



**Facultad de Ciencia y Tecnología**

**Ingeniería en Alimentos**

**Estudio de compuestos químicos no azufrados responsables del  
aroma de la cerveza.**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**Autor:**

**NICOLE ALEXANDRA SARMIENTO OCHOA**

**Director:**

**ANDRÉS PÉREZ GONZÁLEZ**

**CUENCA, ECUADOR**

**2021**

## DEDICATORIA

Dedico de todo corazón y amor mi tesis a mi mami Alexandra, quien me ha brindado sus valores y enseñanzas de la vida, es la persona que siempre estuvo orgullosa de mí y la primera en aplaudir todos mis logros, sé que desde el cielo estás orgullosa, todo lo que haga en este mundo será en honor a tí.

A mi hermana Heidy, una persona tan importante en mi vida que Dios me otorgó, eres la mejor hermana que alguien quisiera tener, y este logro te lo dedico, porque estuvimos juntas durante toda la vida y sabemos todo el esfuerzo y empeño que hemos puesto para alcanzar nuestras metas.

A mi tío Juan, que ha sido como un padre para mí, ha sabido aconsejarme y acompañarme durante toda mi vida.

A mi prima Marianita que sin duda se ha convertido en mi segunda mamá, que Dios le bendiga siempre, este logro también es para usted.

Nicole Alexandra Sarmiento Ochoa

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Mgt. Andrés Pérez González, director de esta investigación, por creer y confiar en mí, guiarme durante todo el proceso, impartirme sus conocimientos y sobre todo su apoyo constante y sincero, me siento afortunada de haber compartido este proyecto con una persona tan interesante y destacada en el ámbito personal como en el profesional.

A los Doctores Cristian Rojas y Piercosimo Tripaldi, por sus valiosas recomendaciones, por compartir conmigo sus conocimientos y reforzar los míos, por su paciencia durante esta etapa de mi vida, y su apoyo.

De igual manera a la Ing. María Fernanda Rosales, por ser una excelente profesional y amiga, por ayudarme durante todo este proceso.

A la Ing. María Alicia Peña, Ing. Lady González e Ing. Miriam Briones, por brindarme sus grandes conocimientos, apoyo y amistad durante toda mi estadía en la Universidad, sepan que las admiro tanto personal como profesionalmente, son mi ejemplo a seguir.

## **Estudio de compuestos químicos no azufrados responsables del aroma de la cerveza.**

### **RESUMEN**

El presente estudio brinda información sobre los compuestos químicos no azufrados responsables del aroma de la cerveza. Estos compuestos se generan de forma natural en las materias primas o se producen debido a la acción de las levaduras durante la etapa de fermentación. Asimismo, se destacan por ser los principales precursores del aroma en la cerveza. El aroma es una característica importante en esta bebida, ya que definirá su calidad y aceptación por parte del consumidor. Por esta razón, se debe controlar de la mejor manera cada etapa del proceso productivo de cada tipo de cerveza, para que se puedan generar las cantidades adecuadas de estos compuestos, los mismos que influirán directamente en su aroma. Para la determinación y cuantificación de estos compuestos químicos existen diversos métodos analíticos los cuales se basan en técnicas cromatográficas y electroquímicas. Palabras clave: cerveza, compuestos no azufrados, aroma, sabor, métodos analíticos.



Andrés Pérez González.

**Director de tesis**



María Fernanda Rosales M.

**Coordinadora de escuela**



Nicole Alexandra Sarmiento Ochoa

**Autor**

## **Study of Non-sulfur chemical compounds responsible for beer aroma**

### **ABSTRACT**

This study contains information about non-sulfur chemical compounds responsible for beer aroma. These compounds are generated naturally in raw materials or are produced due to the action of yeasts during the fermentation stage. Likewise, they stand out for being the main precursors of aroma in beer. The aroma is an important characteristic in this beverage, and defines both the quality and acceptance by the consumer. For this reason, each process of production must be critically controlled, in such a way as the appropriate amounts of these compounds can be generated. This will directly influence the aroma of it. To determine and quantify these chemical compounds there are various analytical methods which are based on chromatographic and electrochemical techniques.

**Keywords:** beer, non-sulfur compounds, aroma, flavor, analytical methods.



Andrés Pérez González.

**Thesis Director**



María Fernanda Rosales M.

**Food Engineering Faculty Coordinator**



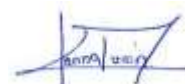
Nicole Alexandra Sarmiento Ochoa

**Author**

Translated by



Nicole Alexandra Sarmiento Ochoa



## ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                                                                                                                       |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>DEDICATORIA .....</b>                                                                                                              | <b>ii</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>                                                                                                           | <b>iii</b>  |
| <b>RESUMEN .....</b>                                                                                                                  | <b>iv</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                 | <b>v</b>    |
| <b>ÍNDICE DE CONTENIDO .....</b>                                                                                                      | <b>vi</b>   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                                                                                        | <b>vii</b>  |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>                                                                                                         | <b>viii</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                                                             | <b>1</b>    |
| <b>CAPÍTULO I:.....</b>                                                                                                               | <b>3</b>    |
| <b>COMPUESTOS QUÍMICOS NO AZUFRADOS PRESENTES EN LA CERVEZA. ....</b>                                                                 | <b>3</b>    |
| <b>CAPÍTULO II:.....</b>                                                                                                              | <b>12</b>   |
| <b>INFLUENCIA E IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS NO AZUFRADOS EN EL AROMA DE LA CERVEZA.....</b>                                | <b>12</b>   |
| <b>CAPÍTULO III:.....</b>                                                                                                             | <b>24</b>   |
| <b>MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS NO AZUFRADOS PRESENTES EN CERVEZA .....</b>                                       | <b>24</b>   |
| <b>3.1. Métodos espectroscópicos .....</b>                                                                                            | <b>24</b>   |
| 3.1.1. Determinación de polifenoles totales .....                                                                                     | 25          |
| 3.1.2. Determinación de dicetonas vecinales.....                                                                                      | 25          |
| 3.1.3. Capacidad de reducción.....                                                                                                    | 26          |
| 3.1.4. Determinación de iso- $\alpha$ - ácidos.....                                                                                   | 27          |
| 3.1.5. Determinación de iso- $\alpha$ y $\beta$ -ácidos.....                                                                          | 27          |
| 3.1.6. Determinación de alcoholes superiores .....                                                                                    | 28          |
| 3.1.7. Determinación de diacetilo en cerveza (ASBC) .....                                                                             | 28          |
| 3.1.8. Determinación de acetaldehído.....                                                                                             | 28          |
| 3.1.9. Espectroscopía por RMN .....                                                                                                   | 29          |
| <b>3.2. Métodos cromatográficos .....</b>                                                                                             | <b>30</b>   |
| 3.2.1. Cromatografía de gases .....                                                                                                   | 30          |
| 3.1.2. Cromatografía líquida.....                                                                                                     | 33          |
| <b>3.3. Otros .....</b>                                                                                                               | <b>36</b>   |
| 3.3.4. Caracterización y clasificación del aroma de muestras de cerveza mediante nariz electrónica y herramientas quimiométricas..... | 36          |
| 3.3.5. Análisis de cerveza usando lengua electrónica .....                                                                            | 37          |
| <b>DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....</b>                                                                                                | <b>39</b>   |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                               | <b>41</b>   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estructura molecular de alfa y beta ácidos en lúpulos. ....                                                                                                                   | 4  |
| Figura 2. Estructura molecular de compuestos derivados de alfa y beta ácidos. ....                                                                                                      | 5  |
| Figura 3. Estructura molecular de mirceno y linalol. ....                                                                                                                               | 5  |
| Figura 4. Estructura molecular de los principales alcoholes superiores influyentes en el flavor de la<br>cerveza. ....                                                                  | 7  |
| Figura 5. Estructura molecular del acetaldehído ....                                                                                                                                    | 8  |
| Figura 6. Estructura molecular de los principales compuestos carbonílicos presentes en la cerveza...                                                                                    | 8  |
| Figura 7. Estructura molecular de los principales ésteres influyentes en el flavor de la cerveza. ....                                                                                  | 9  |
| Figura 8. Estructura molecular del diacetilo. ....                                                                                                                                      | 10 |
| Figura 9. Terminología para la descripción de las notas olfativas y gustativas de la cerveza. ....                                                                                      | 13 |
| Figura 10. Estructura molecular del 4 vinil guayacol. ....                                                                                                                              | 16 |
| Figura 11. Esquema de un espectrómetro de masas de ionización con electrones y sector magnético.<br>.....                                                                               | 24 |
| Figura 12. Partes básicas de un espectrómetro de masas. ....                                                                                                                            | 24 |
| Figura 13. Operación esquemática de un espectrómetro de RMN. ....                                                                                                                       | 29 |
| Figura 14. Esquema general de un cromatógrafo de gases. ....                                                                                                                            | 30 |
| Figura 15. TIC para el análisis de compuestos volátiles en cerveza por SPME: (1) etilo acetato, (2)<br>acetato de isoamilo, (3) 2-fenil etil alcohol, (4) acetato de 2-fenil etilo .... | 33 |
| Figura 16. Esquema general de HPLC. ....                                                                                                                                                | 34 |
| Figura 17. Esquema general de la nariz electrónica para la identificación de compuestos en muestras<br>de cerveza. ....                                                                 | 36 |
| Figura 18. Esquema del proceso de identificación o calificación de una bebida o alimento según el<br>sentido del gusto y la lengua electrónica. ....                                    | 37 |

**ÍNDICE DE TABLAS**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Contenido de humulonas y lupulonas en lúpulos de diversas fuentes (valores en%). .....           | 4  |
| Tabla 2. Odorantes potentes en lúpulos. ....                                                              | 6  |
| Tabla 3. Algunos componentes aromáticos asociados al metabolismo de las levaduras en la cerveza.<br>..... | 12 |
| Tabla 4. Ésteres más relevantes en el flavor de la cerveza sintetizados por las levaduras. ....           | 17 |
| Tabla 5. Principales alcoholes superiores influyentes en el flavor de la cerveza. ....                    | 21 |

## INTRODUCCIÓN

La cerveza, en inglés “beer” proviene de la palabra latina Bibere que significa beber. Los orígenes de esta bebida se remontan a la Antigua Mesopotamia, entre 6000 y 8000 años (Bamforth, 2005). Aquí se produce la primera cerveza primitiva a partir de la germinación del trigo cuyo sabor era ligeramente agrio, debido a la fermentación láctica paralela que se producía; este fenómeno causaba que la cerveza dure más tiempo, ya que un medio ácido es desfavorable para el crecimiento de los microorganismos. Posteriormente, los babilonios heredaron de los sumerios el arte de cultivar la tierra y elaborar cerveza. Además, dejaron los primeros procedimientos de elaboración de cerveza a base de cebada, de trigo almidonado, o una mezcla de las dos, que era turbia; y si la espesaban con harina era conocida como “cerveza-pan bebible” (Suárez, 2013).

La cerveza es una bebida alcohólica obtenida a partir de la fermentación de cereales, reconocida a nivel mundial por su inigualable sabor y aroma característico. Puede considerarse como una solución de agua - etanol que contiene cientos de moléculas disueltas con un pH ácido (aproximadamente de 4,2). Además, la degradación de estas moléculas a concentraciones por debajo del umbral del sabor puede causar la pérdida de los sabores iniciales de la cerveza fresca (Morales, 2018).

La cerveza está constituida por cuatro ingredientes principales: cebada, agua, levadura y lúpulo; sin embargo, también se puede incorporar coadyuvantes tales como el maíz, arroz, entre otros, con el fin de mejorar su rendimiento; además de influir en su densidad y otras propiedades (De Keukeleire, 2000).

Por su parte, el lúpulo es un ingrediente importante debido a su aporte en aroma y sabor específicos a la cerveza. De acuerdo a su variedad, poseen cierta cantidad de alfa ácidos, los mismos que se transforman en iso-alfa-ácidos durante el proceso de cocción, y presentan ciertas características interesantes: tienen propiedades tensioactivas, estabilizando de esta forma la espuma de la cerveza e inhiben el desarrollo de bacterias Gram-positivas, protegiendo así la bebida contra estos microorganismos. Por otro lado, las bacterias del ácido láctico en la cerveza son resistentes a los iso-alfa-ácidos.

Debido a que la calidad de la cerveza se ve directamente influenciada por el aroma y sabor que presenta, es importante determinar los compuestos químicos que se desarrollan a lo largo de su elaboración, en este caso particular los compuestos no azufrados que se generan por la metabolización de la levadura, malta y lúpulo principalmente.

La determinación de estos compuestos es de interés en la industria cervecera debido a los bajos umbrales de sabor de los mismos. De igual manera, se ha confirmado que, en

concentraciones más altas, estos compuestos pueden causar efectos de sabor negativos y pueden usarse como indicadores de problemas durante la fermentación.

En esta recopilación bibliográfica se pretende identificar los compuestos no azufrados presentes en la cerveza, que otorgan aromas y sabores a esta bebida, así como detallar los métodos analíticos empleados para su identificación y cuantificación.

## **CAPÍTULO I: COMPUESTOS QUÍMICOS NO AZUFRADOS PRESENTES EN LA CERVEZA.**

La cerveza es una bebida alcohólica obtenida mediante fermentación, es decir, que en ausencia de oxígeno se genera alcohol (etanol) y gas carbónico producto del proceso metabólico de las bacterias anaeróbicas y de las levaduras (Carvajal & Insuasti, 2010).

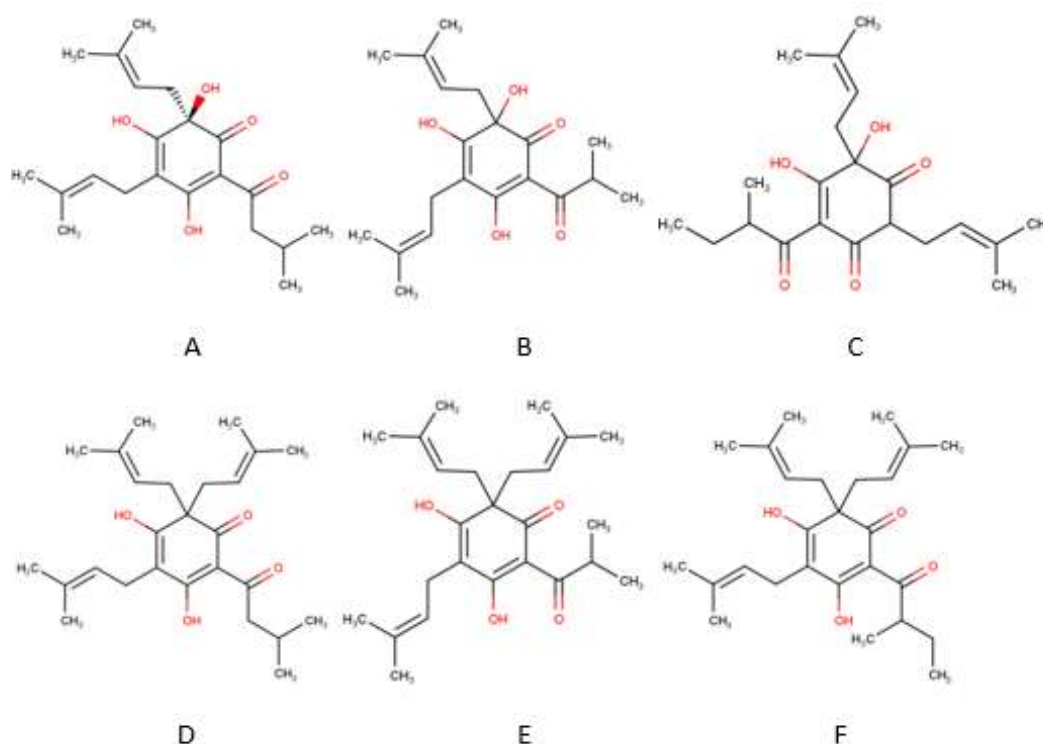
Existen compuestos químicos no azufrados que se generan mediante la metabolización de las levaduras, principalmente. Entre estos tenemos los ácidos orgánicos, alcoholes superiores, compuestos de carbonilo, compuestos fenólicos, ésteres volátiles y moléculas que contienen azufre.

