



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE DOS TEMPERATURAS SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE CONGENÉRICOS DE IMPORTANCIA
EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA EN LA
ELABORACIÓN DE CERVEZA LAGER”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

PABLO OJEDA BALLESTEROS



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

VOCAL: GLORIA DÍAZ RUÍZ

SECRETARIO: FRANCISCO RUÍZ TERÁN

1er. SUPLENTE: JORGE ARTURO ABURTO ANEL

2° SUPLENTE: ARMANDO CONCA TORRES:

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

FRANCISCO RUÍZ TERÁN

SUPERVISOR TÉCNICO:

AGUSTÍN REYO HERRERA

SUSTENTANTE:

PABLO OJEDA BALLESTEROS

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que con su cariño y comprensión jamás en la vida permitieron que me faltara algo, quienes a pesar de los momentos difíciles siempre estuvieron conmigo, a ellos principalmente dedico mi tesis, pues a ellos les debo más que la vida.

A mis hermanos Bernardo y Kalani quienes se preocuparon y siempre pude acudir a ellos antes que a cualquier otra persona, a ellos que siempre estuvieron para mí antes que para cualquier otra persona.

A mis amigos de “La Flecha” y “El Bandón” porque con ellos comencé la aventura de la vida esperando que nunca termine ese viaje.

A “Hamshire”, Ivan, “chiva”, “rata”, Rodrigo, Polo, Noel que con su perpetua monstruosidad engalanaron parte de la carrera y siempre fueron amigos incondicionales.

A Javier Rangel “el pelón”, porque sus consejos me han sido de gran apoyo en mi vida profesional.

Al clan confederado por compartir y permitirme compartir ideas.

A Carmelo quien siempre tuvo tiempo para quitarme el mío jajajaja, bueno, siempre tuvo tiempo para compartir.

A Darío Santana y su familia por haber abierto sus puertas y verme como uno de ellos.

A Alejandra, Cecilia, Bedita, Jacky “chilaquitas”, “carnaaal”, ”Miky Mike”, Tania Bicho, y a todas aquellas personas que fueron parte de mi vida profesional.

A Agustín Reyó quien más que un profesor fue un ejemplo y un gran amigo.

A Panchote quien estuvo al tanto de esta tesis y que muy a su estilo me enseñó el sentido de la responsabilidad.

A Itzhell Gonzales quien se convirtió en un gran incentivo para concluir mi carrera.

A aquellos que me faltaron y a todas las personas que no creyeron en mí.

A la UNAM mi alma mater por darme las herramientas y hacer de mí una persona capaz de enfrentar la vida como profesionista.

**A TODOS USTEDES ESTÁ DEDICADO ESTE TRABAJO YA QUE SIN SU APOYO
ESTO NO HUBIERA SIDO POSIBLE**

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. ANTECEDENTES	11
3.1. CEBADA	11
3.2. MALTEO Y ETAPAS DE PROCESO DE MALTEO	14
3.2.1. REMOJO	15
3.2.2. GERMINACIÓN	16
3.2.3. SECADO	18
3.2.4. CRIBADO	19
3.3. CERVEZA	19
3.4. ADJUNTOS	20
3.5. LUPULO	21
3.6. LEVADURA	22
3.7. ETAPAS DE LA ELABORACIÓN DE CERVEZA	23
3.7.1 COCIMIENTO	24
3.7.1.1 MOLIENDA	24
3.7.1.2 MACERADO	24
3.7.1.3 FILTRACIÓN DE MOSTO	27
3.7.1.4 EBULLICIÓN DEL MOSTO	28
3.7.1.5 ENFRIAMIENTO DEL MOSTO	29
3.7.1.6 FERMENTACIÓN	29
3.8. COMPUESTOS CONGENÉRICOS	29
3.9. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE CRECIMIENTO CELULAR, PRODUCCIÓN DE ETANOL Y COMPUESTOS CONGENERICOS	33
3.10. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (MEFS)	35
4. OBJETIVO GENERAL	39
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	39
5. HIPÓTESIS	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1. DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES FISICAS DEL DEL GRANO DE CEBADA GABYOTA DEL ESTADO DE HIDALGO.	41
6.2.1 PESO HECTOLÍTRICO DE LA CEBADA	41
6.2.3 CAPACIDAD GERMINATIVA DE LA CEBADA	41
6.2.4 ENERGÍA GERMINATIVA DE LA CEBADA	41
6.2.5 ETERMINACION DE HUMEDAD	41
6.2.6. DETERMINACIÓN DE PROTEINA POR MÉTODO KJELDAHL	42
6.2.7 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE ALMIDÓN	42
6.3 ELABORACIÓN DE LA MALTA	43
6.4 DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS DE SACARIFICACION DE LA MALTA	45
6.5 EXTRACTO DE LA MALTA UTILIZANDO EL MÉTODO DE REMOJO	45
6.6 PODER DIASTÁSICO	46
6.7 FORMULACIÓN DE LA CERVEZA	47
6.8 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES EN °Bx POR MEDIO DE UN REFRACTOMETRO DE CAMPO	48
6.9 DETERMINACIÓN DEL pH DE LA CERVEZA	48
6.10 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN EL MOSTO DULCE Y EN LA CERVEZA POR EL METODO DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS)	48
6.11 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CONGENÉRCIOS POR MEFS-EC Y CROMATOGRAFÍA DE GASES	48

6.12. CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE ANALITO EN LAS MUESTRAS DE MOSTO DULCE Y CERVEZA.	50
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS	51
7.1. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS A LA CEBADA GABYOTA DEL ESTADO DE HIDALGO	51
7.2 RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS A LA MALTA DE CEBADA GABYOTA DE HIDALGO	54
7.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE SACARIFICACIÓN DEL MOSTO	55
7.3. FERMENTACION Y ANALISIS DEL MOSTO	56
7.3.1. CANTIDAD DE SÓLIDOS SOLUBLES, A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN, DETERMINADOS POR MEDIO DE UN REFRACTOMETRO DE CAMPO	57
7.3.2. SEGUIMIENTO DE LA DISMINUCIÓN DE pH A LO LARGO DE LA FERMENTACION.	58
7.3.3. CUANTIFICACION DE AZÚCARES REDUCTORES POR METODO DNS	60
7.3.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CONGENÉRICOS	62
8. CONCLUSIONES	67
7.3 PERSPECTIVAS	68
9. BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXO 1 CROMATOGRAMAS	71
ANEXO 2 CURVAS PATRÓN	75
ANEXO 3 LISTA DE LOS ESTANDARES DE LOS COMPUESTOS CONGENERICOS	82

1. RESUMEN

La cerveza es una bebida alcohólica fermentada no destilada que posee características muy distintivas como lo son, el color, sabor, aroma y palatabilidad, estas características son impartidas por la materia prima, la fermentación y el proceso de elaboración.

Para obtener cerveza existen dos operaciones muy importantes: El malteo, que consiste en la selección de un grano de cebada con contenido alto de almidón (mínimamente el 82% del peso del grano tiene que corresponder a materia amilácea), poco contenido de proteína (8-11%) y mínimo un 90% de granos con capacidad de germinar, la cebada que cumple con estas características se llama cebada maltera.

En el malteo se activa la germinación del grano de cebada, durante la germinación se sintetizan las enzimas que hidrolizan el almidón del grano, se llama poder diastásico o diastásis a la medida de la actividad enzimática para hidrolizar estos hidratos de carbón complejos, en este caso el almidón, a hidratos de carbón más simples.

Durante esta parte del experimento se logro obtener una malta con poder diastásico de 400 WK

La elaboración de cerveza comienza con la sacarificación del extracto amiláceo que es sometido a distintas temperaturas, las enzimas que hidrolizan al almidón a hidratos de carbón como la maltotriosa, maltosa y glucosa son activadas conforme se llega a la temperatura óptima de actividad de las enzimas.

Después de la hidrólisis del almidón se adiciona el lúpulo y se eleva la temperatura del mosto hasta 90°C, a partir de los 60°C comienza la inactivación las enzimas y la extracción de los compuestos del lúpulo que imparten amargor a la cerveza, después de disminuir la temperatura a 13°C se adiciona una levadura del género *Saccharomyces pastorianus*, pasado el tiempo de fermentación se elimina la levadura y otros sólidos por decantación y hasta este punto se obtiene una cerveza verde.

La temperatura y tipo de levadura son factores muy importantes en la elaboración de cerveza, la fermentación y por lo tanto la producción de compuestos congénicos, dependen estrechamente de la temperatura, en

este estudio se utilizó una cebada maltera del estado de Hidalgo con 86% de materia amilácea y 11.5% de proteína.

Se trabajó con un mosto fermentado a 13°C y con otro fermentado a 19°C, al final de la fermentación se logró apreciar el cambio en la producción de compuestos congenéricos al utilizar dos distintas temperaturas de fermentación, la cuantificación de compuestos congenéricos se llevó a cabo por medio de una extracción en fase sólida y posteriormente por una cromatografía de gases.

La fermentación a 13°C nos permitió obtener una cerveza con un contenido alcohólico de 2.5% y un menor número de compuestos congenéricos, así como menores concentraciones de estos.

La cerveza obtenida a partir de una fermentación a 19°C contiene un mayor número de compuestos congenéricos así como una mayor concentración de algunos de ellos.

2. INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica, no destilada, espumosa, con sabor amargo característico y es elaborada a partir de cereales.

Existen diferentes tipos de cerveza, el tipo de cerveza depende del tipo y contenido de materia prima, levadura y temperatura de fermentación. (1)

La producción de cerveza se pueden dividir en dos procesos, el malteo y la elaboración de esta bebida. (2)

El malteo consiste en; la selección de un grano de cebada cubierta es decir con la cascarilla adherida al pericarpio, con bajo contenido de proteína (8 -11%) y un alto contenido de almidón (mayor a 63% de la masa del grano); someter al grano a condiciones de germinación controladas y por ultimo detener esta germinación por medio de un secado (tostado) para detener la actividad enzimática y proveer de características sensoriales como son aromas, sabores y colores. (1, 2, 5)

Las cebadas que cumplen estas características se consideran cebadas malteras, existen cebadas con contenido de proteína y fibra mas alto y por lo tanto menor contenido de almidón, estas cebadas se utilizan como alimento para ganado y reciben el nombre de cebadas forrajeras. El análisis de proteína, almidón, lípidos y porcentaje de granos germinados de la cebada que se utilizó en este estudio indica que puede ser utilizada en la elaboración de malta porque a pesar de no tener un alto contenido de almidón tiene un bajo contenido de proteína y un porcentaje de germinación por encima del 90%. (7)

Estas cebadas, proporcionadas por la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo eran de la variedad Gabyota que se encuentran en las regiones de Libres en el estado de Puebla y Laguna de Tecocomulco en Hidalgo, no se utilizan en la producción de malta ya que la malta producida para fines cerveceros se elabora con cebadas importadas y con características conocidas por los productores de malta. (8, 10)

La malta que se obtuvo de esta variedad de cebada mantuvo un contenido de almidón de 0.085g/mL, un contenido bajo de proteína de 8.05% y un poder diastásico de 400 WK.

Este resultado es muy similar al de una malta comercial que cuenta con un poder diastásico de 500 WK. (1, 2, 4, 5, 12)

Una vez que se obtuvo la malta se realizó una curva de sacarificación para determinar los tiempos y temperaturas óptimas de actividad de las enzimas sobre la fuente de almidón. (1,2)

En el proceso de elaboración de cerveza, una levadura para cerveza lager trabaja a una temperatura de 7-11°C (2, 5) y tiene características conocidas.

En este estudio se elaboró malta a partir de cebada de Tecocomulco Hidalgo de la variedad Gabyota y con esta malta se elaboró cerveza tipo lager con el fin de evaluar la cantidad de compuestos congenéricos que se producen al final de la fermentación alcohólica a una temperatura de 13-14°C y 19-20°C.

3. ANTECEDENTES

3.1. CEBADA

Existen cebadas para la elaboración de malta que son de 2 carreras (*H. distichum*, *H. deficiens* (fig. 1)) muy utilizadas en Europa y de 6 carreras (*H. hexastichum*, *H. vulgare*, *H. intermedium* (fig. 2)) que se cultivan y utilizan en Norteamérica. (1, 2, 5, 6, 7)



Figura 1 Cebada de 2 carreras (10)



Figura 2 Cebada de 6 carreras (10)

A pesar de que la cebada es el cereal utilizado para el malteo, no toda la cebada es apta para el malteo ya que una cebada maltera debe de tener un contenido bajo de proteína y aceites además de ser variedades cubiertas es decir con el pericarpio unido a la cubierta. (5,25)

En México se utilizan cebadas de 2 y 6 carreras (*H. distichum* y *H. vulgare*) y existen variedades tanto forrajeras como malteras.

La cebada es considerada como el grano cultivado con mayor antigüedad en la historia del hombre, se han encontrado vestigios de su cultivo que datan desde hace 5 a 10 mil años en las culturas Babilónicas, Egipcia y China así como en la Edad de Piedra en las inmediaciones del Lago Suizo.

En Norteamérica, la cebada fue cultivada por vez primera por colonos alemanes y españoles.

La cebada fue introducida a México primero por los españoles en 1540 y en este año surgen las primeras solicitudes de elaboración y venta de cerveza en la nueva España. (29)

Conforme crece el consumo y aumenta la llegada de inmigrantes ingleses, irlandeses y alemanes al país, crece la demanda por esta bebida y se desatan nuevas formas, que para aquella época, eran no convencionales en la elaboración de cerveza así como la llegada de otras variedades de cebada. (28)

Los principales productores de cebada en la republica mexicana son: Guanajuato, Hidalgo y Tlaxcala, Puebla y el Estado de México (fig.3). (7)

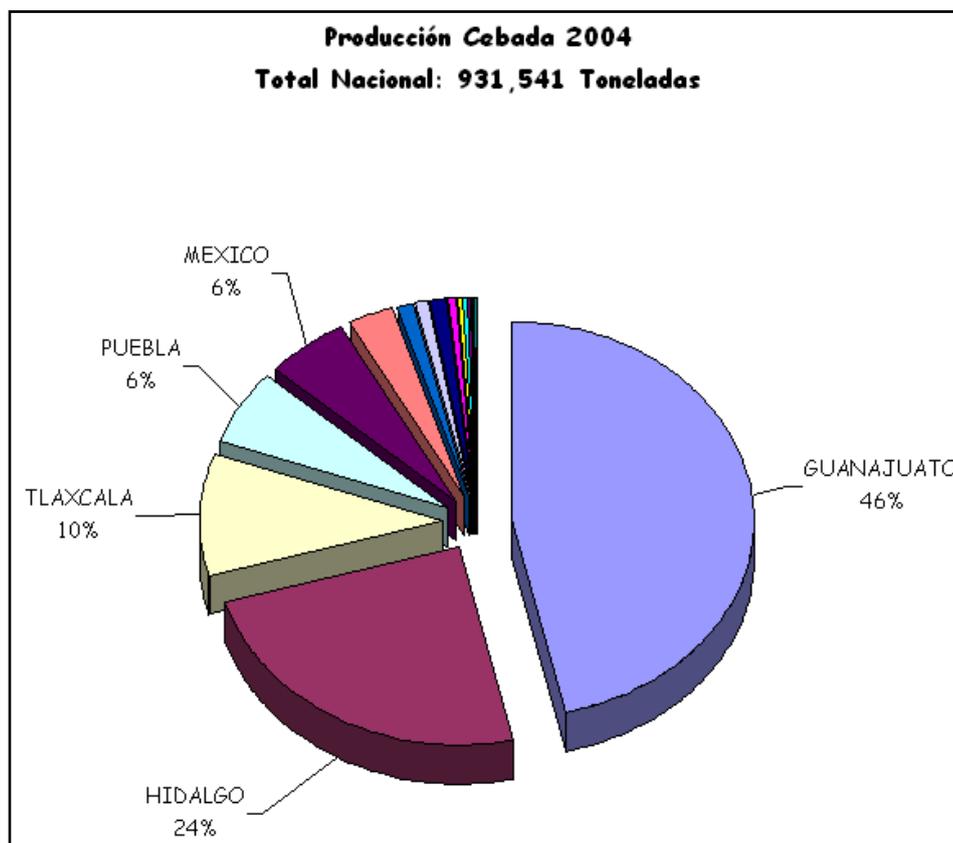


Figura 3 Producción de cebada a nivel nacional Elaborado con datos de la base de datos de SIACON 1980-2004 (6)

Tecocomulco en el estado de Hidalgo tiene como principal producto de la agricultura cebada y trigo, aunque la cebada es destinada a la industria cervecera, hay una gran cantidad de cebada que no es destinada a la elaboración de malta así como malta que no se destina a la elaboración de cerveza. (6)

Una de las variedades que existen en la laguna de Tecocomulco Hidalgo es la Gabyota, entre las características de la cebada tenemos que es de tamaño grande, de forma ovoide, uniforme, venas prominentes no pigmentadas y lisas de la base a la mitad del grano y rugosas en la otra mitad. Su raquilla es vellosa, estos vellos son largos y de tamaño de un tercio a casi la mitad del grano. La gluma alcanza la mitad a casi tres cuartos del tamaño del grano, tiene barba y se extiende a lo largo del grano, la cascarilla es adherida. El pliegue ventral es cerrado y profundo en la base, abre en forma de V en el

último tercio del grano. Su ciclo vegetativo es de 102 – 127 días, alcanza una altura de 84-110 cm, presenta resistencia al desgrane, presenta tolerancia a la escaldadura de hoja pero es susceptible a la roya lineal amarilla, se cultiva en primavera y otoño y fue liberada en 1993 por INIFAP. (10)

Para que una cebada pueda ser utilizada con fines malteros, la cebada no debe exceder el 11.5 % de proteína ya que de lo contrario se utiliza como alimento para ganado y deben ser variedades cubiertas, es decir, con la cascarilla (pericarpio) pegada al endospermo (fig. 4a y 4b) (5). La viabilidad de los granos está indicada por el porcentaje de semillas que pueden germinar bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. (9)

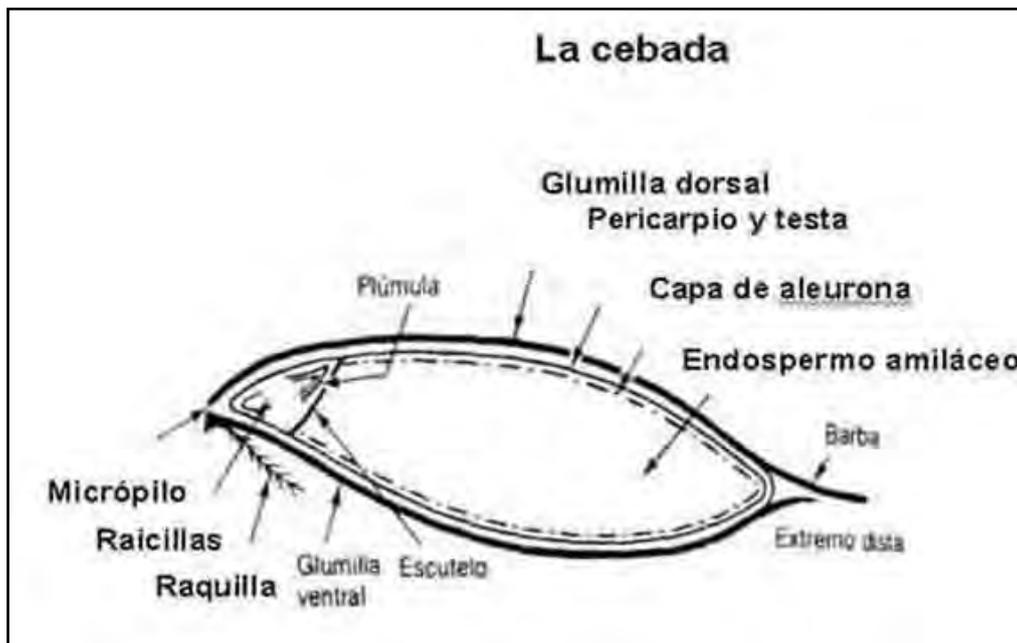


Fig. 4a Grano de cebada visto en un corte longitudinal (5)

Esta viabilidad se mide con dos análisis simples que son: la medición de la capacidad germinativa y se refiere a la cantidad de granos que son capaces de germinar en un lote determinado.

