columna de exclusión de aniones (poliestireno sulfonado / divinilbenceno) y detector electroquímico (amperométrico). Equilibre la columna de exclusión de aniones (preferiblemente columna de alta velocidad, 4,6 x 100 mm) y el detector electroquímico ajustado a +0,6 V en el electrodo de trabajo de platino frente al electrodo de referencia Ag / AgCl con eluyente H₂SO₄ 20 mM. Ajuste la atenuación en el integrador o en el registrador de gráficos para que la señal de la solución de SO₂ de 0,60 ppm produzca una desviación de aproximadamente 1/2 escala completa (Latimer Jr., 2012).

(b) Homogeneizador: Polytron o equivalente a (Latimer Jr., 2012).

C. Reactivos

(a) Tampón. — pH 9. Preparar Na₂HPO₄ 20 mM, solución de D-manitol 10 mM en agua desionizada y desgasificar.

(b) Solución de ácido sulfúrico-20 mM. Agregue 1.07 mL de H₂SO₄ concentrado a agua en un matraz aforado de 1 L. Diluir a volumen con agua y desgasificar. **(c)** Estándar de sulfito de sodio.

Determine la pureza del Na_2SO_3 de la siguiente manera: Pese con precisión aproximadamente 250 mg de Na_2SO_3 en exactamente 50 ml de solución de I_2 0,1 M en un matraz de vidrio. Después de 5 min a temperatura ambiente, agregar 1 ml de HCl y valorar el exceso de I_2 , con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M usando una solución acuosa de almidón al 1% como indicador (1 ml de I_2 0,1 M consumido = 6,302 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). **(d) Soluciones estándar de sulfito.**— (1) Solución madre. — Prepare una solución de SO_2 de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ disolviendo 196.9 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en 100 mL de tampón pH 9, (a). Prepare la solución madre a diario. (2) Solución de trabajo. Diluya la solución madre a 0,60 $\mu\text{g} / \text{mL}$ con el mismo tampón de pH 9. La solución de trabajo debe estar recién preparada a partir de la solución madre cada 2 h (Latimer Jr., 2012).

D. Determinación

Diluya la porción de prueba líquida con tampón de pH 9 de modo que la altura del pico de sulfito de la solución de prueba sea similar a la del estándar de 0,60 $\mu\text{g} / \text{mL}$ dentro del 50%. Para los sólidos, homogeneizar 0.2-1.0 g de porción de prueba en tampón pH 9 con un exceso de 10-100 veces durante 1 min con homogeneizador y filtrar (0.2-0.45 μm). Diluir el filtrado según sea necesario, comparando la intensidad de la señal con la de la solución estándar de trabajo de 0,60 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Para productos ácidos, como jugo de limón, si el pH de la porción de prueba diluida es <8, ajuste a pH entre 8 y 9 con una solución diluida de NaOH o realice una extracción con Na_2HPO_4 100 mM, solución de D-manitol 10 mM (Latimer Jr., 2012).

Inyecte 0,60 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de solución estándar y luego inyecte la solución de prueba diluida preparada.

La extracción, filtración, dilución e inyección deben realizarse dentro de los 10 min porque la concentración de sulfito en el extracto tiende a disminuir gradualmente (Latimer Jr., 2012).

Los errores debidos a la disminución gradual de la sensibilidad del detector durante múltiples inyecciones pueden minimizarse inyectando solución estándar alternativamente con inyecciones de porción de prueba. La limpieza del electrodo al comienzo de cada ciclo cromatográfico puede aliviar la disminución de la sensibilidad. Para limpiar el electrodo, aplique -1,0 V durante varios minutos seguido de +1,8 V durante varios minutos más y luego equilibre a +0,6 V. Alternativamente, se puede aplicar automáticamente un tren corto de voltajes de limpieza de electrodos después de cada inyección (Latimer Jr., 2012).

E. Cálculos

Calcule $\mu\text{g} / \text{g}$ de SO_2 en la porción de prueba de la siguiente manera:

$$\text{SO}_2, \mu\text{g} / \text{g} = 0.60 \times (\text{PH} / \text{PH}') \times \text{factor de dilución}$$

donde PH y PH ' = altura del pico de la porción de ensayo y el estándar, respectivamente, y el factor de dilución tiene en cuenta la dilución inicial para la extracción y cualquier dilución posterior (Latimer Jr., 2012).

Referencia: JAOAC 73, 216 (1990).

CAS-7446-09-5 (dióxido de azufre)

* Adoptado como un método aprobado por el Codex Alternativo (tipo 111) para la titulación de dióxido de azufre en vinagre.