La información de los números de registro CAS (Chemical Abstracts Service) que se presentan a continuación ha sido obtenida de la librería de acceso libre PubChem. Esa información se utilizó para el diseño de las estructuras moleculares en el programa Marvin.

Los ácidos orgánicos son productos finales de la fermentación de la levadura y fermentación bacteriana. Estos ácidos son críticos para definir el perfil de aroma y sabor. Asimismo, debido a la fermentación bacteriana puede generar un sabor ácido, que podría ser intencional, si se desea fabricar cervezas ácidas o involuntario debido al deterioro. El tipo y cantidad de estos compuestos generados durante la fermentación dependen de la levadura, la cepa de las levaduras y el proceso tecnológico de elaboración empleado.

Los ácidos del lúpulo se presentan como sólidos de color amarillento pálido en estado puro, son ácidos débiles, exhiben muy poca solubilidad en agua y casi no tienen sabor amargo. (De Keukeleire.D, 2000).

Entre los más importantes tenemos (Figura 1): humulona (CAS 26472-41-3) (A), cohumulona (CAS 511-25-1) (B), adhumulona (CAS 28374-89-2) (C); y en forma de  $\beta$ -ácidos: lupulona (CAS 468-28-0) (D), colupulona (CAS 468-27-9) (E) y adlupulona (CAS 35049-54-8) (F). Estos compuestos son susceptibles a cambios durante el secado, almacenamiento y procesamiento del lúpulo. Las variaciones normalmente implican isomerización, oxidación y/o polimerización. Como consecuencia, se encuentran una gran cantidad de productos secundarios (Belitz, 2009).



**Figura 1. Estructura molecular de diversos alfa y beta ácidos en lúpulos.**

La calidad e intensidad del sabor amargo procedente de estos productos secundarios son diferentes, por lo tanto, la evaluación del lúpulo se basa en la determinación de la composición de  $\alpha$ - y  $\beta$ -ácidos en lugar del contenido total de sustancias amargas. Como se observa en la Tabla 1, la composición varía con el origen del lúpulo.

**Tabla 1. Contenido de humulonas y lupulonas en lúpulos de diversas fuentes (valores en%).**

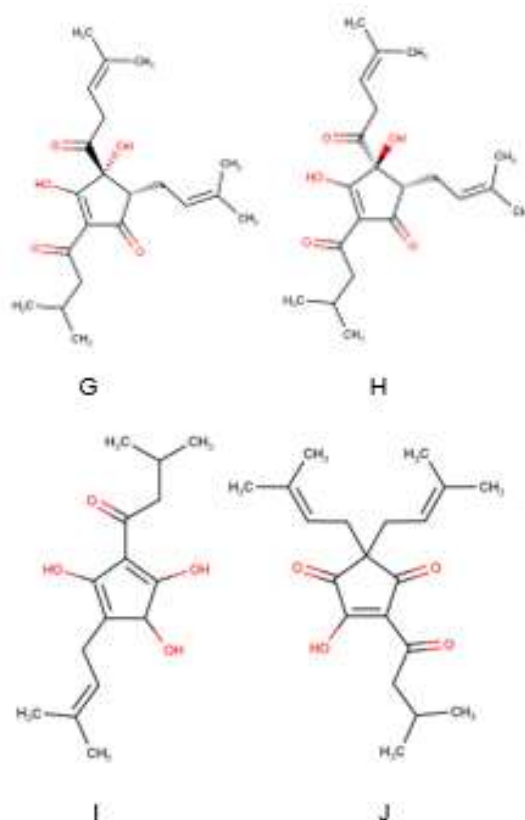
| Lúpulos         | $\alpha$ -ácidos |             |             | $\beta$ - ácidos |             |             |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
|                 | humulonas        | cohumulonas | adhumulonas | lupulonas        | colupulonas | adlupulonas |
| Japón           | 46               | 41          | 13          | 21               | 68          | 11          |
| América         | 54               | 34          | 12          | 32               | 57          | 11          |
| Hallertau       | 59               | 27          | 14          | 45               | 43          | 12          |
| Northern Brewer | 64               | 24          | 12          | 46               | 43          | 11          |
| Saaz            | 67               | 21          | 12          | 51               | 37          | 12          |

**Fuente:** Belitz, 2009.

Durante la ebullición del lúpulo, las humulonas se isomerizan en isohumulonas (Figura 2), compuestos

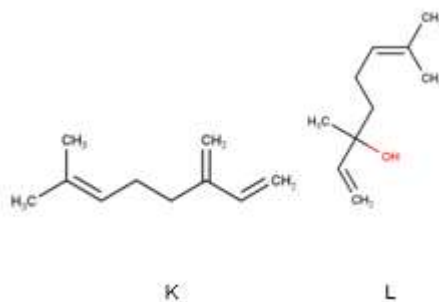
cis (G) y compuestos trans (H); que son más solubles y amargas que los compuestos iniciales. Las isohumulonas pueden también ser transformadas en ácido humulínico (I), que tiene solo

alrededor del 30% de amargor de la isohumulona. La hulupona (J), uno de los productos secundarios de las lupulonas, posee un sabor amargo extraordinariamente agradable y suave que es mucho menos amargo que los compuestos de donde se derivan. Por esta razón el sabor amargo de la cerveza se debe principalmente a compuestos de la fracción de humulonas (Belitz, 2009).



**Figura 2. Estructura molecular de compuestos derivados de alfa y beta ácidos.**

Por otra parte, la Tabla 2 muestra los odorantes presentes en los lúpulos secos. Es notable la aparición de un decatrieno y tetraeno, que tienen un olor a pino. Estos hidrocarburos, en particular (Figura 3) el mirceno (CAS 123-35-3) (K) y el linalol (CAS 78-70-6) (L), pertenecen a los compuestos que producen el olor característico del lúpulo (Belitz, 2009).



**Figura 3. Estructura molecular de mirceno y linalol.**

**Tabla 2. Odorantes potentes en lúpulos.**

| <b>Odorantes en lúpulos</b>               | <b>Concentración<br/>(mg/kg de<br/>sólidos)</b> |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Mirceno                                   | 3200                                            |
| R- linalol                                | 68                                              |
| Ácido butírico                            | 28                                              |
| Ácido hexanóico                           | 21                                              |
| Ácido pentanóico                          | 20                                              |
| Nonanal                                   | 3.6                                             |
| Ácido-2 metilpropiónico                   | 2.4                                             |
| Ácido-3 metilbutírico                     | 2.3                                             |
| Ácido-2 metilbutírico                     | 1.5                                             |
| Hexanal                                   | 1.5                                             |
| 4-vinilguayacol                           | 1.5                                             |
| Éster metílico del ácido 2- metilbutírico | 0.15                                            |
| (E, Z) – 1,3,5 - undecatrieno             | 0.076                                           |
| (E, Z, E) – 1,3,5,9 - undecatetraeno      | 0.045                                           |
| (Z) -3- Hexenal                           | 0.029                                           |
| 1,3,5,8- undecatetraeno *                 | 0.024                                           |
| Éster etílico del ácido isobutírico       | 0.023                                           |
| 1- Octen-3-uno                            | 0.022                                           |
| Propiléster de ácido 2- metilbutírico     | 0.0018                                          |

\*Se desconoce la estereoquímica.

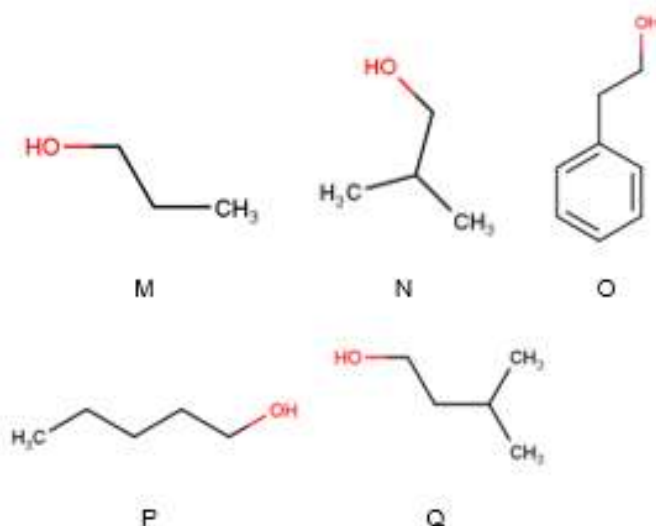
**Fuente:** Belitz, 2009.

Los alfa y beta-ácidos son responsables de ciertas propiedades de la cerveza, tales como brindar amargor una vez isomerizados, además de influir en el desarrollo de la espuma y ser antisépticos por lo que impiden la formación de bacterias y prolongan la vida de la misma (De Keukeleire, 2000).

Los beta-ácidos son muy sensibles a la descomposición oxidativa y la mayoría de los productos de la reacción de oxidación poseen características organolépticas desagradables. A pesar del hecho de que los beta ácidos pueden proteger a la cerveza contra la oxidación, en general se considera un factor negativo en su elaboración y varios cerveceros seleccionan variedades de lúpulo con bajo contenido de beta ácidos (De Keukeleire, 2000).

Por su parte, dentro del metabolismo secundario de las levaduras tenemos como uno de sus productos los alcoholes superiores, que se generan en altas concentraciones respecto de otros compuestos volátiles. En la cerveza se pueden encontrar aproximadamente 40

alcoholes superiores diferentes; siendo los más influyentes los que se detallan en la Figura 4: propanol (CAS 71-23-8) (M), isobutanol (CAS 78-83-1) (N), feniletanol (CAS 98-85-1) (O), alcohol amílico (CAS 71-41-0) (P), alcohol isoamílico (CAS 123-51-3) (Q) (Loviso & Libkind, 2019).



**Figura 4. Estructura molecular de los principales alcoholes superiores influyentes en el flavor de la cerveza.**

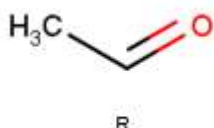
Los alcoholes superiores pueden tener un efecto positivo o negativo según su concentración, en este caso es más probable que su aporte sea negativo, por lo que la comprensión de los factores que afectan su síntesis es muy importante. Altas concentraciones de alcoholes superiores (>300 mg/L) en cerveza generan un flavor fuerte (a solvente) y pungente, lo que crea una sensación de calentamiento en boca, mientras que niveles adecuados pueden incrementar, en ciertos tipos de cerveza, la complejidad de bebidas fermentadas intensificando la percepción alcohólica. Asimismo, la relación entre la cantidad de alcoholes superiores y otros compuestos volátiles es de gran importancia. En las cervezas Lager es deseable una relación 4:1 o 3:1 de alcoholes vs. ésteres. Un aumento en esta relación, provocada por un incremento de alcoholes superiores, da como resultado cervezas más secas y con aromas de menor intensidad (Hirst, 2016).

Los alcoholes se producen por las levaduras durante la fase lag (o de aclimatación) de la fermentación, a partir de la síntesis o la degradación de aminoácidos (utilizando piruvato y acetil-CoA en el primer caso o después de la asimilación de la fuente de nitrógeno en el segundo). Es decir que la acumulación de alcoholes superiores en la cerveza es el resultado de la reproducción activa de la levadura, que demanda de aminoácidos para fabricar proteínas. El catabolismo de aminoácidos, después de que estos ingresan a las células de levadura, puede llevarse a cabo a través de la vía de Ehrlich. Esta vía incluye reacciones de

transaminación, descarboxilación y reducción para dar lugar a los alcoholes correspondientes, los cuales posteriormente son excretados al medio (Hazelwood, 2008).

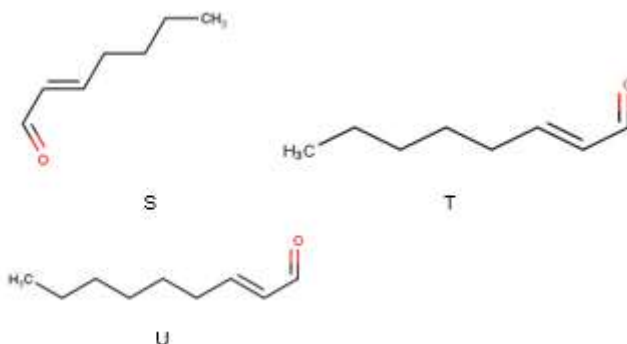
La producción de alcoholes superiores varía con las cepas de levadura utilizada. No obstante, otros parámetros fermentativos como la temperatura de fermentación, la aireación y el contenido de nitrógeno en el mosto también influyen en los niveles producidos de estos compuestos Figura 4 (Laundaud, 2010).

El acetaldehído (CAS 75-07-0) (Figura 5), es un compuesto intermedio en la formación del alcohol. Si la transformación de la glucosa en alcohol se detiene en la etapa de formación del acetaldehído, produce un gusto y un aroma a fruta, que normalmente desaparecen con mayor tiempo de acondicionamiento. Este puede ser originado por la cepa de levadura usada o por la finalización prematura de la fermentación, pudiendo darse por el agotamiento del oxígeno, cambios de temperatura y por la floculación prematura; o a su vez, por la exposición del alcohol al aire provocando su oxidación o la contaminación con ácido acético producido por una infección bacteriana (*Acetobacter*) (Gigliarelli, 2007).



**Figura 5. Estructura molecular del acetaldehído**

Además, el oxígeno contribuye a la producción de compuestos carbonílicos con umbrales de sabor muy bajo, es decir, que son detectados fácilmente por el consumidor, entre los más importantes tenemos (Figura 6): 2-heptenal (CAS 18829-55-5) (S), 2-octenal (CAS 2548-87-0) (T) y trans-2-nonenal (CAS 18829-56-6) (U). Por lo tanto, el contenido de oxígeno en la cerveza envasada debe ser bajo para lograr una mayor estabilidad del sabor (Morales-Toyo, 2018).