La energía germinativa es el segundo análisis y se refiere a los granos que no se encuentran en un periodo de inactividad o dormancia, los resultados de estos análisis se reportan en porcentaje de granos germinados.

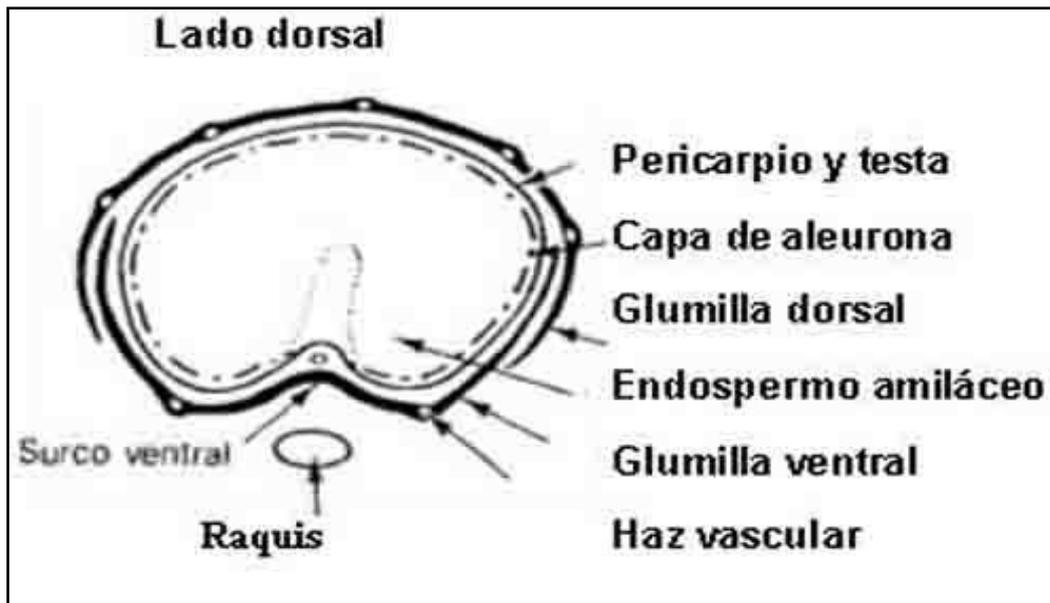


Fig. 4b Grano de cebada visto en una corte transversal (5)

3.2. MALTEO Y ETAPAS DE PROCESO DE MALTEO

El malteo es un proceso físico-químico controlado, durante el cual los granos desarrollan y activan sus sistemas enzimáticos y modifican suficientemente sus reservas alimenticias que en este caso es el almidón. Su finalidad es la obtención de malta, esto se puede hacer a partir de cualquier grano que se someta a una germinación controlada, la germinación se detiene durante el proceso de secado. (1, 5)

De las gramíneas, la cebada con cáscara es la principal materia prima para la elaboración de malta.

Su preferencia se debe principalmente a que cuenta con las siguientes ventajas:

- 1) Varias capas aleurónicas que desarrollan gran cantidad de enzimas.
- 2) Alto contenido de almidón.
- 3) Bajos niveles de proteína y aceites.
- 4) La cáscara ofrece protección al endospermo amiláceo y a la plúmula durante todo el proceso de malteo.
- 5) La cáscara y granos gastados sirven de lecho filtrante del mosto (24)

Existe una gran variedad de granos que pueden ser malteados pero la cebada es quien presenta menos problemas técnicos. (5)

En México podría utilizarse el maíz pero en rara ocasión se maltea debido a su alto contenido de grasa en el germen y es un producto de primera necesidad y no se destina para la producción de bebidas alcohólicas.

El proceso de malteo dura aproximadamente 10 días y se divide en 3 pasos importantes que son el remojo, la germinación controlada y por último el secado o tostado, dependiendo las posibilidades de cada malteador, se sabe de procesos de malteo que duran una semana y tienen buenos rendimientos. (1,5,11)

3.2.1.REMOJO

Para la elaboración de la malta el primer paso a seguir es el remojo, en el interior del grano de cebada, las enzimas necesarias para el malteado tienen una actividad muy reducida, se hallan aún inactivas e incluso algunas son inexistentes.

Durante el remojo, el agua ingresa al interior del grano y como resultado las enzimas se activan y el proceso germinativo empieza. Mientras transcurre la germinación del grano de cebada, los procesos respiratorios aumentan, así como la necesidad de oxígeno. Es por esto que, para iniciar el proceso lo más rápido posible, se debe proveer a la cebada con las cantidades adecuadas de agua, oxígeno y una buena temperatura durante el remojo.

La cebada necesita oxígeno, para la obtención de energía para su crecimiento. Todo proceso de respiración produce CO_2 (g), que debe ser eliminado para que el grano no se “ahogue”. Por ello, es que se realiza una aereación en el tanque de agua y se tiene una etapa de descanso. (26,27)

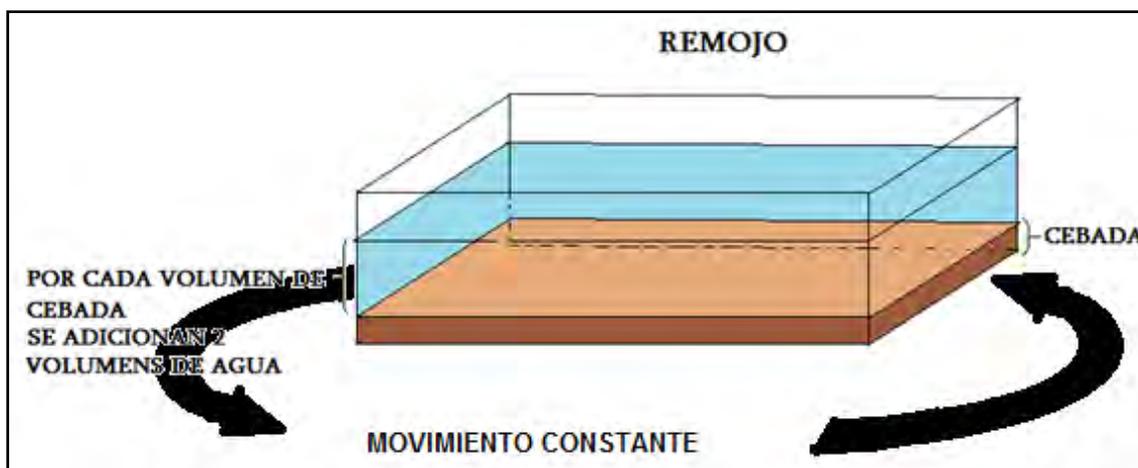


Fig.5 Tina de remojo del grano de cebada: El volumen de agua corresponde a tres veces el volumen de cebada, la tina se mantiene en constante movimiento. (15)

3.2.2. GERMINACIÓN

Su objetivo principal es el de activar a las enzimas que están repartidas en el grano de cebada.

En cuanto la semilla tiene las condiciones de humedad y temperatura ideales para la germinación comienza la producción de fitohormonas como las giberelinas (ácido giberélico), ácido indol acético y etileno.

Las fitohormonas incrementan el proceso respiratorio y la producción de más fitohormonas de manera cíclica, al producirse, sobre todo las giberelinas, comienza la formación de enzimas.

Al comenzar el proceso de malteado, los contenidos del endospermo (interior del grano) se encuentran en forma estable. Estas sustancias, de elevado peso molecular, deben ser degradadas a subproductos que estén formados de moléculas más pequeñas. (25, 26, 27)

Las enzimas que participan en el proceso de germinación son:

Glucanasas (1, 5, 26)

- β -glucanasas: actúan sobre los β -glucanos (polisacáridos de glucosa con enlace β -1,4, β -1,3 y β -1,2 alternados incrementan la viscosidad de los mostos) actúan de manera exo y endo en su sitio de acción, las endoglucanasas son las más importantes y son de gran importancia ya que en cada corte disminuye la viscosidad.

Se generan al inicio de la germinación y se encuentra presente en el grano en pequeñas cantidades.

Amilasas (1, 5, 26)

- β -amilasa: esta enzima se activa en el inicio de la germinación, esta enzima se encuentra en el endospermo y ya no se sintetiza más enzima durante la germinación. Es una exoamilasa que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena de almidón sobre enlaces α -1,4.
- α -amilasa: esta enzima no se encuentra presente en la cebada, esta se sintetizada durante la germinación en la aleurona y en el germen y se genera en gran cantidad. Es una endoamilasa, es decir, corta por la parte interna de la cadena de almidón, busca los extremos y rompe enlaces α -1,4 para liberar dextrinas.

- α -glucosidasa: esta enzima se encuentra dentro de la cebada pero en poca cantidad y se genera más enzima en la aleurona durante la germinación y se regula por las giberelinas.
- Pululanasa o dextrinasa límite: presente en la cebada y se genera mas en la aleurona durante la germinación, esta enzima actúa sobre enlaces α -1,6.

Proteasas (1, 5, 26)

Presentes en la cebada, se generan más proteasas durante la germinación y se encuentran en diferentes tejidos y actúan según su prefijo.

- Endopeptidasas y carboxipeptidasas se encuentran en el endospermo.
- Aminopeptidasas y oligopeptidasas se encuentran en el embrión.

La producción de enzimas es el propósito primordial del malteado. Éstas son absolutamente necesarias para degradar las moléculas de elevado peso molecular durante el macerado en el proceso de elaboración de cerveza, las enzimas que se encuentran en la malta se activan a diferentes temperaturas para hidrolizar la materia amilácea (tabla 1).

Para minimizar pérdidas, los procesos enzimáticos innecesarios son restringidos durante el último paso del malteo que es el secado o tostado. (1, 5, 26)

Tabla 1 Temperaturas óptimas de acción de las enzimas. (2)

Enzima	Temperatura (°C)	óptima
Endo- β -glucanasas	43-45	
Proteasas	45-50	
β -amilasas	60-65	
α -amilasas	70-75	

Para que una cebada sea considerada para malteo debe de tener un porcentaje de granos germinados superior al 85%, esto con el fin de asegurar una germinación uniforme y por lo tanto una producción uniforme de enzimas (fig. 6a), las cebadas con menor porcentajes de germinación, menor a 85%, no

se utilizan par ser malteadas ya que pueden ser granos dañados o no viables (fig. 6b).



Fig. 6a Grano de cebada con un porcentaje de germinación de 95%



Fig.6b Grano de cebada con un porcentaje de germinación de 55%

El porcentaje de germinación se obtiene haciendo pruebas de energía germinativa y capacidad germinativa, que consisten en la exposición de un numero conocido de granos de cebada a condiciones de humedad, temperatura y oxigeno aptas para que el grano dé comienzo a los procesos germinativos (fig. 7).



Fig. 7 Germinación del grano de cebada (11)

3.2.3.SECADO

Cuando las transformaciones en la malta "verde" (malta verde = grano germinado con elevada humedad) han sido suficientes, la malta se seca.

Con el secado el agua se remueve de la malta y ésta se vuelve entonces estable y almacenable. Durante el secado, además de disminuir el contenido de agua, la germinación y la modificación del grano se detienen y se forman componentes de aroma y color.

Se encuentran entre sus objetivos:

- Permitir que la malta verde (lograda en el proceso anterior) se pueda almacenar.
- Interrumpir los procesos físico-químicos y biológicos.
- Producir un aroma y paladar característico de la malta.
- Permitir la separación posterior de las raicillas, que pueden ocasionar un gusto no deseable en mosto y cerveza.

Nuevamente, el equilibrio a lograr es realizar el proceso en el menor tiempo posible (para no perder ritmo de producción), pero incrementando la temperatura en forma gradual a medida que la malta verde pierde humedad; para no desnaturalizar las enzimas que son sensibles a la temperatura, principalmente cuando todavía hay suficiente contenido de agua. (2, 26)

3.2.4. CRIBADO

Las raicillas que crecen durante el proceso germinativo, están aún adheridos al grano de malta.

Éstas deben de ser eliminadas. Las raicillas y tallos son utilizados en la gran mayoría de los casos como alimento para ganado. (2)

3.3. CERVEZA

Bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada, sólo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y sometido a un proceso de cocción.

Existen 2 tipos de cerveza por el tipo de fermentación, las Lager que son fermentadas por levaduras *Saccharomyces pastorianus* que se depositan al fondo del fermentador (fermentación baja) y las cervezas Ale fermentadas con levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se acumulan en la parte superior del fermentador (fermentación alta) (1, 2, 3, 11)

Las características de producción entre ambas cervezas son muy distintas, dentro de las cuales se destacan el tiempo de fermentación y temperatura (tabla 2).

Las cervezas Lager cuentan con menos aroma y más cuerpo y son las que se consumen en la mayor parte del mundo en que se consume cerveza, las cervezas Ale son más aromáticas y fermentadas a una temperatura más alta, son consumidas mayormente en Inglaterra y el norte de Europa

Tabla 2. Clasificación de las cervezas y condiciones de operación (1)

FERMENTACIÓN		
LAGER	MICROORGANISMO	<i>S. pastorianus</i>
	TEMPERATURA	T _i =7-11°C
		T _f =10-15°C
	TIEMPO	Mayor actividad durante la fermentación= 3-5 días
		Tiempo total= 8-10 días
GRAVEDAD ESPECÍFICA	ρ _{inicial} = 32-40°Plato	
	ρ _{final} = 8-10°Plato	
ALE	MICROORGANISMO	<i>S. cerevisiae</i>
	TEMPERATURA	T _i =15-16°C
		T _f =21-26°C
	TIEMPO	Mayor actividad durante la fermentación= 36 horas
		Tiempo total= 72 horas
GRAVEDAD ESPECÍFICA	ρ _{inicial} = 44-48°Plato	
	ρ _{final} = 11°Plato	

A diferencia de otros países, en México no se cuenta con una norma oficial para cerveza, pero sí una para bebidas alcohólicas fermentadas no destiladas y destiladas que incluye, licores, vino y sidra, la **NOM-142-SSA1-1995**.

3.4. ADJUNTOS

Los adjuntos son fuentes de almidón o azúcares fermentables más baratos, pueden ser granos enteros como el arroz o granos no malteados en hojuelas, pueden ser granos perlados como el sorgo, sémola de maíz, almidón de papa, azúcares invertidos, jarabes de glucosa, maltosa, fructosa o puede utilizarse sacarosa. (1, 2, 5, 11)

Además de reducir costos, la adición de adjuntos también se relaciona con la densidad y textura de la cerveza

La adición de adjuntos se hace durante la etapa de macerado en la elaboración de cerveza, es en esta etapa donde las enzimas de la malta comienzan a actuar exponiéndolas a diferentes temperaturas.

Las enzimas producidas por el grano germinado son suficientes para romper los enlaces del almidón propio del grano a azúcares fermentables e incluso estas enzimas son suficientes para romper los enlaces de almidón de una fuente diferente.

3.5. LUPULO

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta herbácea, de la familia de las cannabáceas, trepadora, de tallo corto y de crecimiento anual.

La siembra es una vez al año y se cultiva con la ayuda de unas guías que permiten el buen desarrollo de la planta. (1,2,5,11)

El lúpulo imparte características como son aroma y el amargor característico de la cerveza además de sus propiedades antisépticas. Es una planta dioica, es decir, posee flores femeninas y flores masculinas. A nivel de cervecería se usan normalmente las femeninas.

Estas flores femeninas son agrupaciones en inflorescencias llamadas conos (fig.8).



Fig. 8 Conos del *Humulus lupulus* (11)

Será en estos conos donde se alberguen unos gránulos de color amarillo llamados lupulina que confieren el sabor amargo a la cerveza.

La lupulina se encuentra rodeada o envuelta por los pétalos o brácteas y el tamaño del cono no supera los 5 cm. Estos polvos amarillos o lupulina son unos granos pegajosos en donde se encuentran las resinas y aceites característicos del lúpulo, todo ello recubierto por una capa de material ceroso.

La composición depende del tipo de lúpulo ya que puede variar el contenido de resinas y aceites esenciales, en su forma deshidratada (comercial) contiene alrededor de 15% de resinas totales y 0.5% de aceites esenciales (fig.9). (11)

El lúpulo se encuentra en el mercado en forma de pellets que es la flor deshidratada y comprimida y como extracto que es obtenido por extracción con hexano o con CO₂ líquido que es una extracción selectiva.

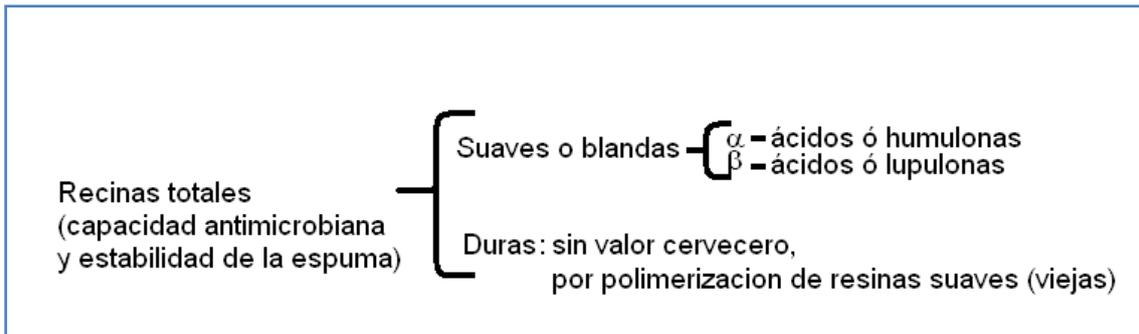


Fig.9 Resinas totales del lúpulo

3.6. LEVADURA

La levadura de cervecería pertenece a la familia Endomycetaceae y al género *Saccharomyces*.

Los tipos de levadura más utilizados en la elaboración de cerveza son:

- *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de fermentación alta (cervezas ale):
Se caracterizan porque fermentan a altas temperaturas de 15 o 25 °C, y además, al finalizar la fermentación, la levadura asciende a la superficie del tanque de fermentación. (1, 2, 3,5, 11, 12)
- *Saccharomyces pastorianus* o levadura de fermentación baja (cervezas lager): Se caracterizan porque fermentan a temperaturas más bajas, de 5 a 15 °C, y se depositan en el fondo del tanque al final de la fermentación.

Estas levaduras son hongos unicelulares que han perdido la capacidad de crecimiento filamentoso.

Morfológicamente, la levadura cervecera tiene una estructura de microorganismo unicelular, eucariota. Su forma puede ser ovoide (en su mayoría), esférica o elíptica y se reproducen por gemación. (30)

En el laboratorio, después de un período de incubación de 48 horas a 28 °C en medio de cultivo enriquecido, se obtienen colonias de color crema a amarillento, con una superficie lisa, sin ser brillante y la periferia también lisa u ondulada.

El sustrato es un factor de crecimiento muy importante, el medio de cultivo debe tener todos los nutrientes necesarios para la levadura.

En la elaboración de cerveza principalmente se utiliza un único tipo de levadura, es decir, un cultivo puro.

La utilización de un cultivo puro se debe a que algunas de las alteraciones más importantes de la cerveza durante la fermentación se dan por bacterias lácticas y a otras levaduras.

Los cultivos puros se preparan mediante aislamiento de una colonia única de manera que se garantice una masa genética homogénea de la levadura por la multiplicación vegetativa.

Las ventajas de trabajar con un cultivo puro son la obtención de fermentaciones más regulares, cervezas de sabor más homogéneo y más puro.

Para que la levadura pueda ser utilizada, debe cumplir con las siguientes características antes de verse en la fermentación:

- Las células vivas no se tiñan con azul de metileno.
- Esté libre de contaminaciones microbiológicas.
- Esté en buen estado fisiológico (mortalidad inferior al 10%).
- Presente un buen aspecto microscópico en su morfología. (11, 15)

El inóculo debe agregarse al mosto en el momento que exista aereación y aún exista agitación ya que durante el tiempo en que se lleva a cabo la fermentación no hay agitación.

La cantidad de microorganismos está relacionada con la composición del mosto, la temperatura de siembra, la aireación y las condiciones de fermentación.

Una dosis baja retarda el descenso de pH y no se produce una atenuación adecuada.

Una dosis elevada acelera la fermentación, pero las células más viejas producen autólisis que pueden dar textura espesa y sabor desagradable de levadura a la cerveza.

Por ello es necesario, para obtener ciclos regulares y uniformes de fermentación, determinar condiciones prácticas que aseguren una correcta dosificación, se recomienda trabajar con un número del orden de 10^6 microorganismos por cada litro de mosto dulce o 0.6 g/L de levadura seca.(11)

3.7. ETAPAS DE LA ELABORACIÓN DE CERVEZA

El proceso de elaboración de cerveza consta de tres etapas claramente definidas, que son Coccimiento, Fermentación y Reposo las cuales dependen exclusivamente del tipo de cerveza que se piensa elaborar, debido a que según

la clase de cerveza varía la cantidad y tipo de materia prima. Esta es una de las causas principales por las cuales existen tantas variedades de cerveza (1,2).

Además de la cantidad y tipo de materia prima, existen otras causas que son:

- Tipo y naturaleza de agua cervecera
- Tipo y naturaleza de levadura cervecera
- Tiempos y temperaturas durante el cocimiento
- Tiempos y temperaturas durante la fermentación

(1,2,5,11)

3.7.1 COCIMIENTO

Tiene como objetivo extraer la mayor cantidad de materia amilácea de la malta, el proceso de cocimiento abarca la molienda, macerado, filtración, ebullición del mosto y enfriamiento del mosto.(1, 5 , 11)

3.7.1.1 MOLIENDA

Consiste en quebrar el grano, respetando la cáscara o envoltura, la malta es comprimida entre dos cilindros pero evitando destruir la cáscara lo menos posible pues ésta servirá de lecho filtrante en la operación de filtración del mosto. (1, 5 , 11)

3.7.1.2 MACERADO

Fase del proceso donde se extraen de la malta y eventualmente de los granos crudos (en el caso que se use algún adjunto) la mayor cantidad de extracto y de la mejor calidad posible en función al tipo de cerveza que se busca fabricar. La extracción se logra principalmente por hidrólisis enzimática, solamente un 10% de la extracción es debida a la simple solubilización. Las amilasas desdoblan el almidón en dextrinas y maltosa principalmente, las enzimas proteolíticas desdoblan las proteínas complejas en materias nitrogenadas solubles, la fitasa es la enzima que hidroliza la fitina en inositol y fosfato, etc. Estas transformaciones enzimáticas han sido ya empezadas durante el malteo a un ritmo mucho menos intenso de el que sucede en el cocimiento, donde debido a la acción de las diferentes temperaturas y la gran cantidad de agua las reacciones suceden a un mayor ritmo, para esto se selecciona una curva de sacarificación, existen curvas simples y complejas que dependen del tiempo y temperatura durante la hidrólisis enzimática del almidón (fig 10). (5)

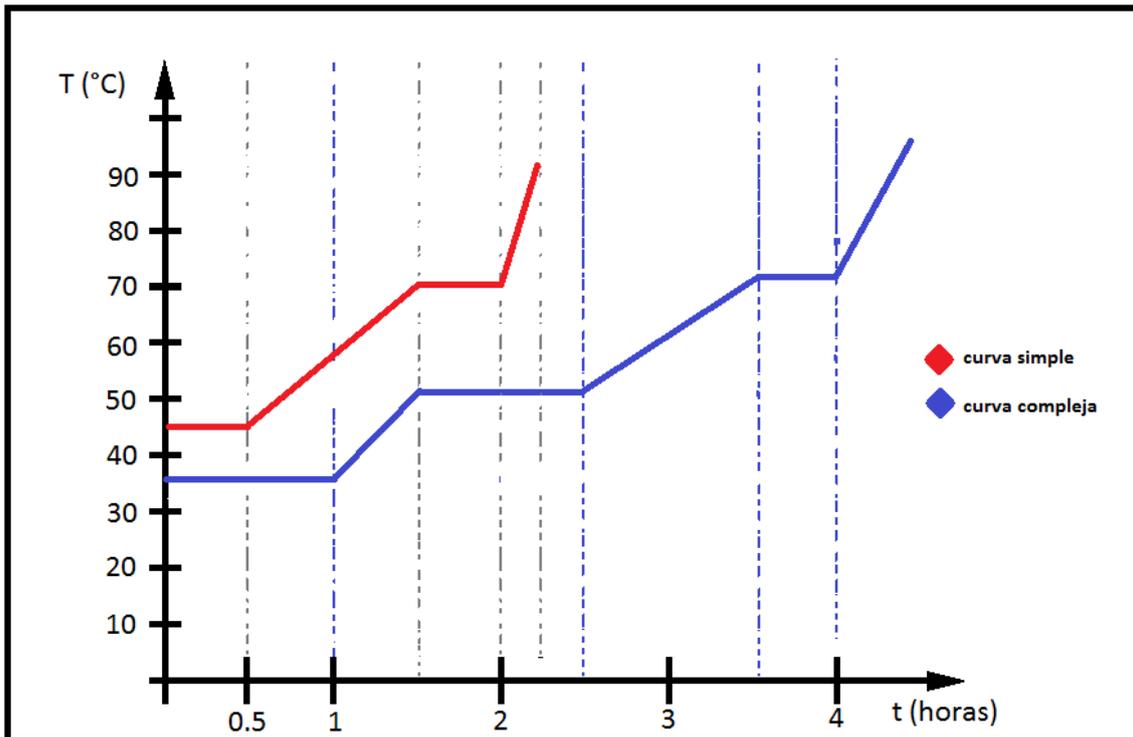


Figura 10 Curvas de sacarificación (5)

En el endospermo se pueden encontrar dos estructuras distintas de almidón, la amilosa es una cadena lineal de glucosa unidas por enlaces α -1,4 (fig. 11a) y la amilopectina que es una cadena ramificada, estas ramificaciones se encuentran entre el carbono 6 (C6) de una glucosa de la cadena principal y el carbono 1 (C1) de la cadena que forma la primera rama (enlaces α -1,6) (fig.11b).

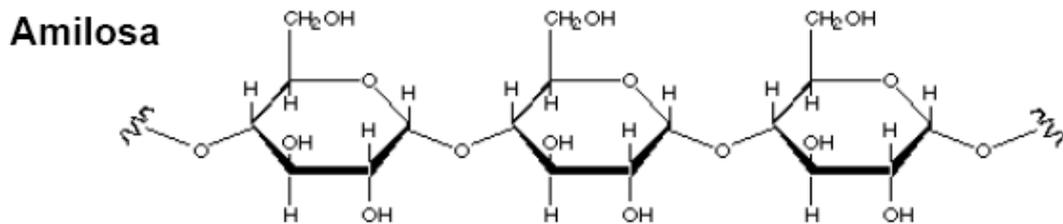


Fig.11a moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 de la cadena de amilosa (5)

Amilopectina

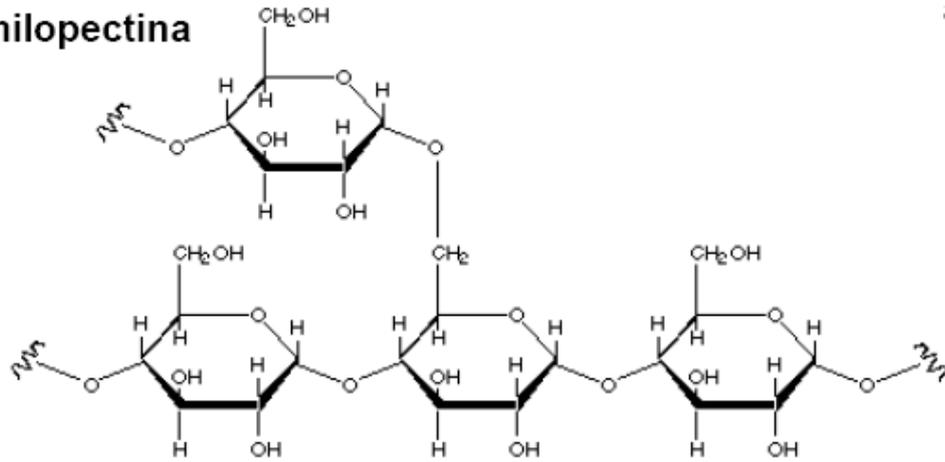


Fig.11b moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 y α -1,6 de la cadena de amilopectina (5)

La hidrólisis enzimática de la amilosa es llevada a cabo primero por la β -amilasa cortando por el extremo no reductor dando como producto maltosa, después la α -amilasa hidroliza por extremo no reductor dejando como producto glucosa (fig. 11c).

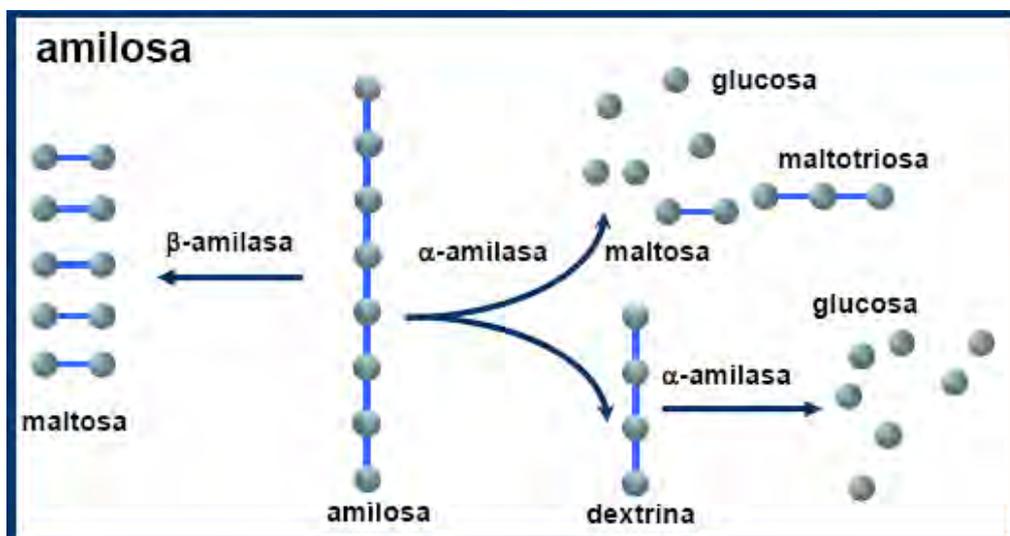


Fig. 11c Degradación enzimática de la amilosa

La hidrólisis de la amilopectina es muy similar, la β -amilasa hidroliza el extremo no reductor dando como productos maltosa y dextrinas límite, la α -amilasa corta en los enlaces α -1,4 y α -1,6 y algunas veces en α -1,3, (fig.11d) la hidrólisis enzimática de la amilopectina

da como producto una mayor concentración de dextrinas y esto se ve reflejado en mostos con mayor viscosidad (mostos con mayor cuerpo).(1, 5, 11)

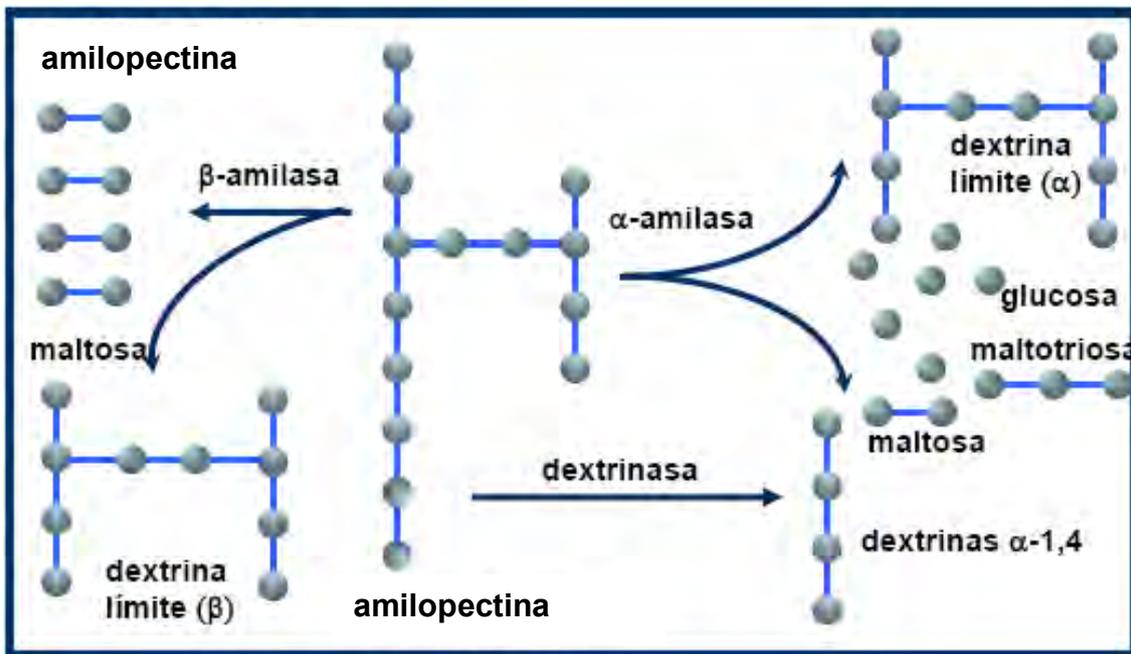


fig. 11d degradación enzimática de la amilopectina

3.7.1.3 FILTRACIÓN DE MOSTO

Habiendo ya disuelto las materias solubles por el cocimiento es necesario separar el mosto de la parte insoluble. La operación se realiza en dos fases primero el flujo del mosto y luego la operación de lavado del extracto que contiene el grano gastado. El mosto y el agua de lavado deben ser claros pues si se aporta durante la operación demasiadas sustancias mal disueltas, la clarificación de la cerveza es más difícil.

La calidad de la cerveza puede ser también alterada por un lavado del gabazo o grano gastado con agua alcalina pues los polifenoles y sustancias amargas de la cáscara de la malta se disuelven muy fácilmente en agua alcalina, aún más, si se tiene en cuenta que el lavado se hace en agua a una temperatura máxima de 75 °C. (5, 11)

3.7.1.4 EBULLICIÓN DEL MOSTO

La finalidad de la ebullición es estabilizar enzimática y microbiológicamente el mosto, así como también permite precipitar y desnaturalizar proteínas que provocan turbidez en la cerveza.

La inactivación de las enzimas es realizada para evitar que continúe la hidrólisis del almidón en etapas posteriores al macerado, si existen enzimas activas durante la fermentación continua la hidrólisis de almidón y como producto de esta reacción más azúcares fermentables que son metabolizadas por las levaduras que producen, además de etanol, compuestos que en pequeñas cantidades son benéficas para la cerveza pero conforme aumenta su concentración, alteran las características del producto final.

La esterilización del mosto es por simple ebullición, pues su reacción es ligeramente ácida.

La esterilización e inactivación de las enzimas se realiza en un tiempo no mayor a 40 minutos. (1, 2, 5, 11)

La coagulación y precipitación de proteínas consisten en la ruptura de puentes de hidrógeno en la molécula de proteína, pasando del estado hidratado al deshidratado, manteniéndose en suspensión únicamente por su carga eléctrica, luego de la desnaturalización se produce la coagulación, es aquí donde el pH juega un papel muy importante pues la coagulación será eficiente si se realiza en el punto isoeléctrico; como existen muchas proteínas en el mosto se ha optado por el pH 5.3 que es donde se precipita el mayor número de estas proteínas. (5)

Durante la ebullición la coloración también aumenta sobre todo por la formación de melanoidinas, también por oxidación de taninos, estas dos reacciones son favorecidas por el pH elevado. (2)

El lupulado del mosto se realiza tradicionalmente durante esta operación. (2)

El amargor es obtenido por isomerización de los α -ácidos y β -ácidos del lúpulo. (1,11)

Las isohumulonas son los isómeros de las humulonas y lupulonas, estos isómeros son quienes confieren el amargor a la cerveza.

Por último a lo largo de la ebullición se forman productos reductores que contribuyen a la calidad y estabilidad de cerveza. (2,5,11)

3.7.1.5 ENFRIAMIENTO DEL MOSTO

Una vez que el mosto termina el proceso de ebullición, debe de ser enfriado y se debe retirar la mayor cantidad de sólidos indeseables.

Durante el enfriamiento un nuevo precipitado de polifenoles-proteínas se forma por puentes de hidrógeno y también por la poca solubilidad de las prolaminas.

El paso siguiente es la fermentación por lo que la temperatura a la que debe ser enfriado el mosto está entre los 6 y los 18°C dependiendo de la levadura que se utiliza. (11)

3.7.1.6 FERMENTACIÓN

Tradicionalmente se ha definido a la fermentación cervecera como el proceso anaeróbico mediante el cual la levadura convierte los azúcares fermentables del mosto en alcohol y CO₂ con generación de calor.

La fermentación se produce en dos fases sucesivas:

Fermentación principal:

Se caracteriza por la producción de gas como producto de la metabolización de glucosa (que procede del desdoblamiento de la maltosa), y la formación de una capa superficial de espuma. Durante esta etapa se produce una disminución de la densidad del mosto debido al alcohol producido, un crecimiento de la levadura con respecto a la cantidad inicial de siembra y una importante producción de calor. (12)

Fermentación secundaria

Es menos activa que la etapa anterior. En esta etapa se produce una maduración del aroma y sabor de la cerveza. (12)

3.8. COMPUESTOS CONGENÉRICOS

Las reacciones que ocurren durante la fermentación son mucho más complejas y afectan a todos los componentes del mosto que son asimilados por la levadura. Tales compuestos, resultantes del metabolismo de la levadura son: Los alcoholes superiores, ésteres, cetonas, aldehídos, sustancias azufradas, ácidos orgánicos, estos compuestos son los llamados congenéricos. (1, 5)

Su naturaleza es principalmente de 4 tipos:

•Alcoholes

Alcoholes superiores o alcoholes de fusel que son cadenas de 3-5 carbonos con sus posibles isómeros. Ejemplo: propanoles, butanoles, pentanoles, otros alcoholes como el feniletanol, alcohol amilífico, alcohol isoamílico, glicerol y metanol.

Los precursores de los alcoholes superiores son los aminoácidos (fig. 12).

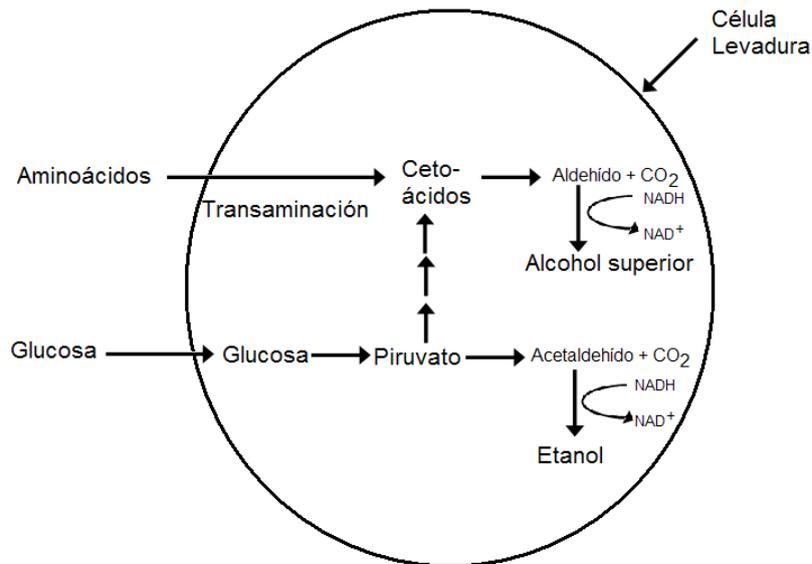


Figura12. Producción de etanol a partir de glucosa y producción de alcoholes superiores por transaminación de aminoácidos. (19)

La leucina produce alcohol isoamílico, la isoleucina alcohol amílico y la valina al alcohol isobutílico.