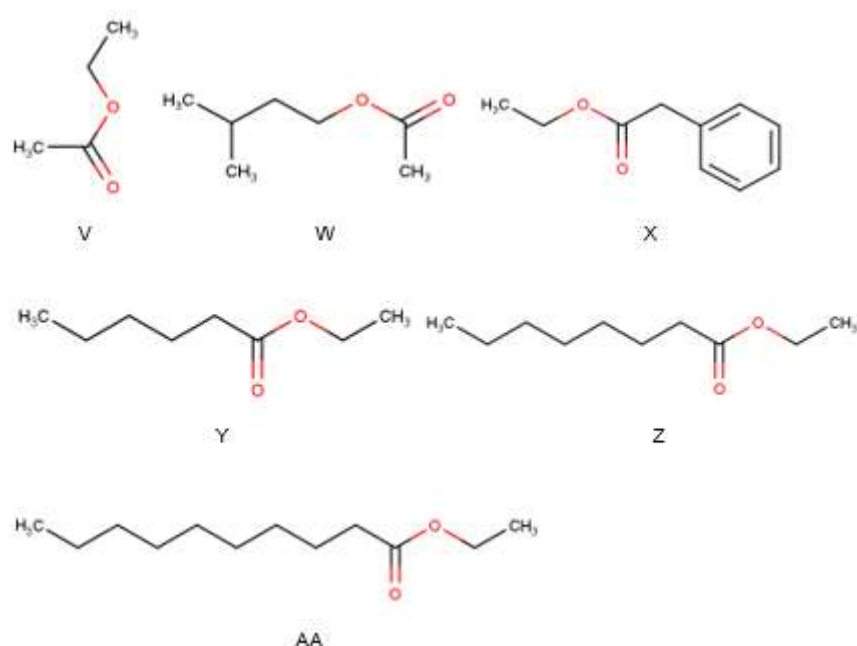


**Figura 6. Estructura molecular de los principales compuestos carbonílicos presentes en la cerveza.**

Con respecto a los compuestos fenólicos que se encuentran presentes en la cerveza, como son los ácidos fenólicos, flavonoides, pro-antocianidinas, taninos y compuestos amino fenólicos, son capaces de protegerla de la luz, por su capacidad de desactivación del triplete excitado de la riboflavina (Suárez, 2013).

La cerveza contiene diversos polifenoles, de los cuales la mayoría proviene de la malta y el resto del lúpulo (Gromus, 1998). Debido a sus propiedades específicas, son muy interesantes, tanto tecnológicamente como fisiológicamente (Hough, 1981). Están involucrados en el mantenimiento de la espuma, la estabilidad física y química, y la vida útil del producto; además de que pueden actuar como antioxidante del ácido ascórbico y los ácidos grasos insaturados.

Por otra parte, los ésteres son compuestos que representan el mayor nivel de concentración en la cerveza, son generados por las levaduras y se producen por la reacción enzimática entre un ácido orgánico y un alcohol. Se han detectado alrededor de 100 compuestos de este tipo, dentro de los más destacables dos grupos importantes (Figura 7): 1) ésteres de acetato, tales como el etil acetato (CAS141-78-6 ) (V), isoamil acetato (CAS 123-92-2) (W), feniletil acetato (CAS 101-97-3) (X) y 2) ésteres de etilo, tales como el etil hexanoato (CAS 123-66-0) (Y), etil octanoato (CAS 106-32-1) (Z) y etil decanoato (CAS 110-38-3) (AA) (Hernández, 2020).



**Figura 7. Estructura molecular de los principales ésteres influyentes en el flavor de la cerveza.**

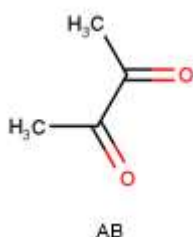
La cantidad que se genere de estos compuestos está definida por la temperatura de fermentación y la cepa de levadura que se emplee, es decir, cuanto más elevada sea la temperatura, la cantidad de ésteres producido también será mayor. Estos sabores frutados

pueden ser intencionales o defectuosos en la elaboración, de acuerdo al estilo de cerveza que se esté produciendo.

Estos compuestos se producen durante la fermentación primaria y se encuentra altamente asociada al metabolismo de lípidos y al crecimiento de las levaduras. Son sintetizados en el citoplasma a partir de reacciones catalizadas por enzimas aciltransferasas (o éster sintasas), en las que se requiere acil-CoA como co-sustrato. La mayor parte del acil-CoA demandado es formado por descarboxilación oxidativa del piruvato, dando lugar a acetil-CoA; mientras que el resto del acil-CoA es producido por la acilación entre ácidos grasos y la coenzima A (CoA) libre. La reacción entre acetil-CoA y un alcohol (etanol o alcoholes superiores), en ausencia de oxígeno, es capaz de permitir la formación de ésteres de acetato, como etil acetato, isoamil acetato, isobutil acetato y feniletil acetato; mientras que la combinación entre las cadenas largas de acil-CoA y etanol produce ésteres de etilo. Entre estos últimos, el etil hexanoato y el etil octanoato son de gran importancia para la obtención de cervezas balanceadas en cuanto a perfiles aromáticos (Loviso & Libkind, 2018). Después de ser sintetizados dentro de la célula, por su carácter lipofílico, los ésteres se pueden difundir a través de la membrana celular para ser liberados al medio de fermentación.

Los ésteres de etilo presentan una transferencia al medio que disminuye a medida que aumenta el tamaño de esa molécula, en comparación con los ésteres de acetato que son excretados inmediatamente y casi en su totalidad. El etil hexanoato es liberado en un 100%, mientras que este porcentaje puede llegar hasta un 68% y un 17% para el etil octanoato y el etil decanoato, respectivamente (Loviso & Libkind, 2018; Renger BRS, 1992).

El diacetilo (CAS 431-03-8) (Figura 8), es un compuesto que otorga un sabor particular a manteca o caramelo y lo produce de forma natural la levadura durante la fermentación, para luego reabsorberlo en la parte final del proceso. También es originado por una infección causada por *Pediococcus cerevisiae*.



**Figura 8. Estructura molecular del diacetilo.**

El diacetilo, en cantidades perceptibles, determina en gran medida el cuerpo y dulzor de la cerveza de ciertos estilos, como por ejemplo las Porter y Stout; mientras que en otros tipos es considerado una contaminación. Los altos niveles de diacetilo pueden darse por un enfriamiento muy largo del mosto, mala limpieza del equipo, trasvase demasiado temprano, altos niveles de adjuntos en el mosto. Otras consideraciones, tal vez más importantes, son una cantidad muy escasa de levadura al momento de inocular e insuficiente oxigenación, las

cuales provocarán que la fermentación se demore y antes de comenzar la fase primaria se generará una cantidad de diacetilo muy alta que no podrá ser consumida totalmente por la levadura al final del proceso, afectando el sabor de la cerveza (Gigliarelli, 2007).

## CAPÍTULO II: INFLUENCIA E IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS NO AZUFRADOS EN EL AROMA DE LA CERVEZA

Los ácidos orgánicos afectan el pH y sabor (agrio o ácido) de la cerveza, y proporcionan efectos fisiológicos positivos como la reducción del ácido úrico (Montanari, 1999). La presencia de estos ácidos también puede ayudar a aumentar la vida útil de la cerveza al inhibir el crecimiento de algunas bacterias de descomposición como la *Salmonella*.

La Tabla 3 muestra algunos componentes aromáticos relacionados con el metabolismo de las levaduras, entre los cuales se observa el umbral de percepción en la cerveza desgasificada y en algunos tipos específicos.

**Tabla 3. Algunos componentes aromáticos asociados al metabolismo de las levaduras en la cerveza.**

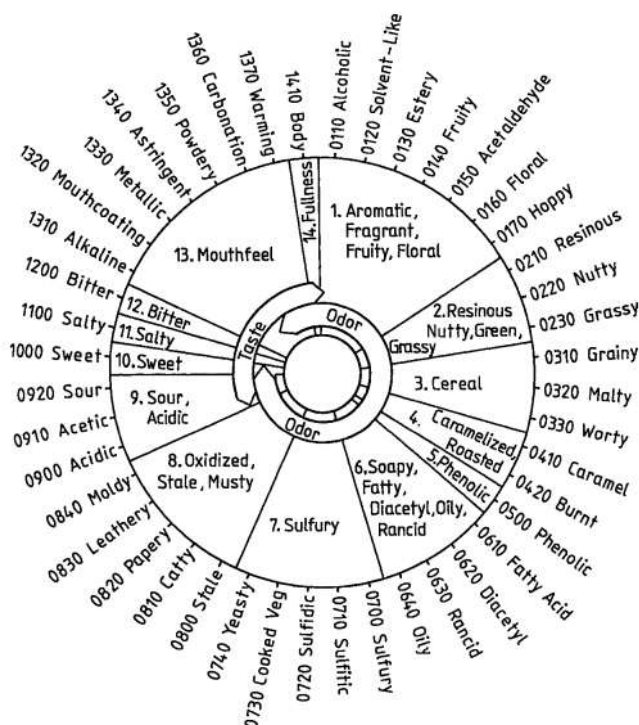
| Clase del producto | Nombre                          | Umbral de percepción en la cerveza desgasificada (ppm) | Contenido en la cerveza <<ale>> (ppm) | Contenido en la <<lager>> (ppm) | Contenido en la stout (ppm) |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>Alcoholes</b>   | Etanol (CAS 64-17-5)            | -                                                      | 27-32 x10 <sup>3</sup>                | 24 x 10 <sup>3</sup>            | 16-72 x10 <sup>3</sup>      |
|                    | Isopentanol (CAS                | 50                                                     | 47-61                                 | 32-57                           | 33-169                      |
|                    | B feniletanol (CAS 60-12-8)     | 50                                                     | 36-53                                 | 25-32                           | 20-55                       |
|                    | n-propanol (CAS 71-23-8)        | 50                                                     | 31-48                                 | 5-10                            | 13-60                       |
|                    | Isobutanol (CAS 78-83-1)        | 100                                                    | 18-33                                 | 6-11                            | 11-98                       |
|                    | 2-metil butanol (CAS 137-32-6)  | 50                                                     | 14-19                                 | 8-16                            | 9-41                        |
| <b>Ésteres</b>     | Acetato de etilo (CAS 141-78-6) | 5                                                      | 14-23                                 | 8-14                            | 11-69                       |
|                    | Acetato de isopentilo           | 1                                                      | 1.4-3.3                               | 1.5-2.0                         | 1.0-4.9                     |

|                  |                                   |       |           |           |           |
|------------------|-----------------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|
|                  | (CAS 137-32-6)                    |       |           |           |           |
| <b>Dicetonas</b> | Diacetilo (CAS 431-03-8)          | 0.005 | 0.06-0.30 | 0.02-0.08 | 0.02-0.07 |
|                  | Pentano 2, 3 diona (CAS 600-14-6) | -     | 0.01-0.20 | 0.01-0.05 | 0.01-0.08 |

En algunas cervezas puede derivar de las bacterias presentes durante la fermentación.

**Fuente:** Hough, 1990.

El perfil de sabor y olor de una cerveza, incluidos los posibles defectos de aroma, se puede describir en detalle con la ayuda de 44 términos agrupados en 14 términos generales, como se muestra en la Figura 9. Aparte de una gran variedad de términos para notas olfativas, los términos amargo, salado, metálico y alcalino se usan solo para el sabor; mientras que los términos agrio, dulce y "corporal" se aplican tanto al gusto como al olor (Belitz, 2009).



**Figura 9. Terminología para la descripción de las notas olfativas y gustativas de la cerveza.**

**Fuente:** Sociedad Estadounidense de Químicos Cerveceros, de acuerdo a Meilgaard, 1982.

Nueve de los términos presentados en la Figura 9 puntualizan las características de olor y sabor más significativos de una buena cerveza. También son adecuados para la diferenciación de los distintos tipos. Los ácidos grasos inferiores que están presentes en el

aroma de la cerveza actúan como antiespumantes. Los defectos de la cerveza que disminuyen el olor y el sabor, son causados por una producción y un almacenamiento incorrectos. Entre los ejemplos de defectos de sabor se tiene el áspero, duro y amargo producido por la oxidación de polifenoles y algunos componentes del lúpulo (Belitz, 2009).

El diacetilo y etanal en concentraciones superiores a 0,13 mg/L y 25 mg/L, respectivamente, producen un defecto en el sabor descrito anteriormente. La aceleración de la fermentación provocada, por ejemplo, por la agitación intensa del mosto, aumenta el contenido de diacetilo y alcoholes superiores en la cerveza y reduce el contenido de ésteres y ácidos. En general, el aroma se ve influenciado negativamente. Pueden surgir concentraciones más altas de etanal, por ejemplo, a altas temperaturas de fermentación y concentraciones altas de levadura (Belitz, 2009).

La cerveza es muy sensible a la luz y a la oxidación. El sabor "ligero" se debe a la formación de 3-metil 2-buten-1-tiol. Esta sustancia se vuelve desagradablemente perceptible a concentraciones superiores a 0,3 µg/L. La peroxidación enzimática de los lípidos contenidos en el mosto y las reacciones secundarias no enzimáticas durante la ebullición del mosto dan lugar a los defectos de aroma enumerados como No. 8 en la Figura 9. Un sabor dulce que se forma durante el almacenamiento de la cerveza es originado por un aumento de 3-metilbutanal, metional, fenilacetaldehído, metilpropanoato de etilo y 2-metilbutanoato de etilo. Se recomienda la adición de ácido ascórbico o glucosa oxidasa/catalasa para superar los defectos de color y sabor causados por la oxidación. Por lo tanto, el embotellado con bajo contenido de oxígeno es de gran importancia, por ejemplo, la cerveza embotellada no debe contener más de 1 mg/L (Belitz, 2009; Meilgaard MC, 1975).

Compuestos de carbonilo no deseados, que pueden producir un sabor desagradable en la cerveza almacenada, están enlazados por el sulfito derivado del metabolismo de la levadura. La levadura reduce el sulfato presente en el mosto en sulfito y sulfuro, que luego se consume en la biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre. Si el crecimiento de la levadura se detiene, se elimina el exceso de sulfito, aumentando la estabilidad de la cerveza a los procesos oxidativos (Belitz, 2009).

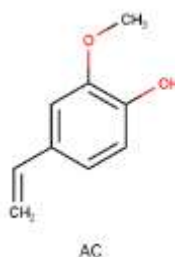
Una sustancia aromática muy potente es el 3-metil-3-mercaptoputil formiato, el cual puede producir un olor desagradable llamado "malicioso". La concentración de fenilacetaldehído también puede aumentar durante el almacenamiento hasta tal punto que la cerveza se vuelve perceptible en el aroma (Belitz, 2009). Durante el almacenamiento, la cerveza puede volverse turbia y formar un sedimento. Las proteínas y los polipéptidos constituyen del 40 al 75% de los sólidos que causan turbidez. Se vuelven insolubles debido a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, formación de complejos con polifenoles o reacciones con iones de metales pesados (Cu, Fe, Sn). Otros componentes del sedimento son carbohidratos (2 a 25%), principalmente  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos (Belitz, 2009).

Por otra parte, los ácidos tienen una actividad bacteriostática pronunciada e inhiben potentemente el crecimiento de bacterias Gram-positivas. Esta acción se ha atribuido a la interferencia del grupo prenilo, característico de las cadenas laterales de los ácidos del lúpulo, con la función de la membrana plasmática celular. Se considera que cuantos más grupos prenilo (3-metil-2-buten-1-il) estén presentes, más fuerte es la acción bacteriostática. Esta notable bioactividad es importante para matar microorganismos durante la ebullición del mosto, lo que finalmente conduce a una cerveza estéril (De Keukeleire, 2000).

Los aldehídos volátiles, como el trans-2-nonenal, se forman durante el almacenamiento de la cerveza embotellada a partir de varios precursores, incluidos los lípidos del lúpulo. Por otro lado, se sabe que la cerveza se descompone al exponerse a la luz, generando así un sabor desagradable a zorrillo. Por lo tanto, la cerveza debe almacenarse en recipientes que protejan de la luz, por ejemplo, latas opacas o en botellas de vidrio verdes y marrones (De Keukeleire, 2000).