Lo primero que ocurre con los aminoácidos es una desaminación, lo cual produce un α -cetoácido, el cual después es descarboxilado y convertido en un n-aldehído que al reducirse produce un alcohol.

La desaminación es realizada por una desaminasa específica de cada aminoácido.

La producción de n-propanol es un caso distinto ya que la treonina, que es un aminoácido polar no cargado, primero se desamina y se deshidrata, las reacciones simultáneas catalizadas por la treonina-deshidrogenasa dan como producto un α -cetoácido que se descarboxila hasta n-aldehído.(fig.13)

La formación de alcoholes superiores depende de los aminoácidos presentes en el medio y los que se producen en las distintas vías metabólicas, las cuales dependen del microorganismo empleado. (20)

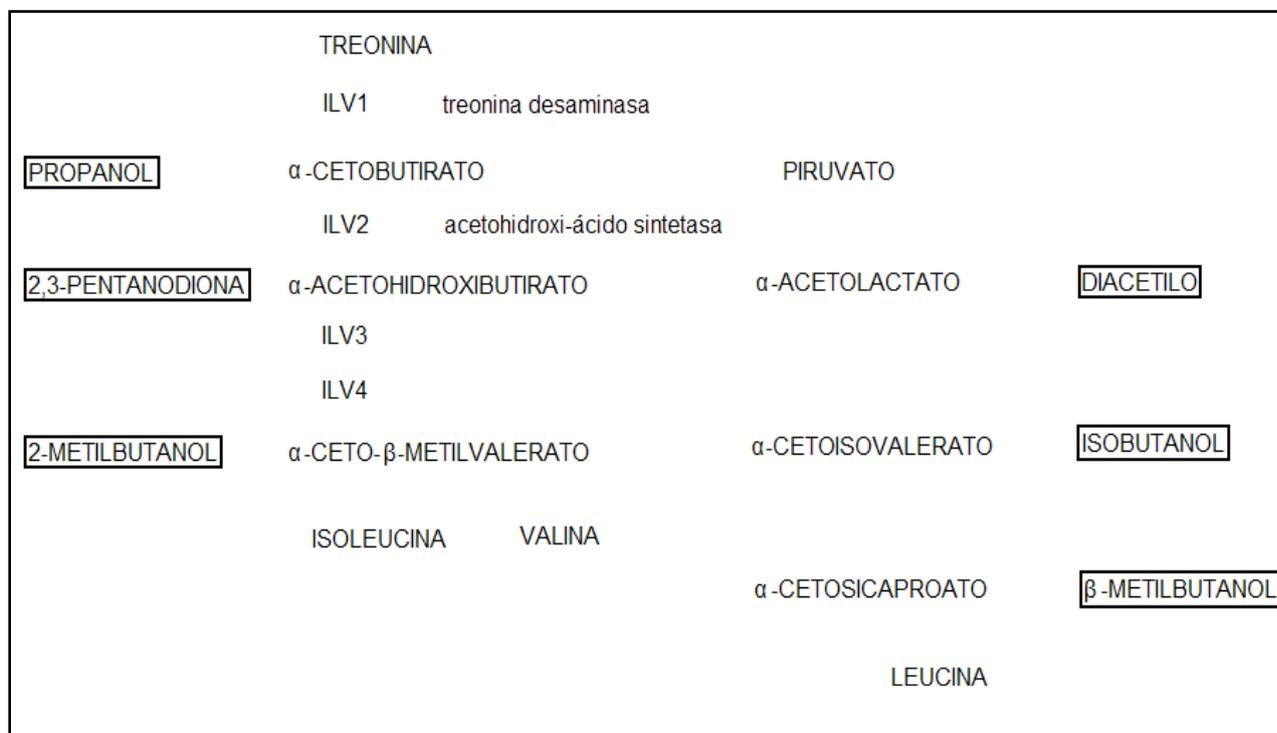


Figura13. Intermediarios en la ruta metabólica isoleucina-valina en *Saccharomyces cerevisiae*, asociados a compuestos activos de sabor. Abreviaciones para los genes ILV1 treonina desaminasa; ILV2 acetohidroxi-ácido sintetasa; ILV3 acetohidroxi-ácido reductoisomerasa; ILV4, dihidroxi-ácido deshidratasa. (20)

•Carbonilos

Aldehídos o cetonas como el diacetilo y la acetoína.

Son los más importantes y más ampliamente estudiados en las bebidas alcohólicas.

Por ejemplo:

El acetaldehído se forma en el último paso de la vía glucolítica y alcanza un máximo durante la primera fase de la fermentación. Sus niveles pueden verse incrementados debido a la aireación, a la presencia de dióxido de azufre, deficiencia en vitaminas, principalmente en ácido pantoténico o en tiamina y la pasteurización.

Las diacetonas vecinales tienen un sabor a mantequilla dulce, el diacetilo es el más importante por tener umbrales de identificación muy bajos (0.1 mg/L)

comparado con otros compuestos. Se forman por descarboxilación oxidativa de acetohidroxiácidos que son secretados por la levadura (fig. 14).

El diacetilo es producido a partir del α -acetolactato, un intermediario en la biosíntesis de valina y leucina, mientras que la 2, 3-pentadiona es producida de α -acetohidroxibutirato, un intermediario en la biosíntesis de leucina. (3,5)

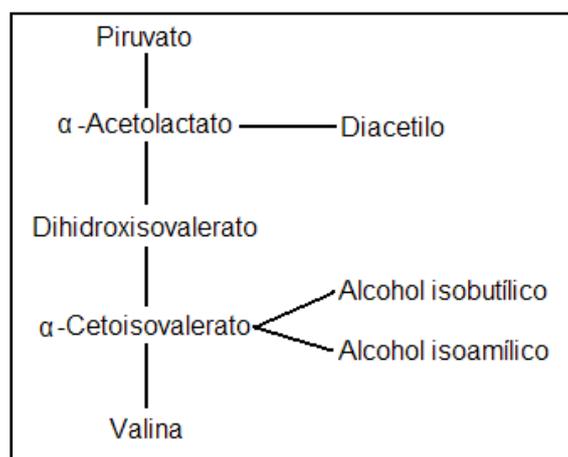


Figura 14. Biosíntesis de diacetilo en cerveza. (20)

La levadura remueve el diacetilo para convertirlo en compuestos de menor sabor como la acetoína y el 2, 3-butanediol, la enzima responsable de este paso es la diacetil-reductasa aunque también interviene la alcohol deshidrogenasa.

•Ésteres

Los ésteres son los compuestos congénicos que están en mayor proporción en las bebidas alcohólicas. Se producen intracelularmente debido a la condensación de ésteres con CoA de ácidos grasos con alcoholes, cuando se forman son liposolubles y se difunden de las células de levadura al medio de fermentación. Esta reacción es catalizada por una alcoholaciltransferasa.

En medios ricos en glucosa como única fuente de carbono se genera en mayor concentración ésteres de acetato, esto debido a una actividad muy alta de la transferasa; en cambio cuando existe maltosa, se suprime la actividad de esta enzima y se acumulan ácidos grasos insaturados. (20)

En los casos en los que esta presente la fructosa, se reduce la formación de ésteres debido a que decrece la actividad de la enzima, mientras que aumenta

la formación de alcoholes superiores. Se han identificado en la cerveza aproximadamente 80 que van desde el C3 hasta el C17. (5)

•Ácidos orgánicos

La formación de los congenéricos es muy variable y dependen de la materia prima, el uso de otras fuentes de almidón, la temperatura de fermentación, la temperatura de maduración, agitación, tipo de levadura y presencia de otros microorganismos además de las operaciones sucesivas al proceso de fermentación.

Todos estos compuestos juegan un papel fundamental y determinante en el sabor, en el perfil aromático y en las características finales de la cerveza, estos compuestos, acetaldehído, acetato de etilo, 2-butanol, propanol, isobutanol, 2-pentanol, alcohol amílico, alcohol isoamílico, alcohol amílico, lactato de etilo, ácido acético, furfural y fenil etanol son comunes en todas las bebidas alcohólicas fermentadas no destiladas pero lo que hace distintas a estas bebidas son las diferentes concentración de estos compuestos, existen otros congenéricos que son indicadores de calidad como lo son el diacetilo y el metanol que puede provenir de la misma levadura o de la desmetilación de las pectinas, estos compuestos no deben existir o por lo menos deben de estar en una concentración muy baja ya que el metanol es toxico y el diacetilo imparte aroma a mantequilla y paladar grasoso. (1,2,5)

3.9. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE CRECIMIENTO CELULAR, PRODUCCIÓN DE ETANOL Y COMPUESTOS CONGENERICOS

La temperatura influye notablemente en el crecimiento celular y cada microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento que influye en la reducción del tiempo de la fase estacionaria y del tiempo de generación. Sin embargo con la temperatura se puede producir crecimiento celular más lento en rangos amplios; por ejemplo para las levaduras del género *Saccharomyces* el rango está entre 0 y 28 °C.(2,5,11)

La cantidad y naturaleza de los congenéricos que se producen en las cervezas dependen en gran medida de la temperatura de fermentación (fig.15 y fig.16).

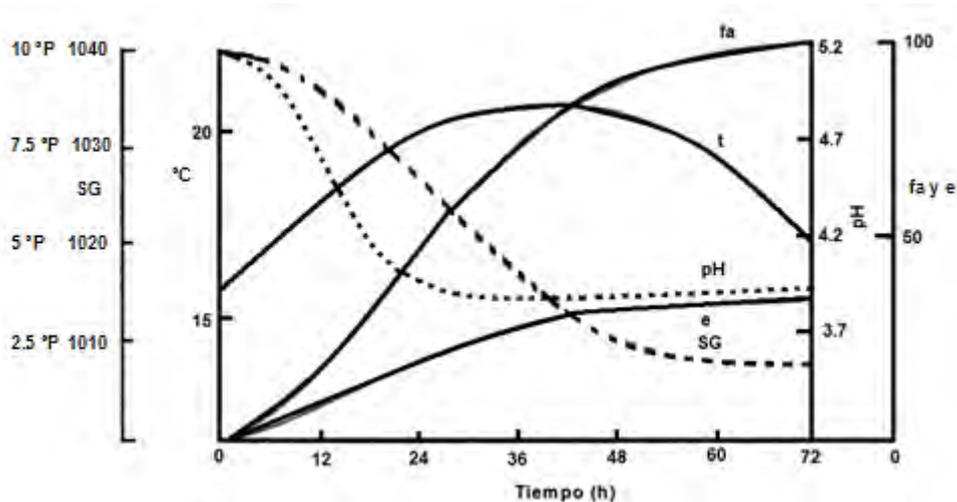


Figura 15. Curso de una fermentación con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (5)
 SG = densidad del mosto (°plato), T= Temperatura (en °C), Fa: Contenido de alcoholes de fusel (en mg/L), E: Contenido en ésteres (en mg/L).

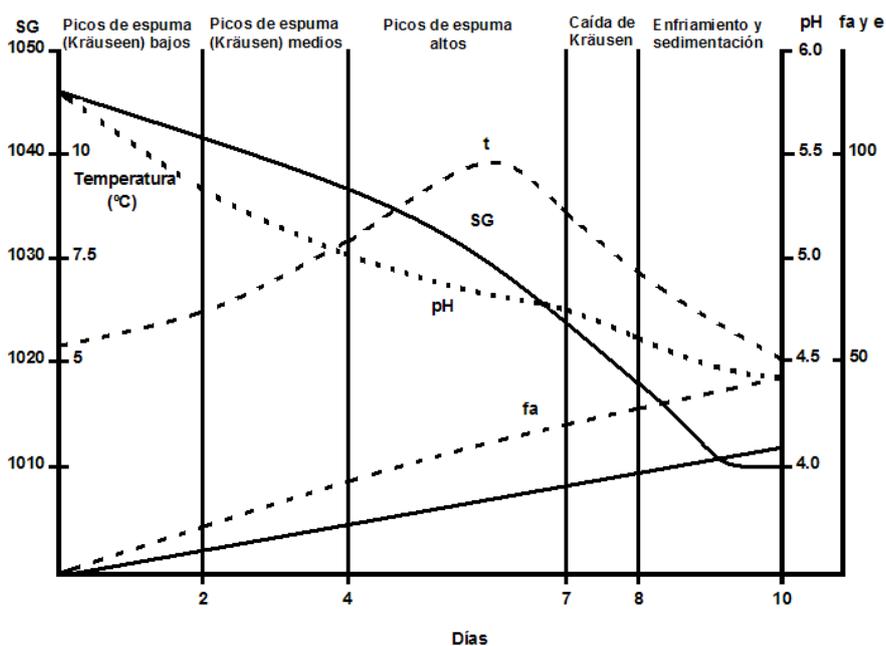


Figura 16. Curso de una fermentación con una levadura *Saccharomyces pastorianus* (5)
 SG=Densidad del mosto (° plato), t=Temperatura (°C), Fa=contenido de alcoholes de fusel (en mg/L), e=contenido de ésteres (en mg/L).

El diacetilo, es uno de esos compuestos que imparten características desagradables en la cerveza y se obtiene a partir del 2-acetolactato y a mayor temperatura de fermentación es mayor la producción de 2-acetolactato.

El acetolactato se descarboxila y después se oxida químicamente en el mosto o en la cerveza, para producir diacetilo ($\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$). La levadura es capaz de producir el 2, 3-butanodiol ($\text{CH}_3\text{CHOHCHOHCH}_3$), un compuesto que no imparte aroma, la levadura es capaz de reducir el diacetilo mientras este se difunde al interior de la célula por medio de una reductasa que utiliza como coenzima al NADH_2 (fig. 17). (1,2,4,5,11)

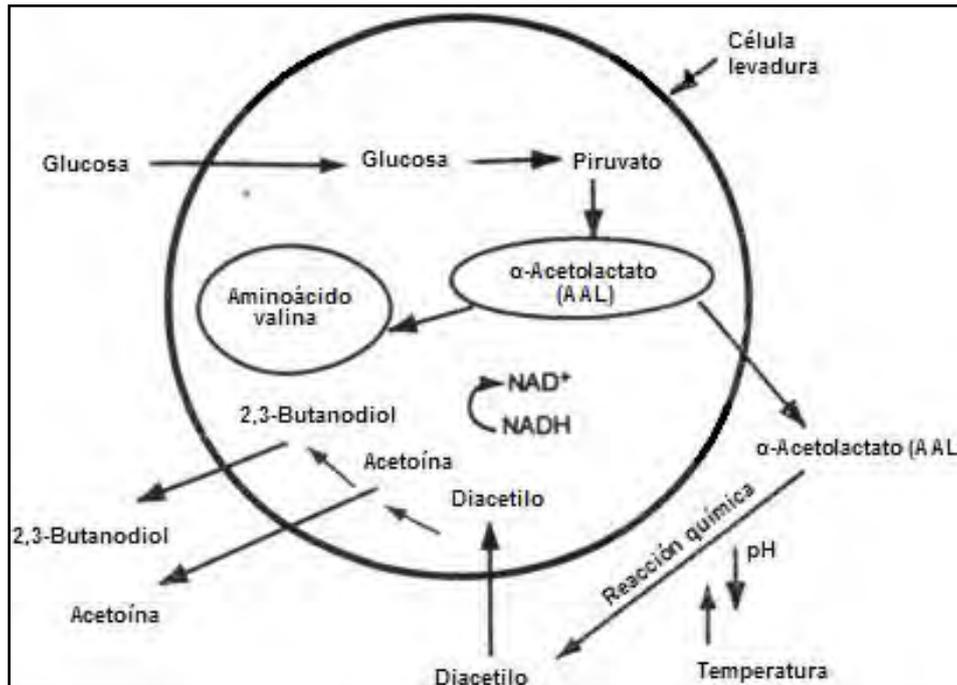


Figura 17. Esquema de la producción de diacetilo. (19)

3.10. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (MEFS)

Es una técnica basada en la extracción de analitos de la muestra mediante el empleo de una fibra de sílice fundida que se encuentra recubierta de un adsorbente de origen polimérico, seguida de la desorción de los analitos por efecto de temperatura o disolventes orgánicos. Las fibras se encuentran dentro de una jeringa facilitando su manipulación y protegiéndola cuando no se utiliza (fig. 18). (13,18, 19)

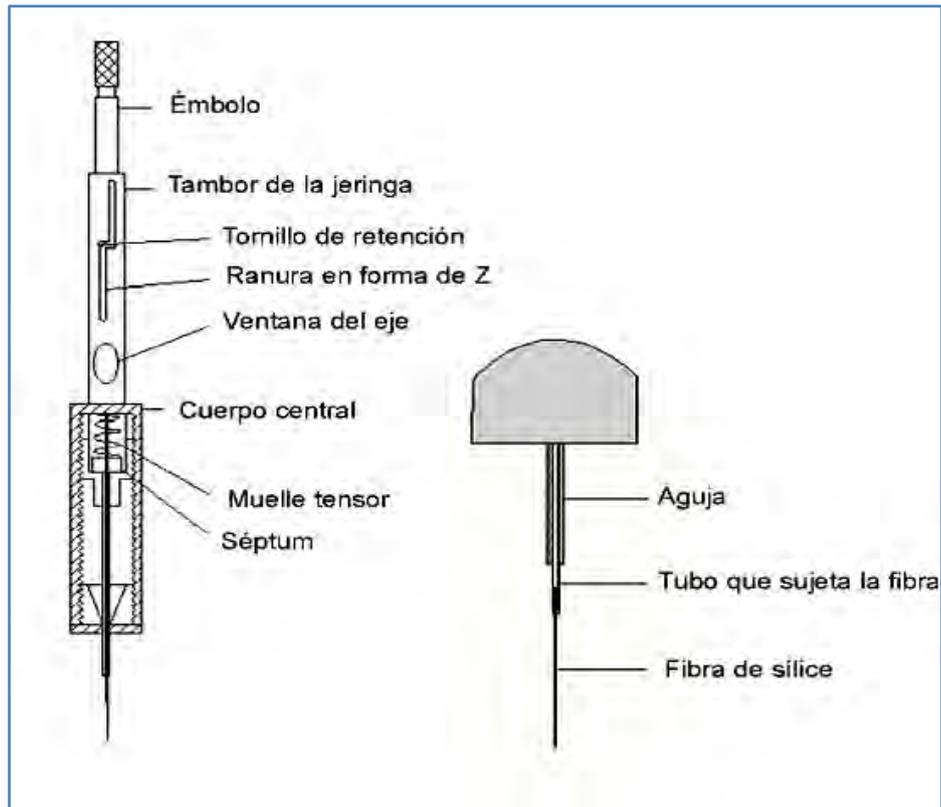


Figura 18. Esquema del dispositivo comercial de MEFS. (21)

El principio en el que se basa es la repartición de los analitos de la muestra en el recubrimiento de la fibra, así el transporte de los analitos comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando se ha alcanzado un equilibrio entre la muestra y la fibra.

Dependiendo del tipo de recubrimiento, los compuestos de la muestra son removidos por absorción en el caso de los líquidos y adsorción para los sólidos. Existen básicamente dos modos de extracción la inmersión directa (ID) y el espacio de cabeza (Head Space, HS) (fig.19).

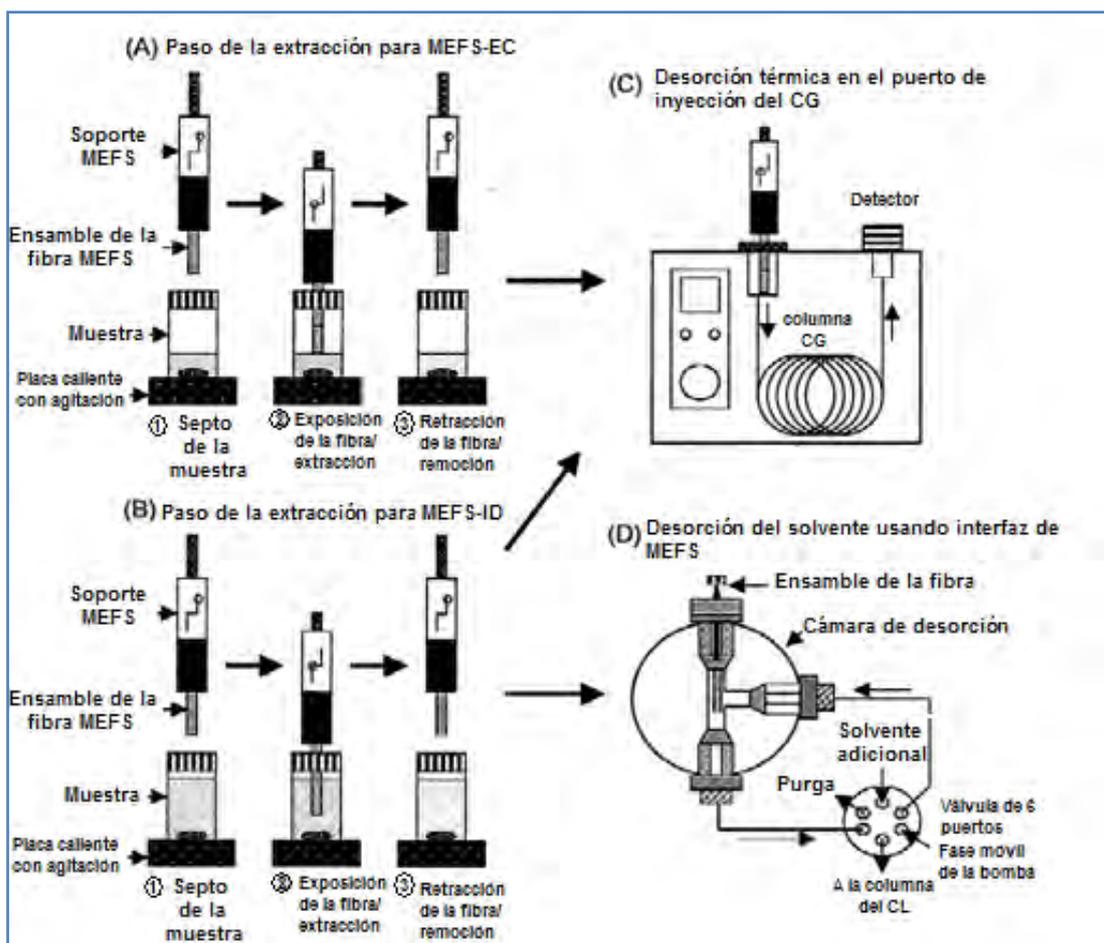


Figura 19. Representación gráfica de las formas de microextracción y los equipos empleados para la identificación y cuantificación de analitos. (22)

De acuerdo a la naturaleza de la muestra es la técnica a emplear. Los líquidos se analizan por inmersión directa, los sólidos y gases por espacio de cabeza. Es necesario que la fibra empleada sea la adecuada para la extracción del analito que está en la muestra, para lo cual es necesario tomar en cuenta la polaridad, el tamaño de partícula, etc.

Por ejemplo, para:

- Compuestos de bajo P.M. o volátiles se puede utilizar una fibra polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μm .
- Compuestos de alto P.M. o semivolátiles, la extracción es más efectiva con fibra PDMS 30 μm y PDMS 7 μm .
- Compuestos muy polares de matrices polares se utiliza una fibra poliacrilato 85 μm .

- Analitos polares volátiles (OH, NH₂), se utiliza una fibra en donde se adsorban y liberen eficientemente, en una fibra polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) 65 um.
- Trazas de compuestos volátiles es recomendable el uso de una fibra PDMS – Carboxen 75 um.
- Analitos C3 – C20, se usa la fibra DVB – Carboxen 50/30 sobre fibra PDMS.

La microextracción es una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo, las señales traducidas en el cromatograma permiten la identificación y la cuantificación (por medio de un desarrollo matemático) de los analitos de interés. (1,2,5,11,21)

4. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto que tiene la temperatura (13-14 °C y 19-20 °C) sobre la producción de compuestos congénicos (N-propanol, butanol, 2-feniletanol, acetaldehído, ácido acético, diacetilo, acetato de isoamilo) en cerveza producida utilizando malta de cebada Gabyota de Tecocomulco Hidalgo.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si las cebadas, producidas en la laguna de Tecocomulco en el estado de Hidalgo, de la variedad Gabyota son adecuadas para el malteo.
- Determinar las condiciones de malteo para la cebada Gabyota de Tecocomulco Hidalgo.
- Determinar la concentración de compuestos congénicos que existe en un mosto de malta de cebada Gabyota de Tecocomulco Hidalgo, mantenido durante la fermentación, a 13-14 °C y 19-20°C.
- Determinar la concentración de etanol en mostos de malta de cebada Gabyota de Tecocomulco Hidalgo mantenidos durante la fermentación a 13-14 °C y 19- 20°

5. HIPÓTESIS

La temperatura es un factor importante en la producción de compuestos congénicos durante la elaboración de cerveza, por lo tanto los perfiles, es decir el número y concentración de estos compuestos congénicos, serán diferente en un mosto fermentado a 13-14°C y en otro fermentado a 19-20°C.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES FISICAS DEL DEL GRANO DE CEBADA GABYOTA DEL ESTADO DE HIDALGO.

Se utilizó un lote de 18.6 Kg de cebada de la variedad Gabyota proveniente de la laguna de Tecocomulco en el estado de Hidalgo, cosecha 2008.

6.2.1 PESO HECTOLÍTRICO DE LA CEBADA

El grano se dejó caer desde una altura de 20 cm hasta que se desbordara en sobre una caja de madera con un volumen de 1L previamente pesada en una balanza granataria OHAUS Triple beam 700/800 (548 4-B), se rasó con una regla en forma de zig-zag, se pesó el grano y se calculó en $\text{Kg}/_{\text{HL}}$.^(9,14)

6.2.3 CAPACIDAD GERMINATIVA DE LA CEBADA

Se prepararon 2 lotes de 200 granos cada uno, se remojaron durante 2 días en 200 mL de una solución de peróxido de hidrógeno ($7.5 \text{ g}/_{\text{L}}$) a $19.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ en una incubadora Fischer (1484413). Se eliminó esa solución y se reemplazó con una nueva solución de peróxido, se remojó la semilla a las mismas condiciones de temperatura sólo que durante 1 día. Se eliminó la solución y se contaron los granos que desarrollaron raíz.⁽¹⁵⁾

6.2.4 ENERGÍA GERMINATIVA DE LA CEBADA

Se colocaron 2 círculos, de 5 cm de diámetro, de papel filtro en una caja petri y se agregaron 4 mL de agua destilada, y en otra se agregaron 8 mL, sobre ellos se colocaron lotes de 100 granos, simultáneamente. Se taparon las cajas petri y se incubaron en una incubadora Fischer (1884413) se contaron los granos que germinaron a las 24, 48 y 72 horas. El resultado se reportó en números enteros y tomando como total la suma de los granos germinados.⁽¹⁵⁾

6.2.5 DETERMINACION DE HUMEDAD

Fue determinada, para el caso de la malta y la cebada, de acuerdo al método rápido de la termobalanza tomando $5.0 \pm 0.5 \text{ g}$ de grano entero en un aparato Halogen MB35 (2198985).⁽¹⁶⁾

6.2.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR MÉTODO KJELDAHL

DIGESTION:

Se pesaron 0.1g de muestra molida y se colocaron en un tubo de Kjeldahl, se agregaron 0.15g de sulfato de cobre pentahidratado, 2.5g de sulfato de sodio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Se calentó la mezcla en la parrilla a 360°C

Se accionó la trampa de succión de gases antes de que se produjeran éstos, se calentó hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir hasta que el líquido quedó transparente, con una coloración azul verdosa. Una vez que se finalizó la digestión en el equipo Büchi K437 (1787999), sin retirar la unidad de evacuación de gases, se colgó el portatubos para enfriar.

DESTILACIÓN

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se adicionaron 50 mL de HCl 0.1N y 50 mL de ácido bórico 4% con indicadores, se conectó el equipo de destilación Büchi K314 (1787998) y se guardó un tiempo hasta que se generara vapor.

Se colocó el tubo de digestión, con la muestra diluida y las sales disueltas con un volumen de 10 mL de agua destilada, en el aparato de destilación teniendo cuidado de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución.

Se accionó el botón blanco para adicionar sosa al 36% (hasta 40 mL aproximadamente).

Se colocó la palanca de vapor en posición "ON" hasta alcanzar un volumen de destilado en el matraz Erlenmeyer de 100-150mL, se lavó la alargadera con agua destilada, y se recogió el agua de lavado sobre el destilado. Una vez finalizada la destilación, se regresó la palanca de vapor a la posición original.

TITULACIÓN

Se Tituló el exceso de ácido con una solución de NaOH 0.1 N

Se calculó el % de proteína considerando las reacciones que se llevaron a cabo.

Se utilizó el factor de conversión de 6.25 y se reportó como % de proteína. ^(22, 23)

6.2.7 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE ALMIDÓN

Se colocaron 2 mL de la solución problema, preparada con 1 g. de grano molido en 100 mL de agua destilada en un tubo de ensayo, esta mezcla se calentó hasta gelatinizar el almidón, a la mezcla se adicionaron 3mL de una

solución de I/KI que se preparó diluyendo 2 mL de solución de yodo en 100mL de agua.

Se midió la intensidad del color azul producido en un espectrofotómetro a 600nm, frente a un blanco de reactivos.

Se calculó la cantidad de almidón presente en la muestra a partir de una curva patrón (anexo 2) preparada en el intervalo de 0.02-0.2 mg de almidón soluble/mL, tratada de la misma manera que la muestra problema.

6.3 ELABORACIÓN DE LA MALTA

Se maltearon lotes de 200g de cebada Gabyota de Hidalgo.

REMOJO

Se colocó el grano en una bandeja de plástico rectangular, dejando que el grano ocupara toda el área de la bandeja, se colocó agua suficiente para cubrir con 2 veces el volumen del grano con agua potable, una vez embebido el grano se mantiene a movimiento constante (ver condiciones de tiempo y temperatura en la tabla 3)

Al finalizar el tiempo de remojo se retira el agua excedente

GERMINACIÓN

Cuando al grano remojado se le retiró el excedente de agua, se colocó el grano en una charola de plástico y se tapó con manta de cielo para permitir la salida de CO₂ de la respiración del grano, el grano fue constantemente movido evitando el enredamiento de las raicillas (ver condiciones de tiempo y temperatura en la tabla 3).

SECADO

Cuando la gluma del grano alcanzó un tamaño que correspondió a $\frac{3}{4}$ del tamaño del grano, fue el momento de secar el grano, se colocó el grano extendido en charolas perforadas de aluminio y se taparon con papel aluminio, las charolas tapadas se colocaron en una estufa y el grano fue movido constantemente. (ver condiciones de tiempo y temperatura en la tabla 3)

Tabla 3 Condiciones de remojo, germinación y secado de la cebada GABYOTA

Operación	Condición 1	Condición 2
Remojo	Agua 25°C / 24 horas	Agua 15°C / 48 horas
Germinación	Incubadora 25°C / 48 horas	Incubadora 15°C / 72 horas
Secado	Estufa 85°C / 12 horas	Estufa 60°C / 24 horas

6.4 DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS Y TEMPERATURAS DE SACARIFICACION DE LA MALTA

Se preparó una mezcla con 200g de malta molida con 1L de agua potable en un matraz Erlenmeyer de 500mL, la mezcla se colocó en una parrilla a temperatura controlada, se comenzó el calentamiento de mezcla hasta llegar a una temperatura de 40°C, la mezcla se mantuvo a esa temperatura por un lapso de 25min, una vez transcurrido el tiempo se elevó la temperatura a razón de 1°C cada minutos aproximadamente hasta llegar a 45°C, una vez que se alcanzó la temperatura, se mantuvo la mezcla a 45°C durante 30min, cuando se cumplió este tiempo se elevó la temperatura 1°C minutos aproximadamente hasta llegar a una temperatura de 65°C, cuando la mezcla estaba a esa temperatura se mantuvo por 30min, se elevó una vez más la temperatura 1°C por minuto hasta llegar a 75°C y se mantuvo a esa temperatura por 35min, una vez transcurrido el tiempo se eleva la temperatura hasta 90°C para la inactivación enzimática.

6.5 EXTRACTO DE LA MALTA UTILIZANDO EL MÉTODO DE REMOJO

Se hizo una sacarificación controlada iniciando a 45 °C durante 30 minutos, aumentando la temperatura 1 °C por minuto aproximadamente hasta llegar a 70 °C en un baño Techne TE-10A Tempette (02276161), se hizo una medición cualitativa de presencia de almidón yodométricamente, tomando una gota de muestra y agregando una gota de la solución de yodo, por intervalos de 5 minutos hasta completar una hora. El contenido se filtró con gasa y embudo de cristal, se colectó una muestra para determinar la densidad específica por medio de un picnómetro y se pesó en balanza analítica Precisa XT 120A. (15)

El contenido de extracto de la malta fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$a) \quad E_1 = \frac{P(M + 800)}{100 - P}$$

$$b) \quad E_2 = \frac{E_1 \times 100}{100 - M}$$

Donde:

E1= El contenido de extracto en la muestra, en % (m/m).

E2= El contenido de extracto en la malta seca, en % (m/m).

P= El contenido de extracto en el mosto, en % Plato.

M= El contenido de humedad de la malta, en % (m/m).

800= La cantidad de agua destilada agregada en el remojo a 100 g de malta.

Se expresó el resultado en % (m/m) con 1 cifra significativa. ⁽¹⁵⁾

6.6 PODER DIASTÁSICO

Se pesaron 20 g de malta molida en un matraz Erlenmeyer de 500 mL se le agregaron 480 ml de agua destilada fría. La mezcla se colocó en un baño María (Techne TE-10A Tempette (02276161) a 40°C durante 1h con agitación de 90 rpm. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó con agua destilada a 520g luego se filtró en fibra de vidrio y embudo de vidrio.

Se colectó el extracto de la muestra.

Se preparó una solución amortiguada con 100mL de una solución de de almidón al 1% m/v y 5mL de un buffer de fosfatos

Se elaboró un blanco en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el blanco contenía 100 mL de una solución de almidón (20 g/L), 2.35 mL de hidróxido de sodio 1 M y 5 mL de extracto de la muestra y un volumen de agua destilada suficiente para tener un volumen final de 200 mL.

La muestra, que contenía 100 mL de la solución de almidón y 5 mL de buffer de acetatos con un pH de 4.3, se dejó reposar 20 minutos en un baño a 20 °C, se agregaron 5 mL del extracto de la muestra se revolvió y se dejó nuevamente en el baño durante 30 minutos; se agregaron 4 mL de hidróxido de sodio para inactivar las enzimas y se llevó el contenido a 200 mL con agua destilada.

Se transfirieron 50 mL de la muestra a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 25 mL de la solución de yodo 0.1 M y 3 mL de hidróxido de sodio y se mezclaron. Se cerraron herméticamente los matraces durante 15 minutos lejos de la luz. Después se agregaron 4.5 mL de ácido sulfúrico 0.5 M y se titularon con una bureta de 50 mL con tiosulfato de de sodio 0.1 M. Fue necesario verificar que el volumen de yodo se encontrara entre los 6 y 12 mL.

(15)

Para calcular la cantidad de maltosa producida bajo las condiciones de hidrólisis se empleó la siguiente fórmula.

$$a) DP_1 = F(V_B - V_T)$$

$$b) DP_2 = \frac{DP_1 \times 100}{100 \times M}$$

Donde:

DP1= El Poder Diastásico de la muestra, en unidades Windisch-Kolbach.

DP2= El Poder Diastásico de la malta seca, en unidades Windisch-Kolbach.

VB= El valor de la titulación del yodo que no reaccionó en el blanco, en mL.

VT= El valor de la titulación del yodo que no reaccionó en la muestra, en mL.

F= El factor de corrección para obtener el resultado por 100 g de malta usada en la extracción.

$F_{10g} = 68.4$, $F_{20g} = 34.2$ y $F_{40g} = 17.1$

M= Contenido de Humedad de la malta, en % (m/m).

Se expresó el resultado en unidades WK con 2 cifras significativas.

6.7 FORMULACIÓN DE LA CERVEZA

Se empleó 1 L de agua, 200 g de malta y 0.6 g de levadura. La sacarificación se llevó a cabo en recipientes de peltre y en un parrilla, controlando la temperatura disminuyendo o aumentando el tamaño de la flama.

Se hizo una curva de sacarificación compleja iniciando a 40 °C durante 25 minutos, después aumentando la temperatura 1 °C por minuto aproximadamente, hasta llegar a 45 °C y manteniéndola ahí durante 25 minutos; posteriormente se elevó la temperatura 1°C por minuto aproximadamente hasta alcanzar 65°C y la temperatura se mantuvo durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se elevó nuevamente la temperatura 1°C por minuto hasta alcanzar 75°C y se mantuvo durante 35 minutos, finalmente, se elevó la temperatura nuevamente hasta alcanzar 90°C para inactivar todas las enzimas y no se agrego lúpulo.

Se filtró el mosto con manta de cielo y se enfrió hasta alcanzar la temperatura óptima de fermentación, 13-14 °C y 20-21°C.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en incubadoras PRECISION (2056443) con temperatura controlada de acuerdo al tipo de fermentación, en fermentadores de vidrio pyrex cerrados con tapa de goma, la tapa de goma tenía colocados un tubo para coleccionar la muestra y una manguera conectada a una trampa de agua para la expulsión de CO₂, los fermentadores eran de 1L de capacidad.

6.8 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES EN °Bx POR MEDIO DE UN REFRACTOMETRO DE CAMPO

Se tomó una gota de la cerveza a temperatura ambiente y se colocó en un refractómetro ATAGO y se hizo la lectura. (2)

6.9 DETERMINACIÓN DEL pH DE LA CERVEZA

Se empleó un potenciómetro OAKTON pH/mV/°C pH 510 series (02284701), calibrado a pH 4 y 7, después se procedió a la determinación con una muestra sin CO₂. (22)

6.10 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES EN EL MOSTO DULCE Y EN LA CERVEZA POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO (DNS) (22)

El reactivo de DNS se elaboro mezclando 80 mL de NaOH al 10% con 150 mL de agua destilada, se agregaron 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado se calentó a 50°C y se agitó constantemente, se agregaron 5 g de DNS y se agito constantemente a 50°C, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró, la mezcla se aforo a 500 mL.

Se tomó 1mL de la muestra de mosto, se adicionó 1mL del reactivo de DNS y se calentó por 5 min en un baño de agua hirviente, se enfrió y diluyó con 10 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua sin la muestra. Se cuantificaron los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada con maltosa en concentración de 0.2 a 2 mg/mL, la medición se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis GBC 911A V2257 (1483892).

6.11 CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CONGENÉRCIOS POR MEFS-EC Y CROMATOGRAFÍA DE GASES

Se prepararon soluciones de 10 000 ppm de cada congenérico (Anexo 3) para determinar el tiempo de retención y se inyectaron de forma manual en el cromatógrafo de gases Agilent 6890N con un detector de flama ionizante (FID) para la separación de los compuestos se utilizó una columna Quadrex 007-CW-601.0F que es 100% oxígeno resistente de 60 m X 0.25 mm X 1.0 µm, la temperatura del inyector fue de 250 °C con split 1:10 con un flujo 20 mL/min, un flujo total de 28.3 mL/min e inyección manual. La rampa de temperatura utilizada fue de 5 minutos a 40 °C, después la temperatura se incremento 5 °C por

minuto hasta 140 °C, se volvió a incrementar 10 °C por minuto hasta 240 °C y ahí se mantuvo 5 minutos.