La causa de este fenómeno es la vulnerabilidad de los iso-alfa-ácidos a la luz. La descomposición resultante conduce a la formación del llamado "sabor ligero". El cromóforo fotosensible en las isohumulonas es el grupo aciloína compuesto por la función alcohol terciario en el C4 y el grupo carbonilo de la cadena lateral también enlazada en el C4. La activación de, por ejemplo, las isohumulonas con luz ultravioleta provoca la ruptura del enlace mediante una reacción de Norrish Tipo I, lo que conduce a un par de radicales cetil-acilo. La pérdida posterior de monóxido de carbono del radical acilo y la recombinación del fragmento resultante con un radical tiol proporcionan 3-metil-2-buten-1-ol, también conocido como 'tiol skunky', junto con ácido deshidrohumulónico (De Keukeleire, 2000).

Por su parte, el 4-vinilguayacol (CAS 7786-61-0) (Figura 10) es miembro de un grupo de fenoles aromáticos monoméricos que incluye vainillina y se utiliza ampliamente como agente aromatizante en la industria alimentaria. Esta sustancia se la puede encontrar de forma natural en la mayoría de las cervezas (especialmente las de tipo ale), pero generalmente muy por debajo del umbral. Sin embargo, está presente en weissbiers (cervezas de trigo), rauchbiers (cervezas ahumadas) y algunas cervezas belgas especiales en concentraciones considerables, lo que generalmente imparte notas deseables especiadas, picantes y similares al clavo. Se produce por descomposición enzimática o térmica del ácido ferúlico (un ácido hidroxicinámico), que se encuentra en la cáscara de la malta de cebada. Puede derivarse de la liberación del precursor del ácido ferúlico que se encuentra en las maltas de trigo, en un grado más limitado. Con un umbral de detección de sabor bajo de aproximadamente 200 partes por mil millones (Oliver, 2011).



**Figura 10. Estructura molecular del 4 vinil guayacol.**

El 4-vinilguayacol también puede ser producido por levaduras silvestres y algunas bacterias. Por lo tanto, se puede considerar como indicador de contaminación causada por este tipo de microorganismos, a menos que se haya utilizado una cepa de levadura de cerveza de trigo específica o una cepa belga. Además, debido a que la descomposición del 4-vinilguayacol está relacionada con la producción de sabor a vainilla, se propone que el aroma similar al clavo en las cervezas especiales frescas, como las cervezas de trigo y las cervezas de estilo belga de alta fermentación, puede cambiar a impresiones de sabor más dulces y equivalentes a la vainilla a medida que envejecen estas cervezas. Asimismo, el 4-etilfenol otorga olor a caballeriza, típico de la fermentación del género *Brettanomyces* (González M., 2017).

Los dos grupos de ésteres, tanto de acetato como de etilo, son deseables en la gran mayoría de cervezas de tipo Ale (de fermentación alta) ya que contribuyen en aromas y sabores florales/frutales (Loviso & Libkind, 2018; Renger BRS, 1992). En la cerveza, los ésteres de etilo se encuentran en menor proporción que los ésteres de acetato. Comúnmente, estos compuestos se encuentran en concentraciones cercanas al nivel umbral de olor, por lo tanto, pequeñas variaciones en su concentración influirán directamente en el flavor de la cerveza (Tabla 4). Algunos de estos compuestos en concentraciones muy elevadas son capaces de otorgar aromas y sabores desagradables, por ejemplo, el acetato de etilo, que puede provocar un flavor a solvente.

Es importante mantener estos compuestos dentro de niveles adecuados de concentración para evitar desbalances en las características generales de la bebida, ya que existe la probabilidad de que muchos de éstos puedan tener un efecto sinérgico e influir directamente en la percepción general, aunque cada una de las concentraciones se encuentren por debajo del umbral. Por ello es necesario entender y controlar su formación, para ser capaces de ofrecer productos con características reproducibles que cumplan con los requerimientos y particularidades del consumidor (Loviso & Libkind, 2018).

**Tabla 4. Ésteres más relevantes en el flavor de la cerveza sintetizados por las levaduras.**

| Compuesto             | Valores umbrales (mg/L) | Descripción aromática                         |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|
| Etil acetato<br>(CAS) | 30                      | Solvente, frutado                             |
| Isoamil acetato       | 1,2                     | Banana                                        |
| Isobutil acetato      | 0,5                     | Frutado                                       |
| Feniletil acetato     | 0,3                     | Rosas, miel                                   |
| Etil hexanoato        | 0,21                    | Manzana, anisado                              |
| Etil octanoato        | 0,9                     | Manzana, pera, banana, ananá, floral, frutado |

**Fuente:** Loviso & Libkind, 2018.

El acetato de etilo (olor a solvente de pinturas) y el acetato de isoamilo (olor a plátano, frecuente en las cervezas de trigo) pueden ser deseables dependiendo del tipo de cerveza que se realice. Estos surgen como resultado de fermentaciones a altas temperaturas, por lo que son habituales en las cervezas tipo Ale (González M.,2017).

Los hidratos de carbono presentes en un mosto es de aproximadamente el 90%, sin embargo, en la industria cervecera se busca optimizar recursos, en este caso incorporando concentraciones altas de azúcares, que a más de otorgar alta densidad en el mosto, también evitan aumentar los gastos energéticos. No obstante, estos procesos provocan que se vea influenciado directamente el metabolismo de las levaduras, si no se mantiene un balance adecuado en la oxigenación y contenido de nitrógeno en el mosto, ocasionando una sobreproducción de ésteres de acetato, con la consecuente obtención de cervezas excesivamente frutadas y con un notable aroma a solvente (como por ejemplo la acetona). En fermentaciones con levaduras de tipo Lager y Ale se puede producir 25 y 45% de acetato de etilo, respectivamente; cuando existe un incremento en el contenido de hidratos de carbono empleado. Un mosto estándar contiene alrededor del 90% de hidratos de carbono, que incluyen azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas, cuyo perfil y concentración influirán directamente en la etapa de fermentación y el metabolismo de la levadura (He, Y.,2014). Para generar mostos de alta densidad, es habitual adicionar jarabes, por lo que además se debe tener en cuenta su composición de azúcares. Dependiendo del azúcar adicionado es posible generar más o menos compuestos del aroma y sabor (Loviso & Libkind, 2018). Al incrementar la concentración de sacarosa, los ésteres aumentan, mientras que, en el caso de la maltosa (debido a su metabolismo), disminuye la concentración de ésteres en comparación con fuentes de carbono más fácilmente asimilables

como la glucosa y fructosa. Por esta razón, cuando se adicionan juntos a fin de aumentar la densidad inicial del mosto, se debe considerar el tipo de azúcar agregado (Lei, 2016).

Al utilizar maltosa como única fuente de carbono en medio sintético, los niveles de ésteres como isoamil acetato y etil acetato generados por levaduras Ale y Lager son menores en contraste con medios que contienen únicamente fuentes de carbono más digeribles, como glucosa o fructosa. Asimismo, se demostró que mostos de alta densidad, con un 30% de jarabe de maltosa, producen una cantidad de ésteres de acetato y alcoholes superiores significativamente menor en comparación con mostos de alta densidad de pura malta (Younis & Stewart, 2013). Por otra parte, las levaduras expuestas a altas concentraciones de sacarosa presentan mayor estrés osmótico que en mostos de otra composición. Por esta razón se aconseja evitar altos niveles de este azúcar con el fin de obtener mostos de alta densidad (Loviso & Libkind, 2018).

En el mosto la concentración de compuestos nitrogenados influye tanto en el crecimiento de las levaduras como en la generación de compuestos volátiles responsables del aroma y sabor durante la fermentación. La fracción soluble de los compuestos nitrogenados está formada por un 20% de proteínas, un 22% de polipéptidos y un 58% de péptidos y aminoácidos libres, aproximadamente; siendo estos últimos la principal fuente asimilable de nitrógeno. Esta composición depende de las condiciones de producción. Además, se recomienda concentraciones de aminoácidos libres del orden de los 150-200 mg/L de mosto para lograr cervezas de buena calidad (Loviso & Libkind, 2018; O'Connor-Cox, 1989). Por su parte, el material nitrogenado presente en la cebada permite, a través del malteado y macerado, liberar entre 700 y 800 mg de nitrógeno por litro.

El perfil aromático de las cervezas no solo se ve influenciado por la cantidad de nitrógeno asimilable, sino también por el tipo de aminoácidos presentes en el mosto. La incorporación de aminoácidos como leucina, isoleucina o valina, que se metabolizan a través de la vía de Ehrlich, incitan en un aumento en la cantidad de alcohol isoamílico, 2-metil butanol, isobutanol y sus correspondientes ésteres de acetato. Concretamente, al utilizar la levadura Safale-S04, la adición de 0,750 g/L de L-leucina conduce a un aumento de un 41% en la concentración total de ésteres de acetato comparado con el control sin suplemento. En cambio, las concentraciones de ésteres de etilo pueden disminuir o no verse afectadas por el suplemento de aminoácidos, posiblemente por las modificaciones intracelulares en la concentración de acetil-CoA (Loviso & Libkind, 2018). La prolina y la histidina son otros aminoácidos de relevancia para el aroma y sabor de las cervezas. La incorporación de prolina en medio sintético permite la producción de mayores concentraciones de etil acetato en levaduras de tipo Ale y Lager. Este aminoácido no puede ser metabolizado por la vía de Ehrlich para dar lugar a un alcohol superior que sirva de precursor para la formación de ésteres, con lo cual su aporte a la formación de aromas en cervezas podría explicarse a través de la síntesis de

glutamato, metabolito que sí interviene en dicha vía (Hashimoto T., 2012; Loviso & Libkind, 2018).

La velocidad de formación y los niveles finales de ésteres de acetato también se ven incrementados al aumentar las cantidades de nitrógeno asimilable desde 115 mg/L hasta 433 mg/L, aunque solo cuando se utilizan mostos con densidades iniciales de 12 °P. En mostos más concentrados (>16 °P), un aumento similar en la fuente de nitrógeno puede provocar una disminución en la concentración de compuestos del aroma y sabor, tales como etil acetato y feniletil acetato. En mostos de alta densidad, las levaduras necesitan asimilar una cantidad extra de nitrógeno para hacer frente a las condiciones de estrés. Asimismo, una relación alta de la fuente de carbono con respecto a la de nitrógeno (C:N) provoca desbalances de nutrientes, que pueden impactar en la generación de compuestos aromáticos. En cuanto a los ésteres de etilo, el incremento en los niveles de nitrógeno no modifica sus concentraciones, independientemente de la densidad del mosto (Loviso & Libkind, 2018).

Se ha observado que la concentración final de ésteres en las cervezas se ve aumentada al utilizar mayores temperaturas de fermentación, aunque algunas cepas de levaduras pueden mostrar otros comportamientos en este sentido (Loviso & Libkind, 2018; Suomalainen, 1981). Un aumento de temperatura genera una mayor concentración de alcoholes superiores (compuestos necesarios para la síntesis de ésteres). Varios estudios proponen que la temperatura afecta principalmente la actividad de las enzimas que intervienen en su formación o la biosíntesis de aquellas (Loviso & Libkind, 2018; Zhang, 2013). Si bien la temperatura de fermentación no es determinante en la síntesis de ésteres de etilo, se dice que la liberación de estos compuestos se vería facilitada con los aumentos de temperatura, por favorecer la eficiencia de excreción o la autólisis de las levaduras (Loviso & Libkind, 2018; Zhang, 2013).

En diferentes condiciones de fermentación, la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos podría ser un blanco para la modificación de los niveles de ésteres de etilo en cerveza. La adición de lípidos al mosto, especialmente de ácidos grasos insaturados, puede eliminar los requerimientos de aireación al inicio de las fermentaciones. Empero, los ácidos grasos insaturados aún pueden inhibir la producción de ésteres. Una cantidad reducida de oxígeno en el mosto, además de evitar la inhibición de la formación de ésteres, evita la oxidación de compuestos como polifenoles, iso-alfa-ácidos y alcoholes superiores y, por lo tanto, el deterioro organoléptico de las cervezas producidas (Loviso & Libkind, 2018; Thurston, 1982).

La influencia del dióxido de carbono en la concentración final de ésteres se debe a la inhabilitación de la síntesis de sustratos necesarios para la generación de estos compuestos. Al ejecutar fermentaciones a gran escala el dióxido disuelto puede llegar a grandes concentraciones. Por su mayor altura, los fermentadores utilizados en este tipo de procesos

generan una mayor presión hidrostática, lo cual favorece la disolución del dióxido de carbono (Loviso & Libkind, 2018).

A pesar de que una disminución en la concentración de ésteres es usualmente indeseable, cuando se manejan temperaturas de fermentación elevadas y mostos con alta densidad inicial se puede aplicar dióxido de carbono para controlar la formación de compuestos responsables del aroma y sabor. Cuando se eleva la temperatura de fermentación a presión atmosférica se produce un rápido y mayor crecimiento de las levaduras, lo que hace que la fase de adaptación de las levaduras al medio disminuya o prácticamente desaparezca. En esas condiciones, la velocidad de producción de ésteres de acetato también aumenta y puede alcanzar su pico máximo alrededor de los 50 min de iniciada la fermentación. Para evitar concentraciones muy elevadas de ésteres a altas temperaturas de fermentación es posible incrementar la presión de dióxido luego de 25-30 h. Esto permite que luego de la fase inicial, al aplicar presión, el crecimiento de las levaduras se ralentice y la producción de ésteres disminuya (Loviso & Libkind, 2018; Saerens, 2008).

El diferente aroma y sabor generado por un tipo de levadura respecto de otro (en vinculación directa con los ésteres producidos) puede deberse a diferencias interespecíficas en términos genómicos, en los mecanismos de regulación de la expresión de los genes responsables de la síntesis de dichos ésteres y en la actividad de las enzimas participante (Loviso & Libkind, 2018; Suomalainen, 1981).

La formación de ésteres también podría verse influenciada por el nivel de ploidía (cantidad de juegos de cromosomas) en las levaduras, ya que un incremento en el número de copias de un gen generalmente origina un aumento de su expresión y fenotipos diferentes. Cepas de levaduras Lager pertenecientes al grupo I (Saaz), que tienen aproximadamente tres juegos de cromosomas (alotriploide), generan menores cantidades de ésteres (como isoamil acetato, etil acetato e isobutil acetato) respecto de cepas del grupo II (o Froberg), que poseen cuatro juegos de cromosomas (alotetraploide) (Loviso & Libkind, 2018; Saerens, 2008).

Con el aumento en la demanda de productos que satisfagan los deseos de los consumidores en cuanto a mayor diversidad de aromas y sabores, los productores de bebidas fermentadas han incrementado su interés en el uso de levaduras no convencionales o salvajes. Entre ellas pueden distinguirse dos tipos: las levaduras sacaromicéticas y las no sacaromicéticas (por ejemplo, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*). Estas levaduras son de particular interés porque pueden producir una amplia variedad de compuestos aromáticos que contribuyen positivamente en el perfil aromático general, entre ellos, los ésteres. Por tal motivo existe una renovada tendencia hacia la búsqueda de nuevas levaduras que puedan aportar complejidad de sabores y aromas a las cervezas, ya que se las considera promisorias herramientas para uso en «bioflavoring» o como biosaborizantes (Loviso & Libkind, 2018; Saerens, 2008).