La temperatura en el detector fue de 250 °C y como gas acarreador se utilizó hidrógeno a un flujo de 40 mL/min, el aire a 400 mL/min y el nitrógeno a 30 mL/min.

Se elaboró una mezcla con los compuestos congenéricos con agua desionizada, 0.45 g de cloruro de potasio, 2.9 g de maltosa y 0.25 g de albúmina de huevo, a esta mezcla se le denomina símil de cerveza.

Este símil se hizo con el fin de observar las señales, que se obtienen en el cromatógrafo, de cada compuesto congénico además de observar que las señales no se sobrepongan para una correcta identificación de los compuestos.

Para la curva de calibración de etanol (Anexo 2) se prepararon muestras con el símil de cerveza, el estándar interno (2-pentanol) a una concentración de 20 ppm y etanol al 20, 10, 5 y 1 % respectivamente, las muestras fueron sometidas a la microextracción por espacio de cabeza. De cada una se tomaron 1.4 mL, se les agregó un 80 % de cloruro de sodio (0.4 g), se colocaron en un baño de agua a 60 °C, durante 7 minutos a 1 400 rpm con una fibra de PDMS/DVB. Después se llevó la fibra al cromatógrafo para exponerla durante 20 minutos a las condiciones antes mencionadas. El tiempo de corrida fue de 40 minutos.

La curva de calibración para cada compuesto congénico se realizó haciendo mezclas de compuestos puros a diferentes concentraciones 500, 250, 50, 25, 5 y 1 ppm; se agregó el estándar interno a 20 ppm y se aforó a 10 mL con el símil de cerveza. Se tomaron 1.4 mL de cada muestra y se les agregó 80% de cloruro de sodio (0.4 g), cada muestra, después de ser salada, se colocó en un baño de agua a 60 °C, durante 7 minutos, a 1 400 revoluciones por minuto a esta velocidad de agitación se produce un flujo turbulento en rotación espiral con trayectoria de corriente cerrada (vórtice) y fue en ese vórtice donde se colocó una fibra de PDMS/DVB, la fibra protegida con el bisel se inyectó, una vez introducido el bisel, se expuso la fibra durante 20 minutos a las condiciones del cromatógrafo antes mencionadas.

El tiempo de cada corrida fue de 40 minutos.

Para el análisis de las muestras de cerveza se agregaron a cada una de ellas el estándar interno a 20 ppm y se aforó a 10 mL, se hizo la microextracción como en los casos anteriores y se llevó al cromatógrafo de gases.

Para la cerveza lager se tomó como referencia el mosto dulce ya que de éste se elaboró una cerveza a 13-14°C y otra a 20-21°C. Las muestras a T 13-14°C fueron t₀C1(sin inocular), t₀C1 (mosto recién inocularado), t₃C1 (72 h de fermentación) y t₅C1 (tiempo final de fermentación); las lager a temperatura de 19-20°C incluían a t₀C2 (mosto sin inocular), t₀C2(mosto recién inocularado), t₃C2 (72 h de fermentación) y t₅C2 (tiempo final de la fermentación). Los cromatogramas fueron analizados, mediante cada una de las curvas de calibración y de acuerdo con la ecuación de la recta obtenida para cada compuesto congénico se llegó a la concentración de los congénicos en ppm.

6.12. CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE ANALITO EN LAS MUESTRAS DE MOSTO DULCE Y CERVEZA.

Para cada compuesto congénico se obtuvo una curva patrón, cada curva patrón tuvo respectivamente una ecuación de la recta (Anexo 2), se determino la concentración de los analitos siguiendo la formula:

$$Y = mX + b$$

donde:

Y = es el Área de los picos obtenidos en el cromatograma

m = es la pendiente

X = es la concentración del analito

b = es la ordenada al origen

Para obtener la concentración X se despeja:

$$X = \frac{Y - b}{m}$$

Por lo tanto la concentración de cada analito se obtiene restando la ordenada al origen del área del pico y dividiendo entre la pendiente.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS A LA CEBADA GABYOTA DEL ESTADO DE HIDALGO

La norma mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003 para productos alimenticios no industrializados –cereal- cebada maltera (*Hordeum vulgare L.* y *Hordeum distichum L.*) para consumo humano⁽²⁴⁾, en el apartado de: “Especificaciones y métodos de pruebas”, señala que, entre las características físicas más importantes, la cebada destinada a elaboración de malta debe de tener un peso hectolítrico (mínimo) de 56 Kg/HL, una humedad de entre 10.5 y 13.5% m/m, un porcentaje de grano germinado superior a 85%.

La cebada Gabyota del estado de Hidalgo con la que se trabajó en este estudio fue recibida en una bolsa negra de polietileno, el lote recibido tenía un peso de 18.7 Kg, en el examen visual no se detectaron manchas de colores que correspondieran a contaminación por hongos.

El peso hectolítrico de esta cebada fue de 56.6 ^{Kg}/_{HL}, fue un valor muy cercano al peso mínimo que indica la norma, este valor sugiere que es un cultivo que estuvo almacenado por mucho tiempo y no bajo condiciones óptimas, se han encontrado valores de 60-66.4 Kg/HL^(1, 2, 5, 9, 11), conforme disminuye el peso por hectolitro disminuye la calidad del grano ya que pueden existir granos huecos que ocupen el mismo volumen, se puede estar perdiendo humedad o puede existir infestación por gorgojos que solo ingieren la materia amilácea dejando el grano con menor peso y el mismo volumen.

La cebada pasó por un proceso de cribado (con una criba del número 10 con abertura de 2mm), para eliminar el grano roto, tierra, piedras y cascarilla, después se hizo una limpieza manual, se eliminaron las impurezas vegetales como fueron las espigas sin grano y algunas otras semillas extrañas, la cebada no contenía grano roído, pelo de animal o insectos.

El porcentaje de humedad de la cebada Gabyota se determinó por triplicado colocando 5 gramos de cebada entera en el plato de una termobalanza, el resultado obtenido fue de 10.55%, nuevamente se tuvo un valor muy cercano al valor mínimo que señala la norma, la humedad de la cebada debe encontrarse entre 10.5 y 13.5%^(1, 2, 5, 9, 11), la cebada que tiene un valor por debajo de esta cantidad tiende a endurecerse y a aumentar la fragilidad del grano haciéndolo más quebradizo.

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos realizados a la cebada Gabyota del estado de Hidalgo y se comparan con los valores estipulados en la bibliografía.

Tabla 4. Resultados de los análisis realizados a la cebada Gabyota del estado de Hidalgo

Determinación	Peso hectolitrico (Kg/HL)	Humedad (%) m/m	Almidón (%) m/m	Proteína (%) m/m	Energía germinativa (% grano germinado)	Capacidad germinativa (% grano germinado)
Valor experimental (cebada Gabyota de Hidalgo)	56.6	10.55	85.9	8.45	93	96
Dato teórico	56-64 ■	10-13.5 ■	80 ◻	10-11.5 ◻	85 ◻	90 ◻

Datos teóricos de una cebada comercial.(■= dato de la NMX-FF-043-SCFI-2003, ◻=dato bibliográfico (1, 2, 5, 11,15))

Comparando los valores obtenidos, en cada análisis, con los datos de la bibliografía (1, 2, 5, 11,15), se puede observar que la cebada Gabyota del estado de Hidalgo posee una cantidad de almidón por encima de la reportada para una cebada comercial, la cantidad de almidón se determinó por triplicado a partir de del filtrado de una mezcla que contenía 1g de grano, molido y tamizado con un tamiz del #4 y 10mLde agua destilada, se calculó la cantidad de almidón de las muestras a partir de una curva patrón (anexo 2), el porcentaje de almidón es de gran importancia ya que si fuera una cebada con menor contenido de almidón no sería destinada al malteo y la cantidad de proteína, en relación al peso del grano, sería mayor, lo que no es así, la cantidad de proteína de esta cebada es de 8.45% m/m, se determino por triplicado digiriendo un gramo de malta molida según la metodología descrita por Kjeldahl, la cantidad de proteína debe encontrarse entre 10 y 11.5% (1,5,11), resultados de proteína menores de este porcentaje se ven reflejados en malteos deficientes (1,5,11) y por lo tanto se obtienen maltas deficientes que no proveen de suficientes sustrato para que la levadura se desarrolle correctamente durante la fermentación(3,11), por el contrario , un mayor contenido de proteína, superior a 11.5%, en una grano de cebada, no es deseado y la cebada es considerada para ser alimento de ganado, pero si una cebada con alto contenido de proteína se maltea es muy

posible que la malta resultante de esta cebada mantenga el contenido de proteína y esto provoca mostos con turbidez elevada y con alto contenido de aminoácidos precursores de compuestos congenéricos que si se encuentran en mayores concentraciones se consideran como un defecto en el producto final (11).

La capacidad germinativa de la cebada Gabyota de Hidalgo fue determinada por triplicado a muestras de 200 granos que estuvieron sumergidas en peróxido de hidrogeno durante 2 días a una temperatura de 19°C y un recambio de solución de peróxido a las 24 horas, el valor obtenido de granos germinados fue de 96% esto quiere decir que el 96% de los granos de la muestra total son capaces de germinar, este valor es superior al del valor de una cebada comercial, el porcentaje de granos que son latentes es de 7%, el numero de granos que no están en letargo es de 93%(energía germinativa) este valor también se encuentra por encima del valor reportado para una cebada comercial (1,5,11,25,28), esta determinación se hizo por triplicado a 2 lotes de 100g c/u, colocando los granos sobre cirulos de papel filtro de 5cm y agregando cantidades conocidas de agua (4mL para un lote y 8 mL para otro) y contando los granos que germinaron a las 24, 48 y 72 horas.

Si restamos la energía germinativa de la capacidad germinativa (capacidad germinativa – energía germinativa = latencia) obtenemos la latencia, que en este caso es de 3%.

Esta cebada tuvo un alto porcentaje de germinación lo que significa que existe una elevada actividad enzimática dentro del grano de cebada, el tener un porcentaje de germinación alto significa que se tuvo una germinación homogénea y que la producción de enzimas en el grano ocurrió casi al mismo tiempo, una cebada que tiene un porcentaje de germinación menor al 80% no siempre sugiere que el porcentaje restante es de granos dañados, puede ser que el porcentaje restante de granos no germinados esta en letargo o que simplemente van a germinar después y estas cebadas no pueden ser utilizadas para ser malteadas.

7.2 RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS A LA MALTA DE CEBADA GABYOTA DE HIDALGO

En la tabla 5 se puede observar que las condiciones ideales para maltear el grano de cebada Gabyota de Hidalgo son un remojo a 15°C durante 48 con movimiento constante y recambio de agua cada 12 horas, germinación a 15°C durante 72 horas con movimiento constante y un secado en estufa a 60°C durante 24 horas, estas condiciones permitieron obtener una malta con una cantidad de proteína de 8.47% m/m, esta cantidad de proteína se encuentra por debajo del valor teórico para una malta comercial, este resultado tiene una repercusión en la elaboración del mosto, ya que un contenido muy bajo de proteína (debajo del 10%) da como resultado un mosto en el que la fuente de nitrógeno no es suficiente para que la levadura se desarrolle adecuadamente.

Por el contrario la malta obtenida de cebada Gabyota tiene una cantidad de almidón de 85.9% m/m que se determinó por triplicado por el método yodométrico, esta cantidad de almidón, es muy parecida a la que tienen las maltas comerciales, la importancia de la cantidad de almidón radica en la cantidad de azúcares fermentables que se pueden obtener a partir de la materia amilácea, es por eso que la cantidad mínima de almidón en la malta comercial es de 80% m/m.

Una malta comercial tiene un poder diastásico de 499 WK, el poder diastásico es la medida de la actividad enzimáticas (amilasas) y el valor mínimo reportado es de 360 WK, la malta de cebada Gabyota de Hidalgo tiene un poder diastásico de 407.33 WK, este análisis se hizo por triplicado, las determinaciones se hicieron a las muestras (extractos de las enzimas) de un filtrado de una mezcla de 20g de malta molida en 480 mL de agua destilada.

Se midió la cantidad de enzimas presentes en la malta midiendo indirectamente la hidrólisis de almidón de una solución amortiguada con concentración conocida del sustrato, midiendo la aparición de grupos reductores, este valor de poder diastásico es muy similar al de una malta comercial, este valor es asociado a la capacidad germinativa del grano, el grano comienza a producir enzimas para hidrolizar carbohidratos de reserva para llevar a cabo sus funciones fisiológicas, cuando existe una germinación heterogénea, disminuye considerablemente la producción de enzimas que hidrolizan almidón, los daños

en el grano (en la aleurona) son las principales causas de esta disminución de la actividad enzimática, el grano cuarteado también provoca una disminución enzimática, ya que durante el remojo en el proceso de malteo se pierde gran cantidad de proteína soluble.

Tabla 5. Resultados de los análisis realizados a la malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo.

	Determinación	Humedad (%)m/m	Proteína (%)m/m	Almidón (%)m/m	Poder diastásico (WK)
Condición 1	Valor experimental	5.88	9.5	85.17	283
	Valor teórico	9.47	11.5	80	499
Condición 2	Valor experimental	5.39	8.47	85.9	400
	valor teórico	9.47	11.5	80	499

Datos teóricos de una malta comercial (1, 2, 5, 11,15)

7.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE SACARIFICACIÓN DEL MOSTO

La determinación se hizo por triplicado siguiendo una curva simple y únicamente se obtuvieron mostos con una concentración de 5-5.9 °Bx por lo que se descartó el uso de los tiempos y temperaturas de sacarificación establecidos para esta curva, al hacer las siguientes 3 repeticiones del análisis siguiendo la curva de sacarificación compleja (figura 10) se obtuvieron mostos con 8-8.5°Bx

Se utilizó una mezcla de 200 gramos de malta en 1 litro de agua, el tiempo de sacarificación fue muy extenso, pero sólo siguiendo una curva de sacarificación compleja se pudo tener una mayor cantidad de sólidos solubles.

La dureza del grano de malta estuvo relacionada con la extensión del tiempo de sacarificación puesto que, a pesar de que la malta pasó por un proceso de molienda, hubo fragmentos del endospermo que fueron de gran tamaño, por lo tanto el almidón no fue expuesto por completo para la hidrólisis enzimática.

Iniciar la sacarificación a una temperatura de 40°C durante 25 min y aumentarla lentamente a 55°C para mantener esa temperatura por 30 min fue necesario para mejorar la extracción del almidón por ablandamiento de grano quebrado ya que el almidón de la malta se encuentra insoluble, se lleva a cabo una proteólisis entre 45 y 55°C que ayuda al ablandamiento del grano, esto permite una mayor penetración del agua a estos fragmentos de endospermo para que

el almidón sea gelatinizado y pueda ser hidrolizado por las amilasas, esto nos permitió obtener mostos con 8.5% de sólidos solubles (25).

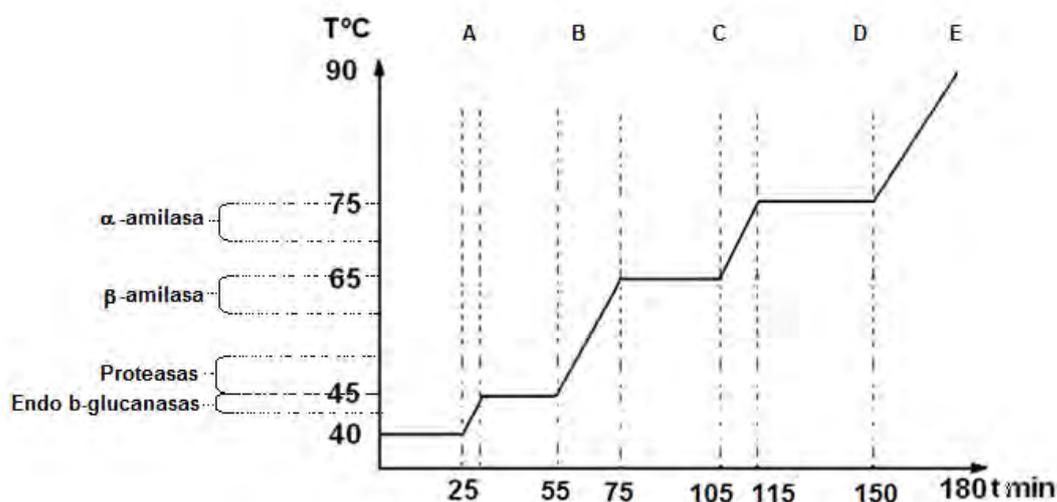


Figura 15. Tiempo (min) y temperatura (°C) de la hidrólisis enzimática del almidón, las condiciones de hidrólisis para cada enzima presente en la sacarificación, corresponden a las de una Curva de sacarificación compleja.

A=2°Bx, B=3°Bx, C=4°BX, D= 7°Bx, E=8.5°Bx

7.3. FERMENTACION Y ANALISIS DEL MOSTO

Una vez obtenidos los parámetros de sacarificación se procedió a la elaboración del mosto dulce.

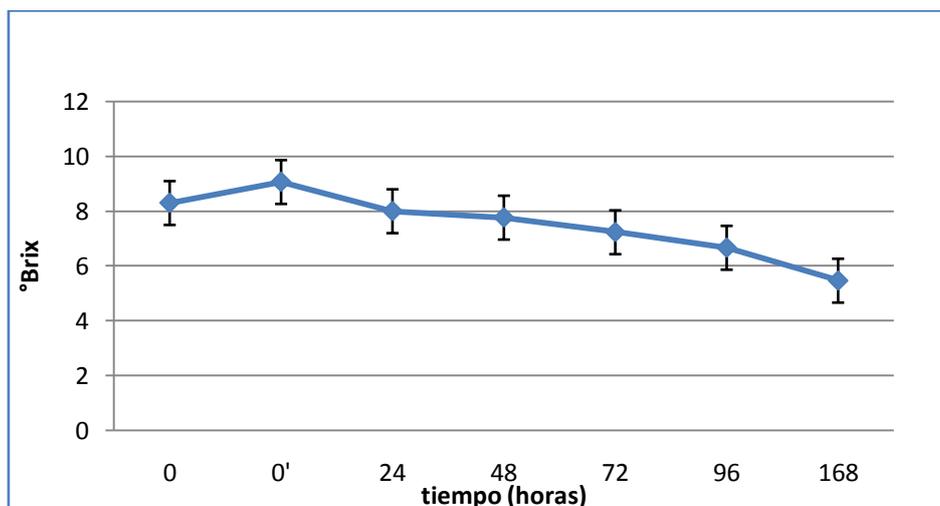
Cada uno de los mostos fue elaborado agregando 200 a una olla con 1litro de agua a 40°C y después se siguió calentando en una parrilla siguiendo los tiempos y temperaturas de macerado descritos en la metodología 6.4.

Puesto que el lúpulo provee de compuestos aromáticos al mosto, con el fin de tener menos interferencia durante la medición de compuestos congénicos, se decidió no agregar lúpulo y únicamente se elevó la temperatura del mosto a 90°C para inactivar las enzimas, 3 mostos fueron fermentados a 13-14°C y 3 más fueron fermentados a 19-20°C en fermentadores de vidrio pyrex con capacidad de 1.5L con tapa hermética de goma y las respectivas cánulas para el muestreo.

Se hizo un seguimiento durante 5 días cada 24 horas, midiendo sólidos solubles, pH y azúcares reductores de cada una de las fermentaciones.

7.3.1. CANTIDAD DE SÓLIDOS SOLUBLES, A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN, DETERMINADOS POR MEDIO DE UN REFRACTOMETRO DE CAMPO

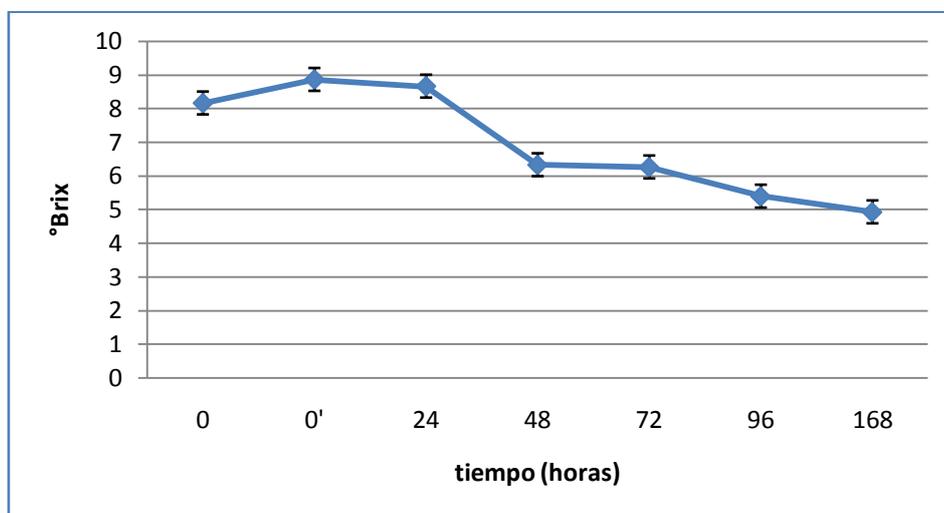
La determinación de sólidos solubles nos permitió dar un seguimiento de las fermentaciones^(5, 11) ya que se monitoreó el descenso de la concentración de los sólidos solubles durante su transcurso, las fermentaciones comenzaron a una concentración de 8.5°Bx al tiempo cero, pero hubo resultados distintos para cada fermentación a distinta temperatura, cuando la fermentación a 13-14°C fue detenida al haber transcurrido 168 horas (grafica 1a), el mosto tuvo una concentración final de 5.3°Bx, lo que significa que únicamente se consumió un 40% de los sólidos solubles totales, a esta temperatura se puede apreciar un descenso lento de los °Bx, ya que de las 48 a las 72 horas se tuvo un descenso de 1°Bx, lo mismo en el intervalo de 72 a 96, en el intervalo más largo que fue de las 96 a las 168 horas solo descendió 1°Bx es decir que la mayor actividad de la levadura fue entre las 24 y las 96 horas.



Grafica 1a. Porcentaje de sólidos solubles en grados Brix, a lo largo de la fermentación a una temperatura de 13-14°C, de un mosto de cebada Gabyota del estado de Hidalgo

En la fermentación a 19-20°C (grafica 1b) se pueden apreciar dos diferencias muy marcadas ya que a diferencia de la fermentación a baja temperatura, en esta a temperatura muy cercana a la ambiente, el descenso de la concentración en °Bx es mayor en las primeras 24 horas ya que desciende 2°Bx y la otra diferencia es que la fermentación fue más corta, es decir, en el último

intervalo de tiempo de las 96 a las 168 prácticamente no hay descenso ya que en 3 días únicamente se tuvo un descenso de 0.5°Bx.



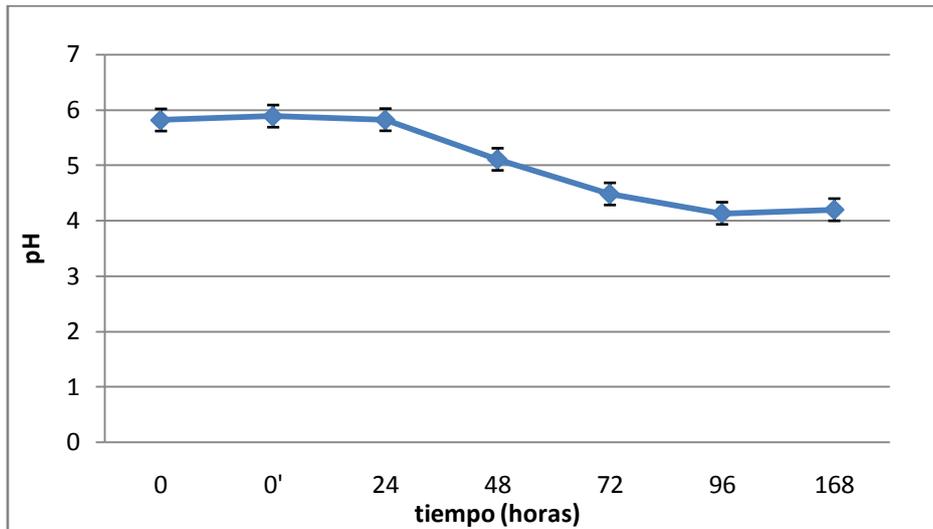
Grafica 1b. Porcentaje de sólidos solubles en grados Brix, a lo largo de la fermentación a una temperatura de 19-20°C, de un mosto de cebada Gabyota del estado de Hidalgo

Ambas fermentaciones comienzan a la misma concentración de 8.5°Bx y ambas terminan una concentración alrededor de 5°Bx, la fermentación a 19°C se ve favorecida por la temperatura, la levadura trabaja a un ritmo más alto durante las primeras 24 horas en esta fermentación

7.3.2. SEGUIMIENTO DE LA DISMINUCIÓN DE pH A LO LARGO DE LA FERMENTACION.

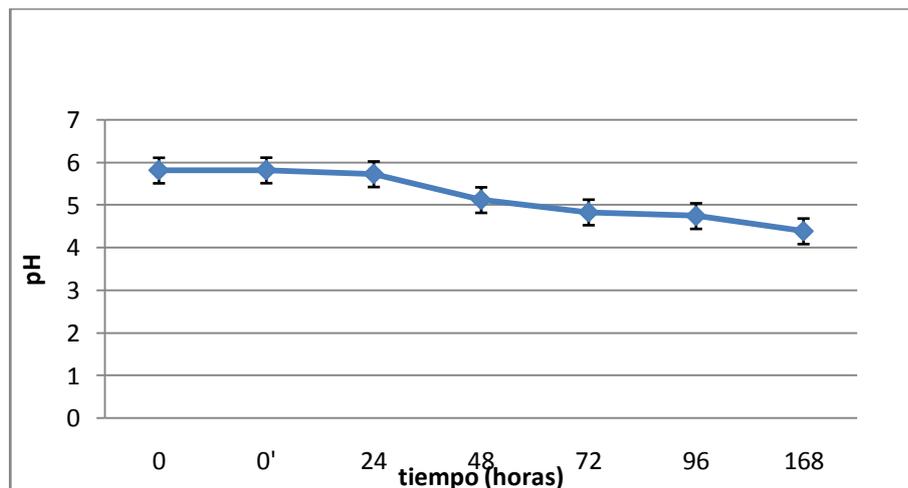
El pH es un parámetro importante que se midió durante las fermentaciones a distintas temperaturas, brinda información acerca del avance de la fermentación, descensos muy drásticos sugieren contaminación microbiana, cambios muy tenues sugieren que la fermentación es deficiente (1,11, 22) en las fermentaciones realizadas existieron diferencias, en la fermentación a 13-14°C (grafica 2a) durante las primeras 24 horas no hay cambio, el pH se mantiene en 5.8, entre las 24 y las 72 horas se apreció el mayor descenso de pH y de las 72 a las 168 horas el pH se mantuvo constante y no descendió mas, la fermentación a 19-20°C (grafica 2b) parecería que tuvo un comportamiento similar pero no fue así, únicamente en las primeras 24 hora hubo un

comportamiento similar, de las 24 a las 72 horas hubo un descenso pH pero fue menor que en la fermentación a 13-14°C.



Gráfica 2a. pH del mosto, fermentado a una temperatura de 13-14°C, de cebada Gabyota del estado de Hidalgo
El pH se determino a cada muestra por triplicado con un pH-metro a temperatura ambiente.

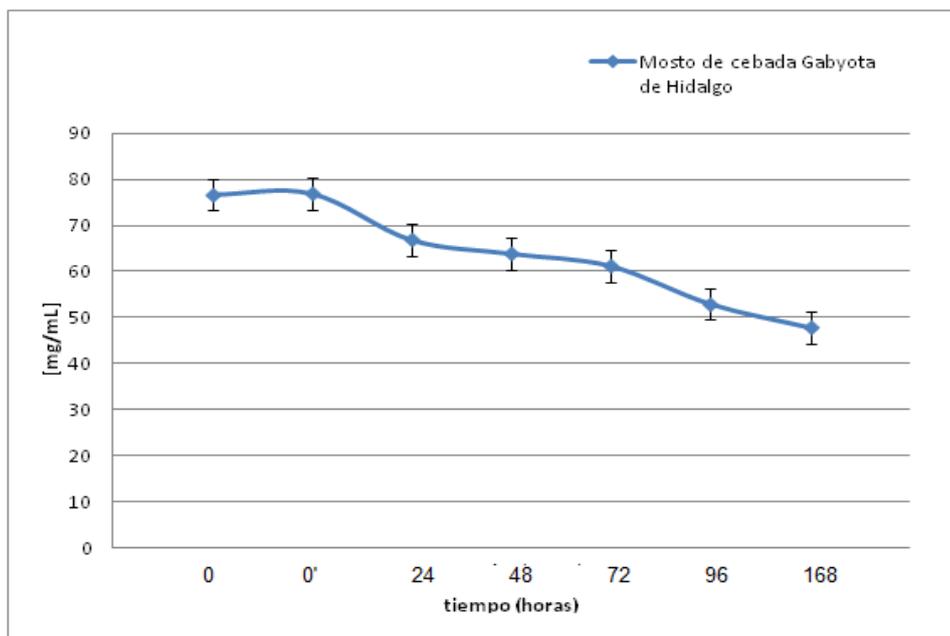
La diferencia entre las fermentaciones es que en la fermentación a temperatura cercana a la ambiente el pH sigue disminuyendo, en ningún momento permaneció constante, lo que sugiere una mayor susceptibilidad a contaminación microbiana o que la levadura sigue fermentando, lo que se refuta ya que la cantidad de sólidos solubles al final de la fermentación a 19-20°C no sigue descendiendo.



Gráfica 2b. pH del mosto, fermentado a una temperatura de 19-20°C, de cebada Gabyota del estado de Hidalgo
El pH se determino a cada muestra por triplicado con un pH-metro a temperatura ambiente.

7.3.3. CUANTIFICACION DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL METODO DNS

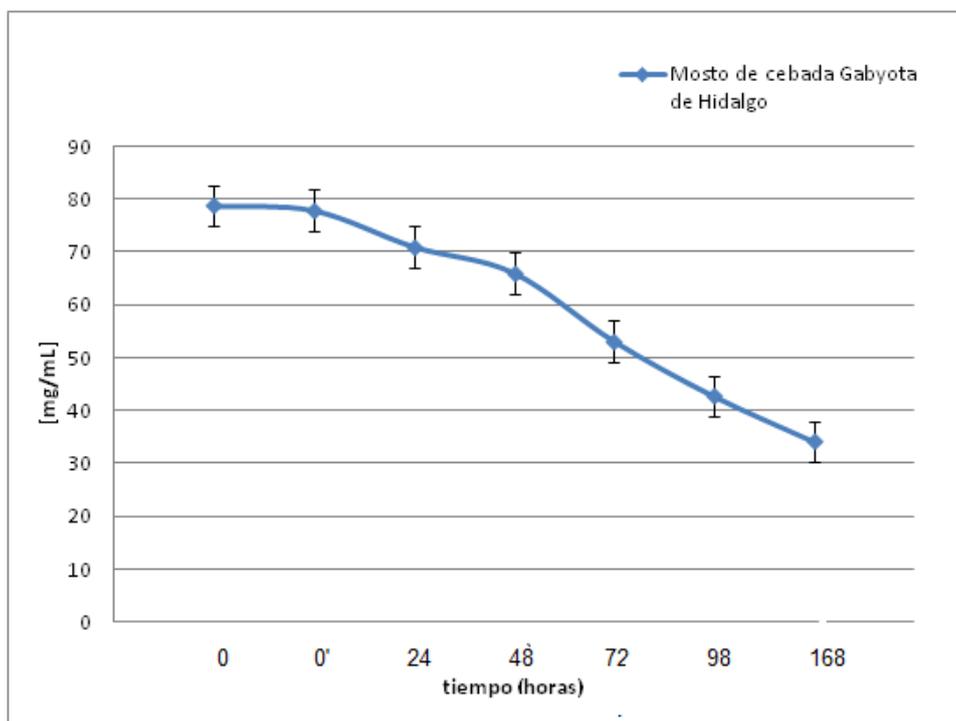
Durante el seguimiento de las fermentaciones cuantificando azúcares reductores se apreciaron resultados interesantes, la cantidad de azúcares reductores en los mostos al inicio y al final de las fermentaciones fue muy reducido, se esperaba una concentración de alrededor de 800mg/mL ya que un mosto de malta comercial tiene cerca de 12°Bx y una concentración de azúcares reductores de 1.4g/mL lo que se refleja en cantidades de etanol alrededor de los 2.8% V/V (11, 15, 22), en la fermentación a 13-14°C (grafica 3a) se apreció una concentración inicial de 75mg/mL y una disminución de la concentración de azúcares reductores de 75mg/mL a 53mg/mL de las 24 y las 96 horas y de las 96 a las 168 horas únicamente disminuyó 4mg/ml quedando una concentración final de 48mg/mL.



Grafica 3a. Concentración de azúcares reductores en el mosto de malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo, durante una fermentación a 13-14°C. La concentración de azúcares reductores se determinó, en mg/mL con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

En la fermentación a 19-20°C (grafica 3b) se puede apreciar de nuevo que la temperatura favoreció el descenso de la concentración de azúcares reductores, en esta fermentación el descenso fue más rápido ya que del tiempo cero hasta las 98 horas hubo un descenso de 44mg/mL y de las 96 a las 168 horas el

descenso de la concentración fue mayor que en la fermentación a 13-14°C, ya que fue de 8mg/ml



Grafica 3b. Concentración de azúcares reductores en el mosto de malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo, durante una fermentación a 19-20°C. La concentración de azúcares reductores se determinó, en mg/mL con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Comparando los valores obtenidos en la determinación de azúcares reductores con la cantidad de sólidos solubles se puede apreciar que únicamente el 1% aproximadamente de los sólidos solubles son azúcares reductores, esto quiere decir que durante la sacarificación no se hidrolizó por completo el almidón, lo que no permitió que las enzimas lo hidrolizaran y se liberaran azúcares fermentables.

El hecho de haber tenido mostos con una cantidad limitada de azúcares reductores no significa que las enzimas no estén actuando durante el macerado, el resultado recae principalmente en la dureza del endospermo y el tipo de almidón disponible en el grano, las maltas comerciales normalmente tienen un almidón con menor contenido de amilopectina (11).

En la industria cervecera se utilizan mezclas de maltas especiales, las mezclas más comunes son para dar atributos sensoriales como lo es el color y el aroma, también existen mezclas de maltas o adjuntos que sirven para elevar la viscosidad (cuerpo) de la cerveza, esto es porque tienen una mayor cantidad de almidón ramificado que durante la hidrólisis enzimática da como productos dextrinas límite que aumentan la viscosidad.

7.3.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CONGENÉRICOS

La determinación de compuestos congenéricos se llevó a cabo por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases^(19,20), los resultados para el experimento a una temperatura controlada de fermentación de 13-14°C y el experimento a una temperatura controlada de fermentación de 19-20°C se encuentran en las tablas 6a y 6b, en ambos experimentos se utilizó el mosto dulce recién elaborado como referencia.

Durante el experimento, el muestreo se hizo cada 24 horas durante 5 días y la última muestra se recolectó 3 días después.

En la tabla 6a se encuentran los compuestos presentes en el mosto fermentado a 13-14°C, el mosto de referencia tiene lactato de etilo, diacetilo y 2 fenil etanol en concentraciones mínimas, únicamente fueron detectadas con el cromatógrafo de gases pero no se cuantificaron ya que la concentración estaba por debajo de las concentraciones de la curva patrón. De cada uno de estos compuestos, el ácido acético si se cuantificó, se encontró en una concentración de 39.17mg/L.

Durante la fermentación y de acuerdo a los resultados, después de que se agregó el inóculo al tiempo 0' se confirmó la presencia etanol, pero no pudo ser cuantificada, 24 horas después aparecieron compuestos en mínimas cantidades, que de acuerdo a los tiempos de retención obtenidos de la mezcla de estándares de compuestos congenéricos, fueron 1-propanol (34ppm), alcohol isoamílico (87ppm), 2-fenil etanol (14.05ppm); el isobutanol y el lactato de etilo fueron identificados pero no cuantificados, no existió mucha diferencia entre el número y la cantidad de cada compuesto cuando transcurrieron 72 horas y cuando transcurrieron 168 horas.

Tabla 6a Concentración de congénicos en mosto fermentado a 13-14°C en ppm.

	REFERENCIA	t0°C1	t3C1	t5C1
COMPUESTO	CONC. (ppm)	CONC. (ppm)	CONC. (ppm)	CONC. (ppm)
ACETALDEHIDO	X	X	X	X
ACETATO DE ETILO	X	X	X	X
METANOL	X	X	X	X
ETANOL	X	+	162.47	290.95
2 BUTANOL	X	+	X	X
1 PROPANOL	X	X	13.51	34.55
ISOBUTANOL	X	X	X	+
ALCOHOL ISOAMILICO	X	+	84.95	87.66
ALCOHOL AMILICO	X	+	X	X
LACTATO DE ETILO	+	17.69	+	+
ACIDO ACETICO	39.17	X	X	X
FURFURAL	X	+	X	X
DIACETILO	+	+	X	X
2 FENIL ETANOL	+	+	16.49	14.05

X=Compuestos congénicos inexistentes en la muestra

+ =Compuestos congénicos no cuantificables presentes en la muestra.

t0°C1 corresponde a las muestras después de inocular, t3C1 es la muestra tomada a las 72 horas de iniciada la fermentación a 13-14°C, t5C1 es la muestra tomada a las 168 horas de iniciada la fermentación a 13-14°C

En la fermentación que se hizo a 19-20°C (tabla 6b) se obtuvieron resultados interesantes ya que tal como se esperaba ⁽¹¹⁾, fermentar el mosto una temperatura mas elevada provocó una mayor producción de compuestos congénicos, en la Tabla 6b se aprecia un mayor numero de compuestos congénicos y también un mayor numero de compuestos que son cuantificables, así como la producción de etanol que se ve favorecida a una temperatura más alta a pesar de que la ultima concentración registrada es a las 96 horas, alcanza casi la misma concentración que se logra en una fermentación a baja temperatura a las 168 horas.

Tabla 6b Concentración de congénicos en mosto fermentado a 19-20°C en ppm.

	REFERENCIA	t0'C2	t3C2	t4C2
COMPUESTO	CONC. (ppm)	CONC. (ppm)	CONC. (ppm)	CONC. (ppm)
ACETALDEHIDO	X	X	X	+
ACETATO DE ETILO	X	X	+	+
METANOL	X	X	X	X
ETANOL	X	332.36	757.67	806.88
2 BUTANOL	X	+	+	+
1 PROPANOL	X	X	28.98	4.28
ISOBUTANOL	X	+	3.90	12.04
ALCOHOL ISOAMILICO	X	+	112.76	117.62
ALCOHOL AMILICO	X	+	X	X
LACTATO DE ETILO	+	+	+	+
ACIDO ACETICO	39.17	6.01	94.50	214
FURFURAL	X	1368.58	+	X
DIACETILO	+	+	+	+
2 FENIL ETANOL	+	+	12.73	0.9

X=Compuestos congénicos inexistentes en la muestra

+ =Compuestos congénicos presentes, en la muestra, no cuantificables.

t0'C1 corresponden a las muestras tomadas del mosto después de inocular, t3C1 es la muestra tomada a las 72 horas de iniciada la fermentación a 19-20°C, t4C1 es la muestra tomada a las 168 horas de iniciada la fermentación a 19-20°C

La concentración de sólidos solubles en el mosto fue de 8°Bx y al final de la fermentación a 13-14° y 19-20°C fue de 4.5 y 3.5°Bx respectivamente con lo que se esperaría una concentración de etanol de 0.28 y 0.95% v/v. (29)

La concentración real de etanol que se determinó con el cromatógrafo fue de 0.029%v/v para la fermentación a 13°C y 0.08%v/v para la fermentación a 19°C es decir 10 veces menos de lo esperado, esto se puede explicar con la concentración de azúcares reductores que fue de 35mg/ml.