Generalmente, las levaduras de tipo Lager otorgan aromas y sabores más nítidos, asociados a una producción de bajos niveles de alcoholes superiores y ésteres comparados con levadura de tipo Ale (Walther, 2014). A su vez, dentro de las levaduras de tipo Lager se pueden diferenciar dos grupos con características específicas: grupo I o Saaz y grupo II o Froberg (Steensels, 2014). Respecto a la generación de alcoholes superiores, se han ejecutado fermentaciones a temperaturas entre 10°C y 14°C con levadura del grupo II (tipo Lager), las cuales han sido capaces de producir entre 1 y 14mg/L más de isobutanol, alcohol amílico y alcohol isoamílico a comparación de las pertenecientes al grupo I (Walther, 2014). Estos diferentes niveles en la producción de alcoholes superiores pueden deberse a diferencias genéticas, regulatorias, y de expresión de los genes. Los principales alcoholes superiores presentes en las cervezas se pueden apreciar en la Tabla 5.

**Tabla 5. Principales alcoholes superiores influyentes en el flavor de la cerveza.**

| Alcoholes superiores              | Valores umbrales*<br>(mg/L) | Descripción<br>aromática |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Propanol (CAS 71-23-8)            | 700                         | Solvente, dulce, alcohol |
| Isobutanol (CAS 78-83-1)          | 200                         | Solvente, alcohol        |
| Feniletanol (CAS 98-85-1)         | 50-65                       | Frutado, banana, alcohol |
| Alcohol amílico (CAS 71-41-0)     | 50-70                       | Alcohólico, solvente     |
| Alcohol isoamílico (CAS 123-51-3) | 40                          | Floral, rosas            |

\* Detectados por el humano.

**Fuente:** Pires et al ,2014.

Se ha demostrado que existe potencial en levaduras no convencionales como herramientas de innovación en la producción de cerveza, dentro de las más destacadas tenemos *Brettanomyces bruxellensis*, *Torulaspora delbruekii*, *Pichia kluyveri*, *Nanmovia dairenensis* y *S. eubayanus*, las mismas que difieren en su capacidad fermentativa y en la producción de compuestos de sabor y aroma, entre otras características (García M., 2017).

Para que las enzimas y coenzimas de las levaduras funcionen de manera correcta, es necesario que los iones y vitaminas se encuentren en cantidades suficientes de tal manera que las levaduras puedan proliferar y fermentar de manera eficiente, caso contrario la deficiencia de los iones o vitaminas puede alterar el metabolismo y el flavor del producto final (Walker, 2004). Generalmente el mosto contiene la cantidad de iones inorgánicos suficiente, sin embargo, en algunos casos es necesario un suplemento adicional, como el zinc). Este compuesto es de suma relevancia en la producción de alcoholes superiores, no obstante,

solo concentraciones elevadas (10ppm) en el mosto se asocian con diferencias importantes en los niveles de alcoholes superiores (De Nicola & Walker, 2011).

El acetaldehído presenta un sabor y aroma a manzanas verdes o a sidra. Presenta además un sabor a ácido acético o vinagre cuando su concentración es elevada. Este compuesto se ha determinado en cerveza en concentraciones de hasta 20mg/L. El consumo excesivo de etanol puede inducir un envenenamiento por acetaldehído después de una oxidación del mismo en el hígado por el alcohol deshidrogenasa.

El diacetilo imparte a la cerveza un fuerte bouquet y aroma a mantequilla a concentraciones de 1ppm (Hough,1990). La generación de este compuesto se ve influenciado por 3 factores: como subproducto de la levadura durante la fermentación, contaminación bacteriana o por añejamiento (Diacetilo en la cerveza: formación, reducción y control). La formación de diacetilo empieza con el ácido pirúvico o piruvato y el acetaldehído, que son transformados en ácidos alfa-acetolácticos o alfa acetolactatos dentro de las células de la levadura. Al fugarse este ácido del interior de la levadura, aparentemente por oxidación, es transformado en diacetilo. Los niveles de diacetilo se ven influenciados directamente por el grado de floculación de las levaduras. Por esta razón muchos cerveceros prefieren cepas de levaduras con baja precipitación, de tal forma que permanezcan mayor tiempo en suspensión de modo de completar la fermentación y la reducción de diacetilo, ocasionando luego a través del frío la floculación de las mismas. La segunda causa en importancia en la producción de diacetilo es la infección bacteriana. Las principales bacterias son *Lactobacillus* y los *Pediococcus*, estas bacterias generan ácido láctico por ende cuando se percibe una nota mantecosa, con un carácter ácido, es casi seguro que la cerveza está contaminada (The Beer Times, 2017).

El proceso es similar a la oxidación del alfa acetolactato. La razón está determinada por cepas de levaduras que no logran metabolizar todo el ácido alfa acetolactato dejando atrás altas cantidades del mismo, que luego será oxidado y transformado en diacetilo. Es importante controlar la temperatura de fermentación, emplear maltas de alta calidad ,alto contenido de nitrógeno, Amino Nitrógeno Libre (FAN), enfriar rápidamente el mosto y a su vez controlar su pH, de la misma forma implementar buenas prácticas de sanitización, garantizar un proceso de fermentación completa, limitar y controlar la oxigenación durante el proceso de embotellamiento, minimizando la agitación (The Beer Times, 2017).

Por su parte, los compuestos fenólicos tienen flavor a clavo de olor o medicinal. Este aroma es aceptado en algunas cervezas belgas, ahumadas y de trigo y se puede generar a partir de la levadura utilizada, de la malta (si es de trigo o sorgo), de la contaminación con levaduras salvajes, del uso de limpiadores a base de cloro o yodo o de clorofenoles en el agua. Las concentraciones de precursores de sabor fenólico están influenciadas por el empleo de tecnología de malteado y macerado, así como la elección de materia prima de trigo o cebada. Los ácidos fenólicos tienen altos umbrales sensoriales (umbrales de reconocimiento del gusto

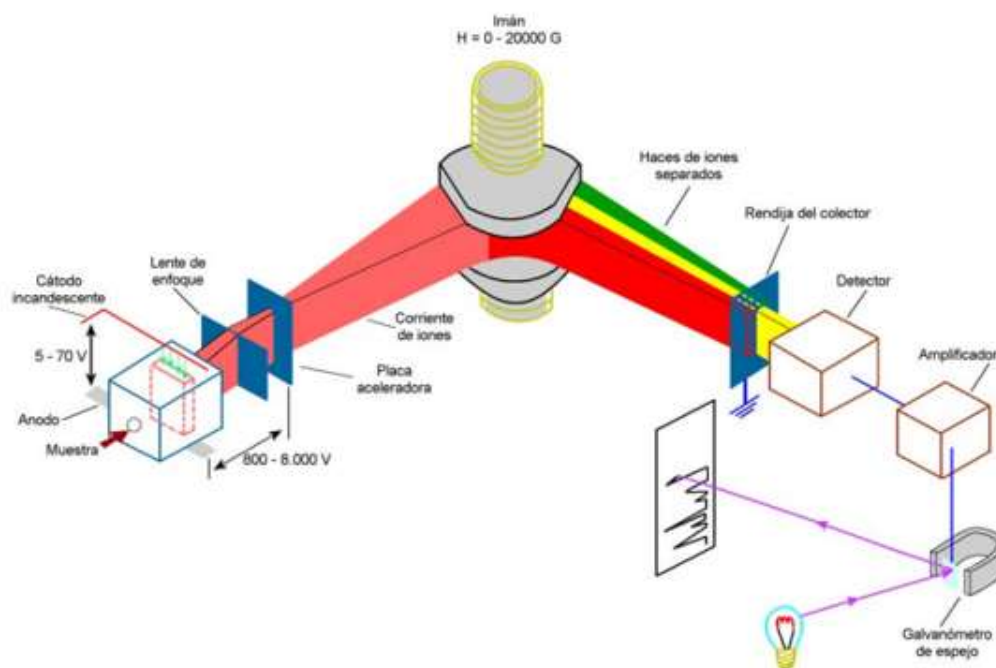
de 67 a 139 mg/L para el ácido cinámico y de 206 a 315 mg/L para derivados del ácido benzoico) (Hufnagel & Hofmann, 2008).

Los polifenoles son compuestos de gran importancia ya que son antioxidantes importantes, en la cerveza generalmente el 70 - 80% de la fracción del polifenol se origina de la malta de cebada y el otro 20 - 30% del lúpulo. Los polifenoles de peso molecular bajo son particularmente excelentes antioxidantes. El poder reductor disminuye conforme incrementa su peso molecular. Además, debido a la reacción fotoquímica de las resinas del lúpulo cuando son expuestas a la luz, se presenta un sabor a zorrillo u orina de gato que no debe estar presente en ningún estilo de cerveza (Bugghey, 2001).

Por su parte, la limpieza y desinfección de equipos e instalaciones en las industrias es de suma importancia, debido a que puede poner en riesgo este producto, contaminarlo e incluso ocasionar sabores y aromas que no se desean en la cerveza. Por lo tanto, se recomienda que estas acciones sean minuciosas y constantes, para garantizar su calidad. Es necesario tener presente el tratamiento del agua, una de las materias primas más importantes, que cuente con los requisitos de acuerdo al tipo de cerveza que se desee producir. Finalmente, se recomienda mantener la cerveza en refrigeración, no en congelación, para garantizar la vida útil del producto y a su vez la calidad, ya que, si se encuentre sometida a temperaturas altas, es decir al calor, la velocidad de las reacciones químicas de oxidación incrementará, por ende, se generarán los aromas y sabores desagradables (Homebrewers Association, 2021).

## CAPÍTULO III: MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS NO AZUFRADOS PRESENTES EN CERVEZA

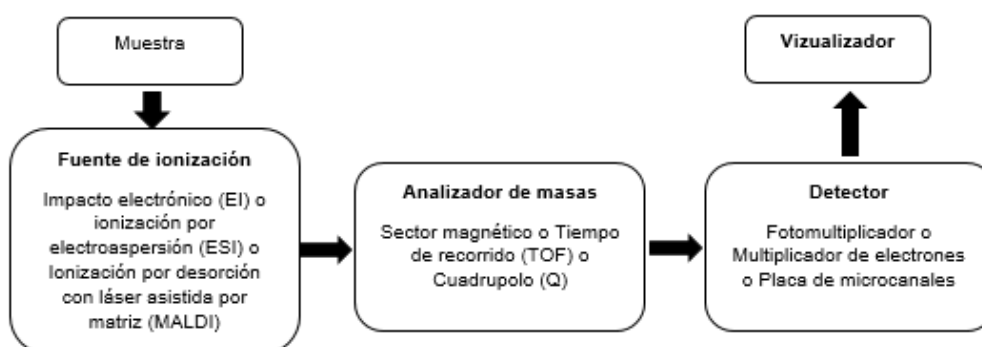
### 3.1. Métodos espectroscópicos



**Figura 11. Esquema de un espectrómetro de masas de ionización con electrones y sector magnético.**

**Fuente:** McMurry, 2018.

En esta técnica las moléculas se ionizan al colisionar contra electrones de alta energía, causando que se fragmenten algunas de las moléculas. El paso de los fragmentos cargados a través de un campo magnético los separa de acuerdo con sus masas (McMurry, 2018). Aquí se mide la masa molecular (MM) de una molécula, existen alrededor de 20 diferentes tipos de espectrómetros de masas que dependen de la aplicación que se requiera; sin embargo, todos tienen tres partes básicas: una fuente de ionización en donde se da una carga eléctrica a las moléculas, un analizador de masas en el que los iones se separan por su relación de masa a carga ( $m/z$ ) y un detector en donde se registran los iones separados, Figura 11.



**Figura 12. Partes básicas de un espectrómetro de masas.**

**Fuente:** McMurry, 2018.

### 3.1.1. Determinación de polifenoles totales

Los métodos según la Comisión de Análisis de la Cervecería de Europa Central (MEBAK como su nombre registrado) y Sociedad Americana de químicos cerveceros (ASBC por sus siglas en inglés) son semejantes. Los polifenoles de la muestra reaccionan con los iones de hierro (III) en la solución alcalina y forman complejos de color de hierro (rojo). Se mide la absorbancia mediante espectrofotometría, en una cubeta de 10 mm a una longitud de onda de 600 nm.

El cálculo de la concentración se realiza de la siguiente manera:

$$\text{Absorbancia a } 600 \text{ nm} * 820 = \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ de polifenoles totales}$$

El intervalo dentro del cual se encuentra el contenido de polifenoles totales en la cerveza es de 150 a 200 mg/L. De esta forma, el rango de medición de los programas es de hasta 800 mg/L.

En el espectrofotómetro UV-VIS ,DR600, desarrollado por Hach ofrece escaneados de longitud de onda de alta velocidad a través del espectro UV y visible, y viene con más de 250 métodos preprogramados, que incluyen los métodos de análisis más comunes que se utilizan actualmente.

Los programas de medición de los polifenoles totales están disponibles para su medición según la MEBAK y la ASBC, ofreciendo el mismo rango de medición de entre 0 a 800 mg/L, recalcando que en el programa 2006 de la MEBAK determina fenoles y en el programa 2020 de la ASBC cuantifica polifenoles.

### 3.1.2. Determinación de dicetonas vecinales

Según la técnica de la MEBAK, las dos dicetonas, el diacetilo y la 2,3-pentanodiona, reaccionan con la 1,2-fenilendiamina y forman un producto final incoloro, el cual se mide a una longitud de onda e 335 nm en una cubeta de cuarzo. Este método, usado con frecuencia en análisis operativos, es obviamente más rápido que el método por cromatografía de gases; no obstante, impide la diferenciación entre el diacetilo y la 2,3-pentanodiona.

Con la calibración realizada por MEBAK, el contenido de dicetonas vecinales (DCV) se calcula del siguiente modo:

$$\text{Absorbancia a } 335\text{nm} * 1,2 = \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ de DCV}$$

El valor estándar para la cerveza clara es inferior a 0,15 mg/kg.

Con el método según la ASBC tampoco se registra el diacetilo de forma independiente, sino todas las diacetonas vecinales presentes. Según el método ASBC Beer-25 B, el diacetilo (y

la 2,3-pentanediona) reaccionan con una solución de naftol y forma un complejo de color violeta, que se mide a una longitud de onda de 530 nm. Este método ha sido calibrado por Hach con soluciones estándar de diacetilo y el factor correspondiente se ha almacenado en el programa. Por ende, se puede omitir una medición por parte del usuario de los estándares del diacetilo para el registro de una curva de calibración. Con este tipo de calibración, el contenido de dicetonas vecinales se calcula del siguiente modo:

$$\text{Absorbancia a } 530 \text{ nm} \times 3,7 = \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ de diacetilo (dicetonas vecinales)}$$

En el sistema DR6000, los programas de medición de las dicetonas vecinales están disponibles para su medición según la MEBAK y la ASBC.

Existe un rango de detección de entre 0 a 1 mg/kg de dicetonas vecinales (DCV), en el programa 2014 de la MEBAK, y en el mismo rango, pero en mg/L para determinar diacetilo de acuerdo a la ASBC, con el programa 2023.

Nota: existe una cubeta test de Hach con el número LCK242 (solo disponible en Europa) o TNT819 (disponible en EE. UU.) para la determinación de las dicetonas vecinales.

### 3.1.3. Capacidad de reducción

Se refiere a la rapidez del proceso electroquímico en el que un átomo o un ion (de ciertos compuestos presentes en la cerveza) gana electrones. Se miden por su efecto reductor en el reactivo de Tillman (DPI). La decoloración de este reactivo en presencia de la muestra de cerveza se mide a una longitud de onda de 520 nm y se compara con la coloración original del reactivo que es de color púrpura. Esta capacidad de reducción se expresa mediante un número adimensional, el cual indica qué porcentaje de reactivo reduce la muestra de cerveza.

En la evaluación de la capacidad de reducción de las cervezas se aplica la siguiente escala según la MEBAK:

60 Muy buena

De 50 a 60 Buena

De 45 a 50 Satisfactoria

< 45 Pobre

En el espectrofotómetro R6000, el programa para la medición de este parámetro está disponible según lo establecido por la MEBAK.

Capacidad de reducción Programa 2004 De 0 a 100.

### 3.1.4. Determinación de iso- $\alpha$ - ácidos.

Se determina de forma cuantitativa la presencia de estos compuestos mediante espectrofotometría UV, empleando una longitud de onda de 275 nm, empleando isooctano en la muestra, siempre y cuando se encuentre en un medio acidificado, para de esta forma extraer los iso  $\alpha$  ácidos presentes. Luego de ello, se mide la absorbancia de la muestra con respecto a la de iso -octano puro (Picón, 2020).

Se determina el valor de unidades internacionales de amargor IBU (por sus siglas en inglés) mediante cálculos, basándose en la absorbancia a 275 nm ( $A_{275}$ ). Para relacionar la  $A_{275}$  con el número de IBU, conociendo que 1 unidad IBU equivale a 1 ppm de  $\alpha$ -ácidos, se toma el promedio de las mediciones realizadas redondeando a la unidad decimal más próxima. De acuerdo con métodos MEBACK y ASBC se determina el valor de IBU.

$$IBU (50) = 50 \cdot A_{275}$$

Dónde, IBU (50), son las unidades de amargor en función del lúpulo usado, 50 es una constante propuesta por MEBACK y ASBC.

Para el análisis de la cerveza terminada se emplea 50 y si se mide el amargor en una muestra de mosto se multiplica por 100. El procedimiento en cuanto a preparación de la muestra también variaría (Picón, 2020).

Los valores estándar según la MEBAK son de 10 a 40 unidades de amargor (BU por sus siglas en inglés) para la cerveza y de 20 a 60 BU para el mosto. De acuerdo con la ASBC, el rango de medición de la cerveza es de 100 unidades, mientras que para el mosto es de 200 unidades y se indica en IBU. En el DR6000, los programas de medición de las unidades de amargor están disponibles según la MEBAK y la ASBC.

Unidades de amargor, cerveza Programa 2001 De 10 a 40 BU

Unidades de amargor, mosto Programa 2003 De 20 a 60 BU

Unidades de amargor ASBC, cerveza\* Programa 2021 De 10 a 100 IBU

Unidades de amargor ASBC, mosto\* Programa 2011 De 20 a 200 IBU

### 3.1.5. Determinación de iso- $\alpha$ y $\beta$ -ácidos

Esta determinación se la realiza posterior a la extracción de las sustancias que amargan a la muestra con isooctano, posteriormente el contenido en iso- $\alpha$  y  $\beta$ -ácido se identifica midiendo la absorbancia de la muestra a 255 nm y 360 nm. Se emplea una cubeta de cuarzo de 10 mm y ambos tipos de ácido se determinan en una medición combinada a dos longitudes de onda.

Los valores estándar según la MEBAK son:

Cerveza: 10 - 40 mg/L de iso- $\alpha$ -ácidos y menos de 2 mg/L de  $\beta$ -ácidos

Lúpulo: 15 - 50 mg/L de iso- $\alpha$ -ácidos y menos de 1 - 15 mg/L de  $\beta$ -ácidos

En el sistema DR6000, el programa para medición de los iso- $\alpha$  y  $\beta$ -ácidos está disponible según lo establecido por MEBAK.

Iso- $\alpha$  y  $\beta$ -ácidos Programa 2013 De 0 a 60 mg/L de iso- $\alpha$ -ácidos y de 0 a 80 mg/L de  $\beta$ -ácidos.

### **3.1.6. Determinación de alcoholes superiores**

El método espectrofotométrico se basa en la determinación del contenido de los alcoholes superiores 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol, por medio de la reacción con una solución de p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB) en medio ácido. La intensidad del complejo formado se establece por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm (Oficina Nacional de Normalización de Cuba, 2007)

### **3.1.7. Determinación de diacetilo en cerveza (ASBC)**

Se denomina el Método de amplio espectro para DCV. La base de este método es la reacción de diacetilo con  $\alpha$ -naftol y creatina en un medio alcalino para formar un producto de reacción coloreado, que se mide mediante espectrofotometría, la cual tiene un rango de medida de 0,0 - 4,0 mg/L de diacetilo (Supelco, 2020). Se debe eliminar el dióxido de carbono de la muestra y se debe calibrar el método utilizando una curva de calibración adecuada.

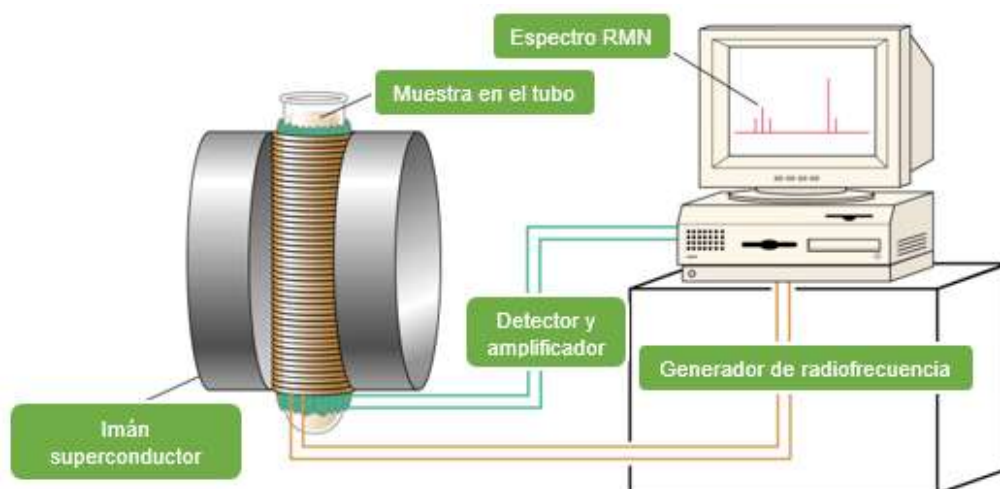
### **3.1.8. Determinación de acetaldehído**

El acetaldehído se oxida cuantitativamente en ácido acético en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH) y nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>).



La cantidad de nicotinamida adenina dinucleótida (NADH) que se forma en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de acetaldehído. Lo que se mide es el NADH, por el aumento de la capacidad de absorción a 340 nm (Beutler O., 1988).

### 3.1.9. Espectroscopía por RMN



**Figura 13. Operación esquemática de un espectrómetro de RMN.**

**Fuente:** Laurella, 2017

La resonancia magnética es un método que garantiza rapidez y sencillez en el modo de trabajo, tiene muchos beneficios con respecto a las técnicas previamente descritas. En particular, es no destructiva, fácil de cuantificar, requiere poca o ninguna separación, permite la identificación de nuevos compuestos y no requiere inducción química. Existe un tratamiento previo que se requiere realizar para su efectivo resultado (López, 2012).

La RMN es adecuada para compuestos que son difíciles de manipular mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) o análisis mediante cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (LC-MS), como azúcares, aminos, cetonas volátiles y compuestos relativamente no reactivos. Por otro lado, la principal desventaja de la RMN es que es una técnica relativamente sensible con un límite de detección más bajo de aproximadamente 1-5  $\mu\text{M}$  y un tamaño de muestra relativamente grande (500  $\mu\text{L}$ ) (Wishart, 2008).

Es un método espectroscópico de análisis que se basa en una característica intrínseca de los núcleos, sus propiedades magnéticas. La absorción de energía de radiación electromagnética por parte de los núcleos atómicos que tienen un momento magnético. Esta absorción se lleva a cabo cuando existen frecuencias específicas que están relacionadas con el tipo de núcleo y del entorno molecular en el que se encuentran y solo tienen lugar en presencia de un campo magnético intenso.

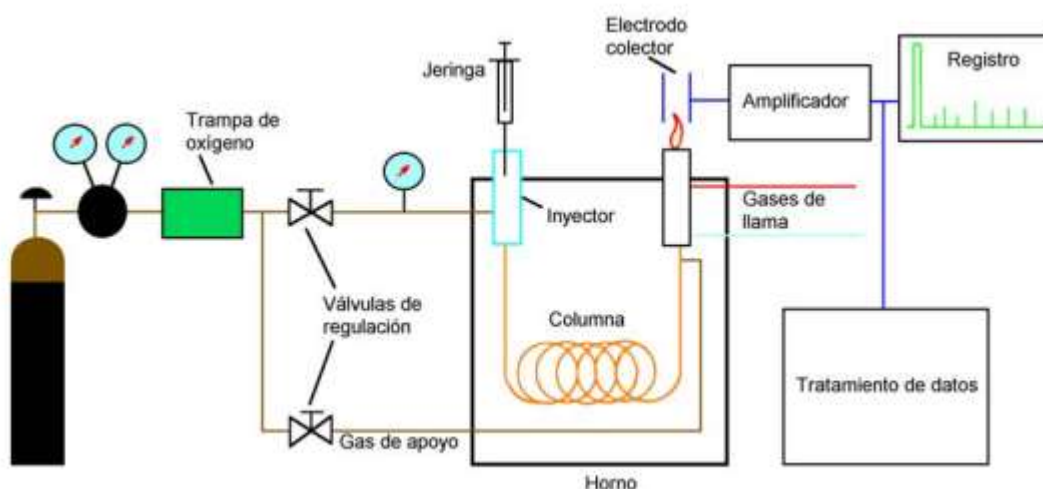
Los momentos magnéticos de los distintos núcleos, en presencia de un campo magnético externo, se alinean respecto a dicho campo externo. Solo cuando se les aplica un pulso de radiofrecuencia, perpendicular al campo magnético externo, se les aparta del estado de

equilibrio y de esta forma se observa su estado de vuelta al mismo y se detecta la señal que genera.

Dentro del espectrómetro existe un imán que es la pieza fundamental para llevar a cabo el análisis ya que va a proporcionar el campo magnético, y de igual forma debe cumplir con ciertas características en cuanto a la intensidad, estabilidad, homogeneidad del campo magnético que puede generar.

## 3.2. Métodos cromatográficos

### 3.2.1. Cromatografía de gases



**Figura 14. Esquema general de un cromatógrafo de gases.**

**Fuente:** Huertas & Sánchez, 2012

#### 3.2.1.1. Cromatografía de gases con detección de ionización de llama (FID):

Este método es el más empleado en cromatografía de gases en general. Las aguas residuales de la columna se dirigen a una pequeña llama de hidrógeno y aire, en el detector. La mayoría de los compuestos orgánicos producen electrones e iones durante la pirólisis a la temperatura de una llama de hidrógeno y aire. La detección implica monitorear la corriente generada por la recolección de estos portadores de carga. El detector de ionización de llama es un detector sensible a la masa en lugar de un dispositivo sensible a la concentración porque responde al número de átomos de carbono que ingresan al detector por unidad de tiempo. Además, este detector tiene la ventaja de que las fluctuaciones en el flujo de la fase móvil tienen poco efecto sobre la respuesta del mismo. Contemporáneamente, el detector no se ve afectado por gases no inflamables como vapor de  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$ ,  $CO$ , gases nobles y  $NO_x$ . Estas propiedades hacen del detector de ionización de llama una de las herramientas más utilizadas para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos, sin dejar de lado los contaminados con agua, nitrógeno y óxidos de azufre (Skoog, 2007).

### **3.2.1.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

Es la técnica analítica más empleada para la determinación e identificación de compuestos orgánicos volátiles (Da Silva, 2008). Sin embargo, la cerveza contiene también componentes no volátiles, por esta razón la inyección directa en el GC conducirá a la contaminación del instrumento, por lo que los compuestos volátiles se deben extraer primero utilizando técnicas de espacio de cabeza (HS) y/o métodos de microextracción en fase sólida (SPME) (Kobayashi, 2008).

La extracción del espacio de cabeza es un método eficaz para medir compuestos volátiles en muestras que tienen una matriz compleja, como es el caso de la cerveza. Esta técnica se basa en tomar muestras de la fase de vapor (espacio de cabeza) por encima de la muestra líquida en un vial cerrado y luego medirlas por cromatografía de gases. El uso de HS-GC junto con SPME aislará la muestra volátil, mientras reduce en gran medida la interferencia de compuestos no volátiles, esta combinación de técnicas se ha aplicado con éxito a varios análisis de aroma en cerveza (Charry, 2011). La SPME elimina el uso de sustancias potencialmente tóxicas, disolventes orgánicos y requiere una preparación mínima de la muestra (Kobayashi, 2008).

Existen dos tipos de análisis de espacio de cabeza: estático y dinámico, también denominados de purga y trampa. En el primero se analiza por CG una fracción de la fase gaseosa que se toma directamente de un vial sellado que ha sido previamente calentado. En el segundo se hace pasar una corriente de gas a través de la disolución, la cual arrastra de modo continuo los compuestos volátiles que se extraen de la disolución. La corriente de gas se hace pasar por una trampa que retiene los analitos. Este mecanismo de retención se da de dos modos básicos, por cricondensación o por adsorción. Posteriormente, se provoca la desorción mediante el calentamiento de la trampa, tras lo cual los analitos se introducen en el Cromatógrafo de Gases.

El espacio de cabeza estático resulta de gran utilidad para el análisis de compuestos de bajo punto de ebullición, ya que estos compuestos suelen perderse en los procesos de aislamiento y sobre todo en la etapa de evaporación del disolvente. El espacio de cabeza dinámico se utiliza cuando lo que requiere es aislar compuestos de alto punto de ebullición o alcanzar un elevado grado de concentración de los compuestos volátiles presentes en el alimento en bajas concentraciones. Los inconvenientes que plantea esta técnica es la gran cantidad de tiempo que se requiere en la etapa de recuperación de los compuestos, pudiendo variar desde 6h hasta 5 días (Escobal, 1999).

### **3.2.1.3. Determinación de alcoholes superiores**

La cromatografía de gases es una de las técnicas más empleadas la cual consiste en que la muestra es volatilizada e inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica. Los

componentes presentes en la muestra se distribuyen entre la fase móvil y estacionaria que se detalla a continuación.

Está conformada por dos fases: la fase móvil (gas portador que puede ser: nitrógeno, helio, argón e hidrógeno, etc) y la fase estacionaria en la que se determinan los componentes mayoritarios tales como aldehídos, ésteres, ácidos y alcoholes, los cuales eluyen a diferente velocidad en relación de sus distintas afinidades con la muestra, de este modo se afirma que la más utilizada es la tipo carbowax donde el material que se emplea es el polietilenglicol.

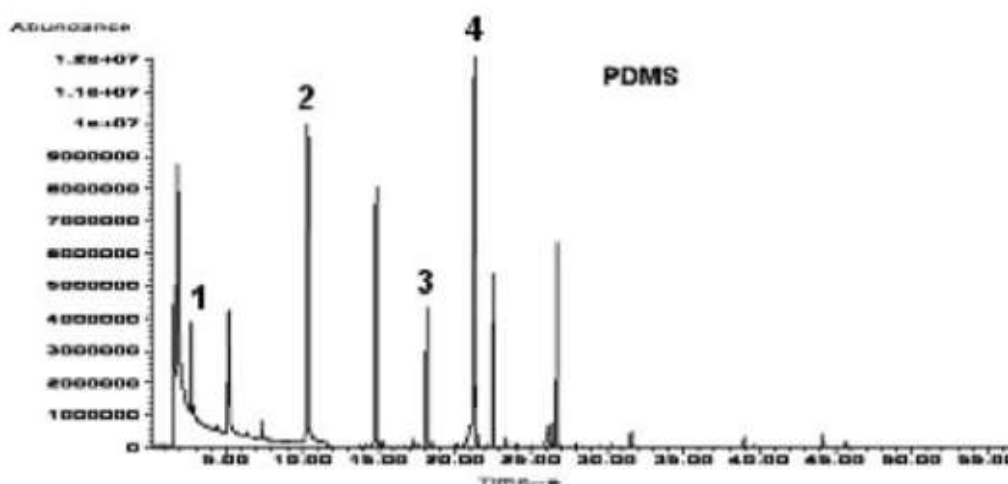
Para llevar a cabo el análisis se emplea un detector de ionización de llama (GC-FID) el cual esta acoplado a un espectrómetro de masas (GC-EM). En la actualidad las columnas capilares son las más utilizadas en este tipo de cromatografía. Son tubos largos, que tienen un diámetro muy pequeño, que puede ser de vidrio o más común de sílice fundida en las que la fase estacionaria se encuentra retenida sobre la pared interna de la columna (Montoya & Páez, 2012).

El FID (detector de ionización de llama, por sus siglas en inglés), es el detector más utilizado, aunque existen otros que también son aplicables en cromatografía de gases. La mayoría de los compuestos orgánicos producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la llama, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de H<sub>2</sub>/aire, es decir de 2254°C.

Cuando se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama, la corriente que resulta ( $\sim 10^{-2}$  A) se dirige para su medida hacia un amplificador operacional de alta impedancia. La ionización de la llama de compuestos que contienen carbono no es un proceso bien establecido, aunque se observa que el número de iones que se producen es relativamente correspondiente al número de átomos de carbono reducidos en la llama.

El FID responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, por lo cual, es más un detector sensible a la masa, que un sistema sensible a la concentración. Grupos funcionales, tales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la llama pocos iones o prácticamente ninguno. Estas propiedades hacen de este detector uno de los detectores generales más utilizados para el análisis de la mayoría de los compuestos orgánicos. Las aplicaciones de este detector son diversas y generalmente de control rutinario (Skoog, 2007).

El revestimiento de fibra es el parámetro más importante a considerar para la optimización de la extracción por SPME ya que su polaridad y las características de volatilidad determinan la naturaleza química de los analitos extraídos (Charry-Parra, 2011). Como se muestra en la Figura 15, la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) presenta eficiencia en la extracción (mayor abundancia) de los analitos de interés en la cerveza.



**Figura 15. TIC para el análisis de compuestos volátiles en cerveza por SPME: (1) acetato de etilo (2) acetato de isoamilo, (3) 2-fenil etil alcohol, (4) acetato de 2-fenil etilo**

**Fuente:** Charry-Parra, 2011.

### **3.1.2. Cromatografía líquida**

#### **3.1.2.1 Preparación de muestras extracción líquido – líquido.**

El método más utilizado para concentrar los compuestos volátiles es el de extracción por medio de un solvente no miscible. Se basa en un coeficiente de distribución favorable del solvente extractor frente a la mezcla hidroalcohólica en la que se encuentran disueltos los compuestos volátiles. Se pueden utilizar sucesivamente o paralelamente distintos solventes extractores, cada uno adecuado para un grupo de componentes de la mezcla, con lo que se consigue una mayor selección en la extracción. El proceso de extracción puede ser de modo continuo o discontinuo en embudos de decantación.

Estos métodos permiten concentrar los compuestos volátiles después de la evaporación del disolvente, cuyo punto de ebullición conviene sea lo más bajo posible, y de alta pureza, ya que las impurezas también se concentran, ocasionando que los resultados no sean confiables (Escobal,1999).

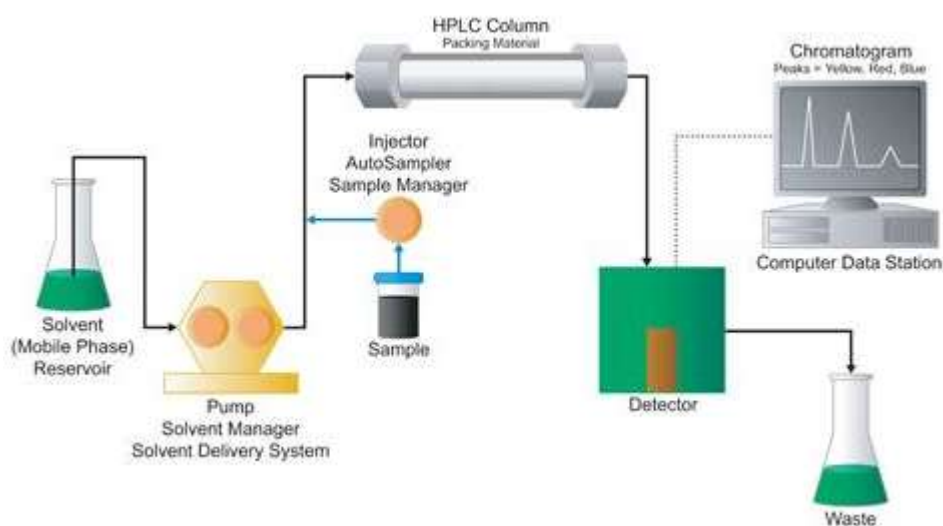
#### **3.1.2.2 Preparación de muestras extracción sólido – líquido**

Esta técnica es adecuada para aislar compuestos volátiles de muestras muy diluidas (compuestos minoritarios). En el adsorbente quedan retenidos los compuestos de interés, que son consecutivamente eluidos mediante un disolvente adecuado, reducción de presión y aumento de temperatura. La elución se lleva a cabo en función del tipo de interacción que se establezca entre la matriz, los analitos y el empaquetamiento (Escobal, 1999).

### 3.1.2.3 Microextracción de fase sólida

Este método es simple y sensible para analizar los compuestos volátiles, ya que requiere una preparación mínima de la muestra, conforme se obtiene límites de detección en el rango de nanogramos por litro para compuestos elegidos. A su vez, se pueden determinar compuestos tanto en matrices simples como complejas (Evans, 1997; Uinard & Beler, 2004). Normalmente esta técnica es más sensible a compuestos no polares, y se ha convertido en un método eficiente de extracción debido a que no es necesario el uso de grandes volúmenes de solvente. El tiempo requerido es corto y se evita la contaminación cruzada o arrastre, por lo tanto, es una alternativa confiable con respecto a las técnicas tradicionales de preparación de muestras, sobre todo cuando se combina con métodos de detección adecuados (Caldeira, 2007).

### 3.1.2.4. Determinación de $\alpha$ - ácidos e iso- $\alpha$ - ácidos mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)



**Figura 16. Esquema general de HPLC.**

**Fuente:** Skoog, 2007.

El método HPLC es capaz de cuantificar los iso- $\alpha$ -ácidos procedentes del lúpulo según reconoce la Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado, España (BOE).

En este tipo de cromatografía la fase móvil es un líquido, que actúa como disolvente de los compuestos o analitos presentes en la muestra. Los compuestos pasan con la fase móvil a través de la columna y se reparten entre esta y la fase estacionaria.

Para la medición de los iso- $\alpha$ -ácidos liberados por el lúpulo, se emplea la HPLC de reparto o partición en columna, del tipo fase reversa o inversa. Es una técnica instrumental empleada para el análisis de proteínas y aminoácidos entre otros, siendo el método utilizado para más del 90% de los análisis en cromatografía líquida.

En este tipo de cromatografía tanto la fase móvil como la estacionaria son líquidos. El líquido de la fase estacionaria se inmoviliza mediante el uso de partículas de soporte sólido como gel de sílice, con elevada área superficial.

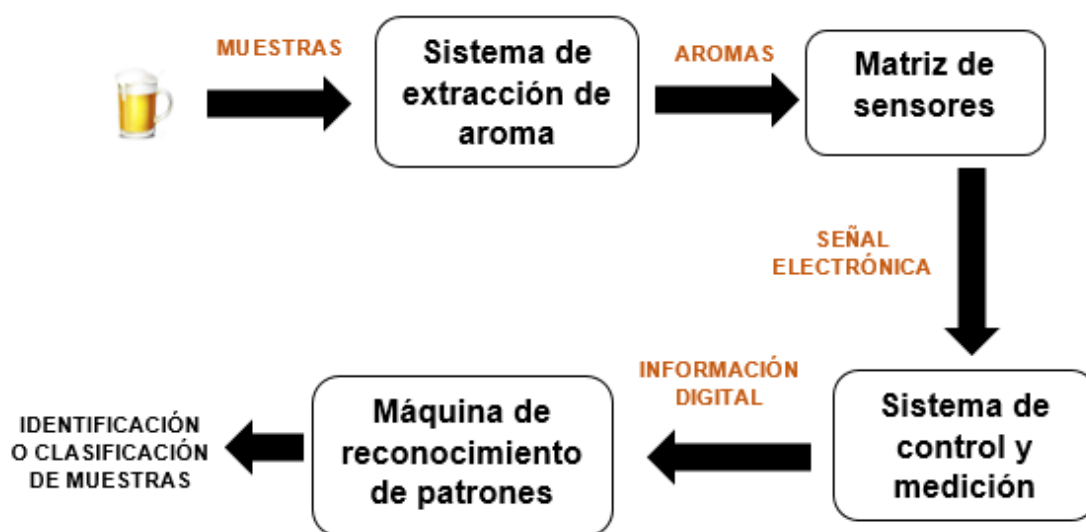
Para impedir que las fases se mezclen, se usan líquidos de distinta polaridad. En el modo reverso, se usa un líquido polar en la fase móvil, utilizándose uno no polar en la estacionaria. La unión de los analitos a la fase estacionaria es de tipo hidrófobo, y se produce en la región no polar del analito. Las moléculas de soluto tendrán distinta atracción a ambas fases.

La cromatografía HPLC en cerveza, se realiza de acuerdo a la ASBC por medio de elución por gradiente con una solución tampón citrato con pH=7. La fase móvil se modifica durante el análisis, de forma que favorece la interacción de los componentes presentes en la muestra con la fase estacionaria. La fase reversa se determina por el radical presente en la fase estacionaria, con carácter apolar. De tal forma que la fase reversa tiene como grupo funcional cadenas C8 (n-octil). Las cadenas de la fase estacionaria se acomodan a modo de peine en el soporte de la columna de forma que atrapan los iso-alfa-ácidos que pasan en la fase móvil.

Con respecto al cromatógrafo HPLC, se necesita al menos un depósito para fase móvil que el sistema de bombeo introducirá en gradiente en la columna. El depósito suele poseer un degasificador, para no introducir gas en la columna evitando errores en el análisis. Por otra parte, el sistema de bombeo debe tener capacidad para trabajar a altas presiones, tratándose habitualmente de bombas de pistón, junto con un supresor de pulsos, eliminando los inconvenientes que pueden producir este tipo de bombas. Para el sistema de inyección de muestra, se recomienda usar muestreador automático, que puede estar ubicado antes o después del sistema de bombeo, realizando la mezcla de la muestra con la fase móvil en baja o alta presión respectivamente. La columna será de relleno de sílice bañada en fase estacionaria C8. Respecto al sistema de detección y registro, podría ser de tipo fotométrico, debido a que la mayoría de los compuestos orgánicos absorben radiación en alguna parte del espectro.

### 3.3. Otros

#### 3.3.4. Caracterización y clasificación del aroma de muestras de cerveza mediante nariz electrónica y herramientas quimiométricas



**Figura 17. Esquema general de la nariz electrónica para la identificación de compuestos en muestras de cerveza.**

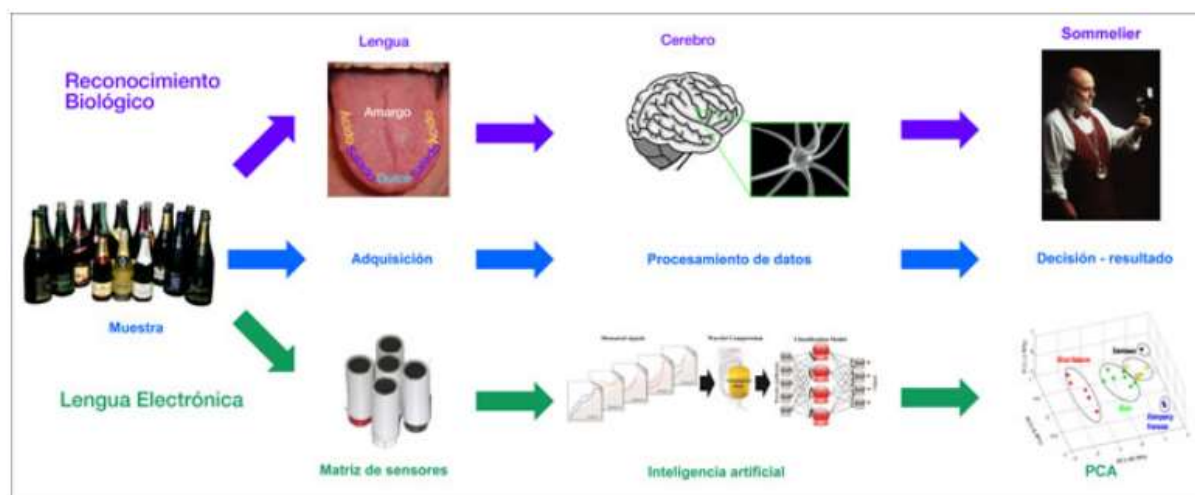
La nariz electrónica se define como un instrumento dotado de sensores químicos y de un programa quimiométrico de reconocimiento de modelos específicos, que es capaz de reconocer y comparar olores individuales o complejos. Su objetivo es relacionar el aroma que se percibe con una respuesta que servirá como modelo en posteriores análisis, después de ser almacenada en la memoria, así como el sistema olfativo humano (Busto).

Esta técnica está basada en el acoplamiento del espacio de cabeza (HS) con un espectrómetro de masas (MS) para clasificar y caracterizar muestras de cervezas según su sitio de producción y composición química. Para interpretar las características aromáticas de las cervezas a partir de los iones  $m/z$  obtenidos, se consiguieron bi-parcelas de puntuación y carga aplicando variables canónicas, fue posible con la presencia (y abundancia) de iones particulares de diferentes compuestos que se encuentran comúnmente en la cerveza. Estos resultados demuestran que la nariz electrónica HS-MS no solo es un sensor de aroma capaz de clasificar y/o diferenciar muestras, sino que también puede proporcionar información sobre los compuestos responsables de esta diferenciación (Vera L., 2011).

La nariz electrónica está diseñada con una serie de sensores, cada uno de ellos con cierta especificidad en un grupo de compuestos. Cada sensor otorga un valor de conductividad, obteniéndose al final una matriz de datos de  $m$  columnas por  $n$  filas, donde las columnas serán el número de sensores que posee la nariz y  $n$  el número de muestras. Por ende, los resultados deben ser analizados con técnicas de análisis estadístico multivariado (Lozano, 2005).

La tecnología de arreglo de sensores y el uso de software aplicados al análisis de la huella digital de productos alimenticios ha tenido un rápido avance en la investigación y en su desarrollo de aplicaciones en la industria, pero es importante fortalecer las líneas de investigación, para incrementar la selectividad, sensibilidad y reproducibilidad del análisis (Quicazán, 2011).

### 3.3.5. Análisis de cerveza usando lengua electrónica



**Figura 18. Esquema del proceso de identificación o calificación de una bebida o alimento según el sentido del gusto y la lengua electrónica.**

**Fuente:** Cetó, 2010.

La lengua electrónica (ET), es considerada un sensor de gusto con selectividad global, es decir tiene la capacidad de descomponer una sustancia química en cualidades gustativas y cuantificarlas. Está integrada por varios tipos de electrodos, en los que se pega una membrana de lípidos/polímeros, y pueden separar, identificar y cuantificar el sabor de los alimentos o medicamentos. La composición de la membrana está diseñada considerando la densidad de carga eléctrica de la misma y la hidrofobicidad sobre la base de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias gustativas. El sabor se evalúa mediante la transformación lineal de la salida del sensor y proporciona una "escala de sabor". El patrón de sabor obtenido para la cerveza se construye a partir de cinco ejes de cualidades gustativas básicas, las cuales son: acidez, salinidad, dulzura, amargura y umami (Toko, 2016).

Además, en un estudio se realizó un sistema de lengua electrónica basado en una matriz de electrodos potenciométricos selectivos de iones (ISE) para la discriminación de diferentes tipos de cerveza comercial. La matriz se formó por 21 ISE que combinados entre sensores catiónicos y aniónicos con otros con respuesta genérica. Para este propósito, las muestras

de cerveza se analizaron con la ET sin ningún pretratamiento más que la agitación suave de las muestras con un agitador magnético para reducir la formación de espuma, que podría interferir en las medidas. Luego, las respuestas obtenidas se evaluaron mediante dos métodos de reconocimiento de patrones diferentes, el análisis de componentes principales (PCA) permitió identificar algunos patrones iniciales, mientras que el análisis discriminante lineal (LDA) logra el correcto reconocimiento de las variedades muestrales (81,9% de exactitud) (Cetó, 2013).

Se utilizó el criterio de distancia para seleccionar las variables más discriminatorias. En este sentido, los resultados mostraron que el uso de métodos de reconocimiento de patrones supervisados como LDA es una buena alternativa para la resolución de situaciones de identificación complejas. Además, el contenido de alcohol se predijo a partir de los datos de la matriz empleando un modelo basado en una red neuronal artificial (Cetó, 2013).

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.

La cerveza es una bebida que presenta una composición compleja atribuida a los diferentes compuestos que se generan a partir de sus materias primas, otros mediante interacciones durante el proceso de fabricación. Estos compuestos pueden afectar de manera positiva como negativa en el producto final, dependiendo de la concentración que exista de cada una de estas sustancias, las cuales se ven influenciadas directamente por el proceso de producción y el tipo de cerveza. Asimismo, el tipo de maquinaria que se emplee es fundamental para evitar desprendimiento de aromas o compuestos desagradables en la cerveza. El proceso que se debe controlar cuidadosamente es el de fermentación, en el que la temperatura y el oxígeno, determinarán el desarrollo deseado o indeseado de estas sustancias, sin descuidar los demás procesos.

Los compuestos más importantes en el flavor de la cerveza son los iso- $\alpha$ -ácidos, los cuales son provenientes del lúpulo que se utilice. Dependiendo de la variedad del lúpulo la concentración de estos ácidos le otorgan las características representativas de los diferentes tipos de cerveza, por tal motivo, es necesario una selección apropiada de lúpulos. Una ventaja adicional de estos compuestos es su actividad antimicrobiana que permite alargar la vida útil de la cerveza.

De lo analizado en el presente trabajo se ha logrado observar que los compuestos con mayor incidencia en el flavor de la cerveza son los ésteres y el diacetilo. La concentración de los mismos influye en la aceptación, debido a que el umbral de olor de los mismos es bajo, porque pequeñas cantidades de estos pueden provocar que la cerveza pase de agradable a desagradable.

En el caso de los alcoholes superiores, a pesar de tener características de aroma similar a los ésteres, estos son indeseables en las cervezas debido a que se necesita concentraciones mayores para tener el mismo efecto en el flavor, lo que sería riesgoso por su toxicidad.

En cuanto a los compuestos fenólicos, son responsables de la estabilidad oxidativa de la cerveza al impedir que los compuestos fotosensibles se descompongan, además de favorecer la formación deseable de espuma.

El empleo de métodos adecuados para analizar la cerveza puede ayudar a los fabricantes de esta bebida a optimizar la calidad de su producto, en este estudio se presentaron algunas técnicas capaces de determinar de forma cuantitativa los compuestos que influyen en el flavor de la cerveza, entre ellas tenemos la cromatografía de gases (FID, MS), HPLC, espectrofotometría, resonancia magnética nuclear, que son capaces de identificar diferentes sustancias volátiles y no volátiles. Todos los métodos que se utilicen para la cuantificación de estos compuestos son complejos y requieren de mucho tiempo de análisis, por esta razón, estas determinaciones han sido desarrolladas por organizaciones dedicadas al arte de la cerveza como son la ASBC y la MEBAC. Debido a estas complejidades se desarrollaron

métodos electroquímicos combinados con potenciometría, tales como la nariz electrónica y la lengua electrónica los cuales garantizan resultados confiables, empleando los sensores adecuados para el tipo de alimentos que se desee analizar, en este caso particular la cerveza. Esta tecnología sigue en desarrollo y los resultados obtenidos hasta el momento han sido satisfactorios.

En la actualidad, se están realizando determinaciones de los constituyentes de la cerveza combinando varias técnicas para la obtención de resultados más confiables, ya que la calidad de esta bebida ya no se ve influenciada únicamente por el aspecto, sino por los compuestos que son capaces de otorgar los aromas y sabores al producto. La tecnología cervecera es una de las más importantes en el mundo y su estudio e investigación siguen en desarrollo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Society of Brewing Chemists, Methods of Analysis, 14<sup>a</sup> ed
- ASBC. (2020). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Tetrahydro-iso-alpha-acids in Beer. Journal of the ASBC.
- Bamforth, C. (2005). Food, Fermentation and Micro-organisms. USA: Blackwell Publishing.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). Food Chemistry (4th ed). Springer.
- Beutler, O. H. (1988). Acetaldehyde In Methods of Enzymatic Analysis'. (Bergmeyer, H. U. ed.) 3rd ed. Vol V, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.
- Buggey, L. A. (2001). A review of polyphenolic antioxidants in hops, brewing and beer. The brewer international.
- Guasch J., Busto O. y Mestres M. (2011). La nariz electrónica: una nueva herramienta para analizar el aroma. Revista de Enología Científica y Profesional.
- 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. doi: 10.1016/j.talanta.2007.05.029
- Carvajal, L., & Insuasti, M. (2010). repositorio.utn.edu.ec. Recuperado el 29 de Marzo de 2021, Elaboración de cerveza artesanal utilizando cebada (*Hordeum vulgare*) y yuca (*Manihot esculenta crantz*). Obtenido de: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/558/1/03%20AGI%20256%20TESIS.pdf>
- Cetó, X., Gutiérrez-Capitán, M., Calvo, D., & del Valle, M. (2013). Beer classification by means of a potentiometric electronic tongue. *Food Chemistry*, 141(3). doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.091
- Cetó, X., Gutiérrez, J. M., Moreno-Barón, L., Alegret, S., & del Valle, M. (2010). Voltammetric Electronic Tongue in the Analysis of Cava Wines. *Electroanalysis*, 23(1).
- 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). Obtenido de: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01979.x>
- De Keukeleire, Denis. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, 23(1). Obtenido de: <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- De Nicola, R., & Walker, G. M. (2011). Zinc interactions with brewing yeast: impact on fermentation performance. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(4).

- E. Pires, J. Teixeira, T. Brányik, A. Vicente. (2014). *Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.*
- Escobal, A. (1999). Determinación estructural y cuantificación de componentes volátiles en muestras monovarietales de txakoli. Universidad del país Vasco.
- 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.
- Da Silva G.A., Augusto F., Poppi R.J., (2008). Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC, *Food Chem.* 111.
- Garcia, M. M. E. (2017). *Produção de cerveja: Utilização de estirpes não-convencionais em co-fermentação com Saccharomyces para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja* (Doctoral dissertation, ISA/UL).
- Gibson, B., Krogerus, K., Ekberg, J., Mikkelsen, A., Pentikäinen, S., Wilpola, A., & Vidgren, V. (2015). Non-conventional yeast as a new tool for beer flavour modification. In *Proceedings of the 35th European Brewing Convention Congress*.
- Gigliarelli, P. (2017). La Cerveza: Fermentación. Mash.
- González, M. (2017). Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales. En M. Gonzáles, Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales. Carolina del Norte: Lulu Enterprises.
- Gromus, J. and Lustig, S. (1998). Influence of polyphenols and reducing substances on beer quality and their fate during beer production. Bulletin of the European Brewery Convention, Brewing Science Group.
- Hashimoto T, Maruhashi T, Yamaguchi Y, Hida Y, Oka K. (2012). The effect on fermentation by-products of the amino acids in wort. En: *Proceedings of the World Brewing Congress*. Portland, OR.
- Hailee, E., Anderson, I., Santos, C., Zacariah, L., Hildenbrand, K., Schug, A. (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta* 1085.
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., ... & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3),
- Hirst M.B., Richter C.L., (2016). *Review of aroma formation through metabolic pathways of Saccharomyces cerevisiae in beverage fermentations.*
- Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, J. S. and Young, T. W. (1981). Chemical and physical

- properties of beer. (Eds) Malting and Brewing Science. London: Chapman & Hall.
- Hough.J.S. (1990). The biotechnology of malting and brewing. Cambridge University Press.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008b). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56.
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2017). Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1).
- Hazelwood L.A., Daran J., Pronk J.T., Dickinson J.R., (2008). *The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on Saccharomyces cerevisiae metabolism*. Appl Environ Microbiol.
- Homebrewers Association, Causas y efectos de la oxidación de la cerveza. *The beer times*. (2021). Obtenido de: <https://www.thebeertimes.com/causas-y-efectos-de-la-oxidacion-en-la-cerveza/>.
- Huertas Greco, K., & Sánchez Medina, I. A. (2012). Obtención y caracterización de biodiesel a partir de aceite de semillas de *Ricinus communis*.(Higuerilla) modificadas genéticamente y cultivadas en el Eje Cafetero. Obtenido de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3048>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, BA, Thiessen, PA, Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J. y Bolton, EE (2019). PubChem en 2021: nuevo contenido de datos e interfaces web mejoradas. *Ácidos nucleicos Res.* , 49 (D1), D1388 – D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Laundaud S., Latrille E., Corrieu G.. (2010). *Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer*.
- Laurella S., Nociones de resonancia magnética nuclear: una aproximación a la elucidación estructural, Universidad Nacional de la Plata, 2017.
- Lei H,Li H,Mo F, Zheng L, Zhao H & Zhao M.Effects of Lys and His supplementations on the regulation of nitrogen metabolism in lager yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*.2013
- Lei, H., Xu, H., Feng, L., Yu, Z., Zhao, H., & Zhao, M. (2016). Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. *Journal of bioscience and bioengineering*, 122(5).
- López. E. (2012). La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación. Universidad de la Rioja. España.
- Loviso CL, Libkind D. Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Rev Argent Microbiol*. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>

- Lozano J, Santos J, Horrillo M. (2005). *Classification of white wine aromas with an electronic nose*. Talanta
- Kobayashi M., Shimizu H., Shioya S., (2008). Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation, J. Biosci. Bioeng. 106 (4).
- McMurry, J. (2018). *Química orgánica*. México: Cengage Learning México.
- MEBAK (2012).Wort, Beer, Beer-Based Beverages, 1ª ed.
- MEBAK. (2002). Brew-technical analysis methods, v II, 4ª ed.
- Meilgaard MC. Flavor chemistry of beer, I. Flavor interaction between principal volatiles. Tech Q Mast Brew Assoc Am. 1975;12.
- Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A. y Fantozzi, P. (1999). Organic and Phenolic Acids in Beer. LWT - Food Science and Technology, 32 (8). doi: 10.1006 / fstl.1999.0593
- Montoya, S., Páez, C. Documentación de la Técnica de Cromatografía de Gases en el Análisis de Hidrocarburos Alifáticos en Aguas Residuales. Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira, 2012.
- Morales-Toyo, M. (2018). Reacciones químicas en la cerveza. Revista De Química, 32(1). Obtenido de: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/20105>
- Oficina Nacional de Normalización de Cuba, (2007), Norma NC-535. Bebidas alcohólicas-Determinación de alcoholes superiores-Método Espectrofotométrico.ININ.
- O'Connor-Cox ES, Ingledew WM. (1989). Wort nitrogenous sources----Their use by brewing yeasts: A review. J Am Soc Brew Chem. 1989; 47.
- Ocvirk, M., Mlinarič, N. K., & Košir, I. J. (2018). Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the science of food and agriculture*, 98(10). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8840>
- Oliver, G., Dornbusch, H., & Colicchio, T. (2011). The Oxford Companion to Beer.: Oxford University Press. Retrieved from: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780195367133.001.0001/acref-9780195367133>.
- Picón, M. (2020). Análisis fisicoquímicos para el control de calidad en la producción de cerveza. Universidad de Sevilla.
- Quicazán S., Martha C., & Díaz M., Amanda C., & Zuluaga D., Carlos M. (2011). La nariz electrónica, una novedosa herramienta para el control de procesos y calidad en la

Industria Agroalimentaria. Vitae, 18 (2).Obtenido de:  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169822670012>

Renger BRS, Hateren SH, van Luyben KCAM. (1992). The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure. *J Inst Brew.* 1992;98. doi:10.1002/elan.201000439

Saerens S, Verstrepen K, Thevelein J, Delvaux F. (2008) Ethyl ester production during brewery fermentation: A review. *Cerevisia Belgian J Brew Biotechnol.* 33.

Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007). *Principios de análisis instrumental* (Sexta Edic). Books/Cole.

Steele, M. (2013). ¿A que nos referimos con calidad de cerveza? *The beer times.*

Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual review of microbiology*, 68,.

Suárez D., M. (2013). Cerveza: Componentes y Propiedades. Obtenido de:  
<https://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/982719.el-origen-de-la-cerveza.html>

Suomalainen H. (1981). Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *J Inst Brew.* 87.

Supelco. (2020). Métodos de análisis para la industria cervecera.

The Beer Times. (2017). Diacetilo en la cerveza: formación, reducción y control., *The Beer Times*. Obtenido de: <https://www.thebeertimes.com/diacetilo-en-la-cerveza-formacion-reduccion-y-control/>

Toko, Kiyoshi & Tahara, Yusuke. (2016). Beer Analysis Using an Electronic Tongue. *Electronic Noses and Tongues in Food Science*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-800243-8.00016-0.

Thurston PA, Quain DE, Tubb R. (1982). Lipid metabolism and the regulation of volatile synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Inst Brew.* 88.

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*. doi:10.1007/s00216-010-4343-y

Walker, G. M. (2004). Metals in yeast fermentation processes. *Advances in applied microbiology*, 54.

Walther, A., Hesselbart, A., & Wendland, J. (2014). Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(5).

- Wishart, D. S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(3). doi:10.1016/j.trac.2007.12.001
- Younis OS, Stewart GG. (1998). Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J inst brew*.
- Zhang C, Liu Y, Qi Y, Zhang J, Dai L, Lin X, Xiao D. (2013). Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer's yeast strains. *Eur Food Res Technol*; 236.