En la fermentación alcohólica, por cada mol de glucosa se obtienen 2 moles de etanol, la concentración teórica sería de 0.07% v/v de etanol aproximadamente, por lo tanto únicamente el 30% de los azúcares reductores fueron azúcares fermentables en el caso de la fermentación a 13°C y en el caso de la fermentación a 20°C la concentración de etanol es muy parecida a la que se esperaría.

La producción de compuestos congénicos en la fermentación a 13°C, comparada con los resultados de la fermentación a 20°C es menor.

Se pudo apreciar, comparando los resultados de las tablas 8a y 8b, que como se esperaba, en la fermentación a 19-20°C existe un mayor número de compuestos congénicos además de una producción más rápida de estos, ya que la mayor producción de compuestos se dio a las 98 horas de la fermentación y la mayor concentración y el mayor número de congénicos en la fermentación a 13-14°C fue a las 168 horas.

A pesar de que la producción de etanol fue mínima, se puede apreciar en los resultados, que la producción de compuestos congénicos a distintas temperaturas también depende de la producción de etanol, la producción de alcoholes superiores depende estrechamente de los aminoácidos presentes, ya que los aminoácidos son desaminados, lo cual produce α -cetoácidos, mismos que son descarboxilados y convertidos en n-aldehídos que al reducirse producen alcoholes superiores como el propanol, el alcohol isoamílico y el 2-fenil etanol, cuando aumenta la producción de etanol también aumenta la concentración de piruvato y el piruvato se descarboxila para dar como producto aldehídos que forman más alcoholes superiores y acetaldehído que forman etanol.

Con la presencia de diacetilo en las muestras de la fermentación a 19-20°C se corrobora que la temperatura durante la fermentación cambia el perfil de congénicos, ya que en la fermentación a 13-14°C el diacetilo que se encontró en el mosto sin inocular no aparece al final de la fermentación, lo que significa que la levadura posiblemente redujo al diacetilo en 2-3 butanodiol el cual no imparte aroma.

Esto no ocurrió en la fermentación a 19-20°C y el diacetilo se mantuvo hasta el final de la fermentación, lo que quiere decir que no pudo ser reducido por la levadura en este intervalo de temperatura.

Con la baja temperatura se controló la proliferación bacteriana contaminante, el descenso de pH tiene que ver con la temperatura, si la temperatura aumenta, aumenta la actividad microbiana, el pH de 4.5 controla la contaminación bacteriana (5, 29). Con la concentración de etanol pasa lo mismo, está indirectamente ligada a la temperatura ya que la levadura fermenta en un intervalo óptimo de temperatura, conforme la temperatura de la fermentación se acerca a la temperatura ambiente se eleva la actividad celular y existe una

mayor producción de etanol, aumentado la susceptibilidad de contaminación por bacterias lácticas. (29).

La fermentación a 19°C es mejor para producir etanol pero el producto final claramente tiene un perfil de congenéricos distinto y por lo tanto aromas y gustos distintos, la preparación fermentada a 19°C tiene un ligero gusto ácido impartido por el ácido acético que se produjo en la fermentación así como un olor afrutado y herbal, impartido por el 2-fenil etanol, a pesar de carecer de lúpulo.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó que la cebada Gabyota de la región de Tecocomulco en el estado de Hidalgo es apta para producir malta.
- Las mejores condiciones para el malteo de una cebada Gabyota del estado de Hidalgo son a una temperatura de 15°C y los tiempos respectivos para cada etapa del malteo (remojo, germinación y secado) son 48, 72 y 24 horas.
- Se determinó que la concentración de los compuestos congenéricos presentes en un mosto de malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo fermentado a 13-14°C, están en menor proporción que en un mosto de la misma malta fermentado a 19-20°C
- Se determinó que el número de compuestos congenéricos presentes en un mosto de malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo fermentado a 13-14°C, es menor que en un mosto de la misma malta fermentado a 19-20°C.
- Se determinó que la concentración de etanol al final de la fermentación a 19-20°C es mayor en comparación a la encontrada en el mosto fermentado a 13-14°C
- La cantidad de etanol al final de la fermentación en ambos mostos se encontró por debajo de la concentración esperada debido a que en etapas previas a la fermentación el tiempo de sacarificación fue insuficiente para la malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo.
- Comparando los resultados obtenidos para cada fermentación a diferentes temperaturas, se determinó que el mejor perfil de congenéricos se desarrolla en fermentaciones a una temperatura de entre 13 y 14°C ya que a esta temperatura no se encuentran congenéricos que se consideran defecto en la producción de cerveza.

7.3 PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y la discusión de los resultados presentados en esta tesis de licenciatura, las perspectivas a futuro se orientan a distintas direcciones.

En primer plano, estarían los trabajos destinados a la investigación completa y al análisis fisicoquímico completo del grano de cebada Gabyota del estado de Hidalgo, concretamente, investigar y determinar el tipo y estructura de los hidratos de carbono presentes en el grano de cebada y cómo cambian estas estructuras en el proceso de malteo y determinar estas mismas estructuras en la malta.

Al tener esta información sobre los cambios en la estructura del almidón se pueden determinar los tiempos y temperaturas de sacarificación de un mosto elaborado con esta malta.

Disminuir el tiempo de sacarificación y aumentar el rendimiento del extracto de la malta sería una optimización en el proceso de elaboración de cerveza con una malta de cebada no destinada a malteo.

Simultáneamente a la investigación de los hidratos de carbono, elaborar una cerveza con malta de cebada Gabyota del estado de Hidalgo agregando un adjunto (un almidón conocido), ya que el poder diastásico es alto, es decir la actividad enzimática y la capacidad de hidrolizar el almidón en esta malta es elevada.

Se pretende aumentar la cantidad de azúcares fermentables y por lo tanto la concentración de etanol en la cerveza.

En segundo plano sería interesante hacer un perfil más completo de compuestos congenéricos, determinar el tipo de aminoácidos presentes en el mosto y de esta manera predecir la producción de algunos alcoholes superiores, cuantificar los compuestos congenéricos que fueron identificados pero no pudieron ser cuantificados, de esta manera se podría ver la relación de la producción de etanol con la producción de otros compuestos congenéricos poder hacer un balance de materia mas preciso.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. López Agustín, García Garibay Mariano, *Biología Alimentaria*, Limusa, México, 2002, 636 p.p.
2. Figueroa; C. J.D. 1985 "Métodos para evaluar la calidad maltera en cebada" INIA. Didáctico No. 17 México, D.F.
3. Hernández Alicia, *Microbiología Industrial*, EUNED, 2003, 266 p.p.
4. <http://www.santomas.com.co/ExperienciaCervecera/Estad%C3%ADsticasCerveceras/Producci%C3%B3nMundialdeCervezasporpaíses/tabid/118/Default.aspx>
5. Hough, *Biología de la malta y la cerveza*, Acribia, España, 1990, 185 p.p.
6. *Financiera rural*, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, Julio 2009.
7. SAGARPA, <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Forrajes/Cebada.html>
8. <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Forrajes/Cebada.html>
9. Secretaría de Comercio y Fomento a la Industria, *Productos Alimenticios no industrializados para consumo humano – Cereal – Cebada Maltera – (Hordeum vulgare L. y Hordeum distichum L.) – Especificaciones y Métodos de prueba NMX-FF-043-SCFI-2003*, 2003, 36 p.p.
10. <http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/cebada/descripcion3.pdf>
11. Hornsey, *Elaboración de cerveza*, Acribia, España, 2003, p. 99-125, 229 p.p.
12. Santillán Valverde María del Carmen, García Garibay Mariano, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, ALAM (Asociación Latinoamericana de Microbiología), Vol. 40, Núm, 1-2, Enero-Junio, 1998, pág. 109-119, 136 p.p.
13. Kataoka Hiroyuki, et. al., *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*, *Journal of Chromatography*, www.elsevier.com, 2000, pág. 35-62.
14. Camacho, R. N., Díaz, G. M., Santillo, H. M., Velásquez M. O. *Productos de cereales y leguminosas «Manual de prácticas»*. Facultad de Química. UNAM. México, 2007. pp 1-12.
15. *European Brewery Convention, Analytica-EBC*, Fachverlag Hans Carl, Nürberg, Alemania, 1998.
16. Secretaría de Comercio y Fomento a la Industria, *Alimentos- Determinación de Humedad (Método rápido de la termobalanza) NMX-F-428-1982*, 1982, 4 p.p.
17. Departamento de alimentos, *Manual de Prácticas: Análisis de Alimentos*, Facultad de Química, UNAM, 2008, 70 p.p.
18. García I. Ana, *Fusel Alcohol Production in beer fermentation*, *Process Biochemistry*, 1994, pág. 303-309.
19. Peñalver Hernando Alejandra M., *Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis mediambiental*, Departamento de Química Analítica, Univerisat Rovira I Virgili, Tarragona, 2002, 322 p.p.
20. Pawliszyn Janusz, *Solid Phase Microextraction (SPME)*, *The Chemical Educator*, Vol. 2, Núm. 4, 1997, 7 p.p.

21. Gonçalves C., Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency, *Journal of Chromatography*, 2002, pág. 19-26.
22. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Vol. II. Edited by Kenneth Helrich. 1990: 777-781, 1095-1096.
23. AACC. Approved Methods of American Association of Cereal Chemists. 10th edition. Vol. II. Method 42-10, 2001.
24. Norma Mexicana NMX-FF-043-SCFI-2003. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano -cereal- cebada maltera (*Hordeum vulgare* L. y *Hordeum distichum* L.). Especificaciones y métodos de prueba. Publicada en el diario oficial el 18 de octubre del 2003.
25. Serna, S. S. R. Química e industrialización de los cereales. AGT Editor. México, D. F. 2001: pp. 3-23, 47-73 y 79-89.
26. Dendy, D. A. V. y Dobraszczyk, B. J. Cereales y productos derivados, Química y Tecnología. Ed. Acirbia. Zaragoza, España. 2004: pp. 403-421.
27. Callejo, G. M. J. Industrias de cereales y derivados. Ediciones Mundi - Prensa. Madrid. 2002: pp. 21-23, 25-36, 169-175.
28. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA), Revista claridades No.13, "La cebada en la agricultura nacional", 1994
29. Parés Ramón, Juárez Antonio, Bioquímica de los microorganismos, Editorial, Reverté, España, 1997, páginas 42-49, 380 p.p.
30. Lopez P. patricia, Guzmán O. Fabiola, Román G. alma d. "Evaluación de la calidad física de diferentes variedades de cebada (*Hordeum sativum* jess) cultivadas en los estados de Hidalgo y Tlaxcala", Centro de Investigaciones Químicas, Departamento de Química de Alimentos, México 2004, Revista Chilena de Nutrición Vol. 32, No3, Diciembre 2005

ANEXO 1 CROMATOGRÁMAS

En la figura 15 se muestran los tiempos de retención de los diferentes compuestos congénicos.

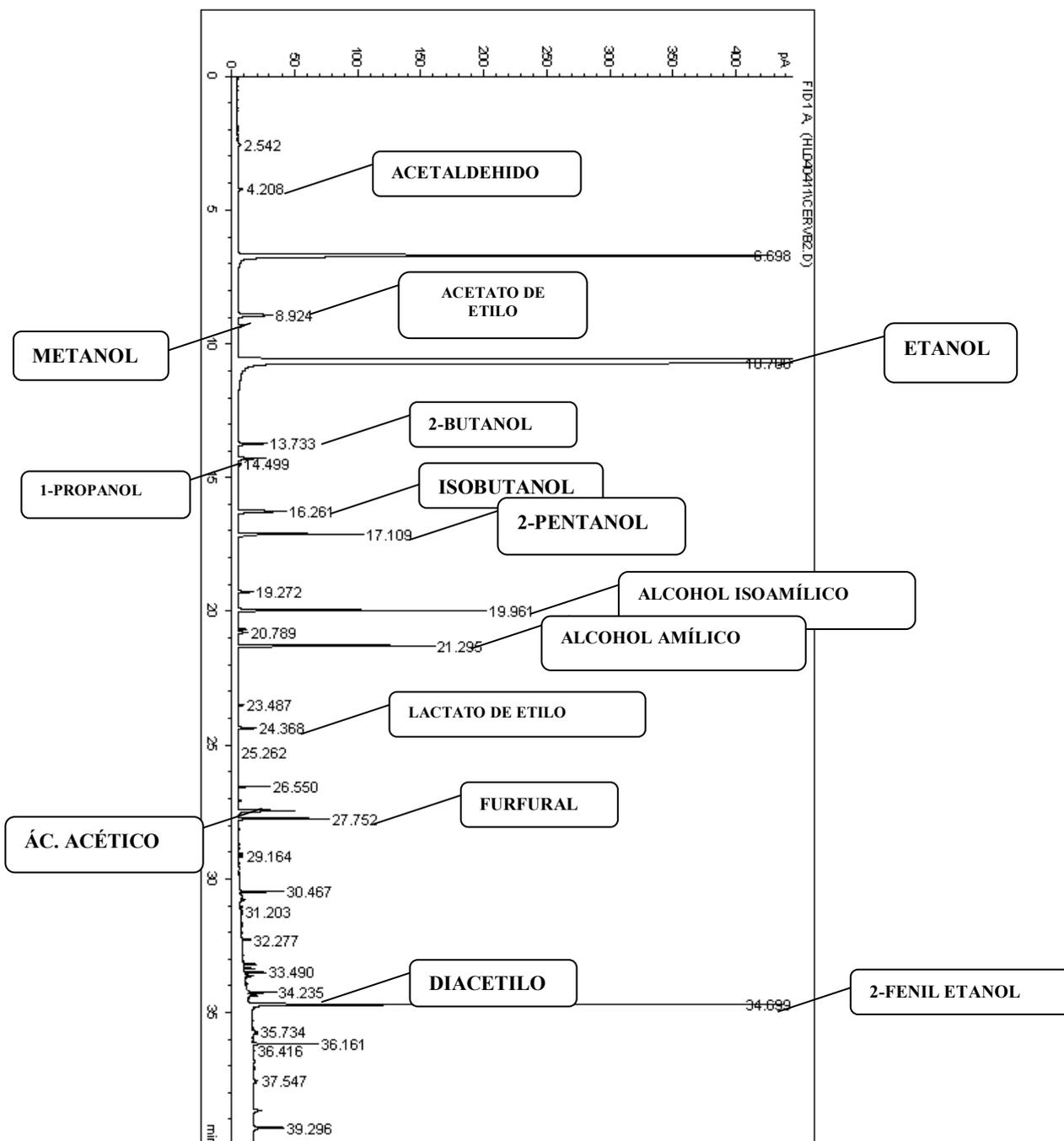


Figura 15. Áreas obtenidas a distintos tiempos de retención, de una mezcla de compuestos puros: acetaldehído, acetato de etilo, metanol, etanol, 2- butanol, 1- propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico, lactato de etilo, acido acético, furfural, diacetilo, 2 fenil etanol.

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la figura 16 se muestran los compuestos congénicos que aparecen en el mosto sin fermentar.

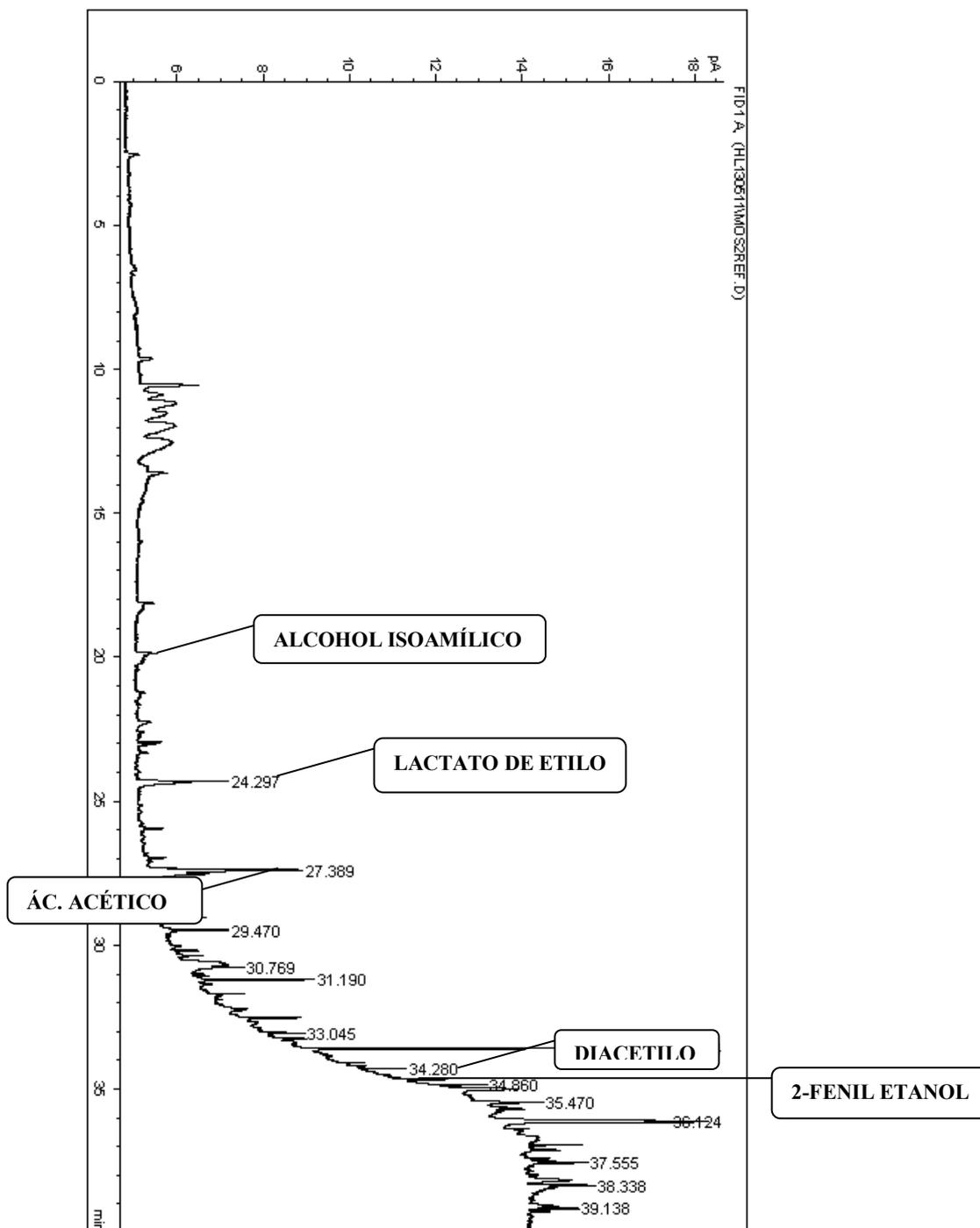


Figura 16. Áreas obtenidas en una muestra del mosto sin fermentar.

La inyección de las muestras se hizo manualmente, 5 repeticiones para cada concentración.

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min

En la figura 17 se muestran los tiempos de retención y áreas de los compuestos congénéricos que aparecen a las 168 horas de una fermentación a 13-14°C.

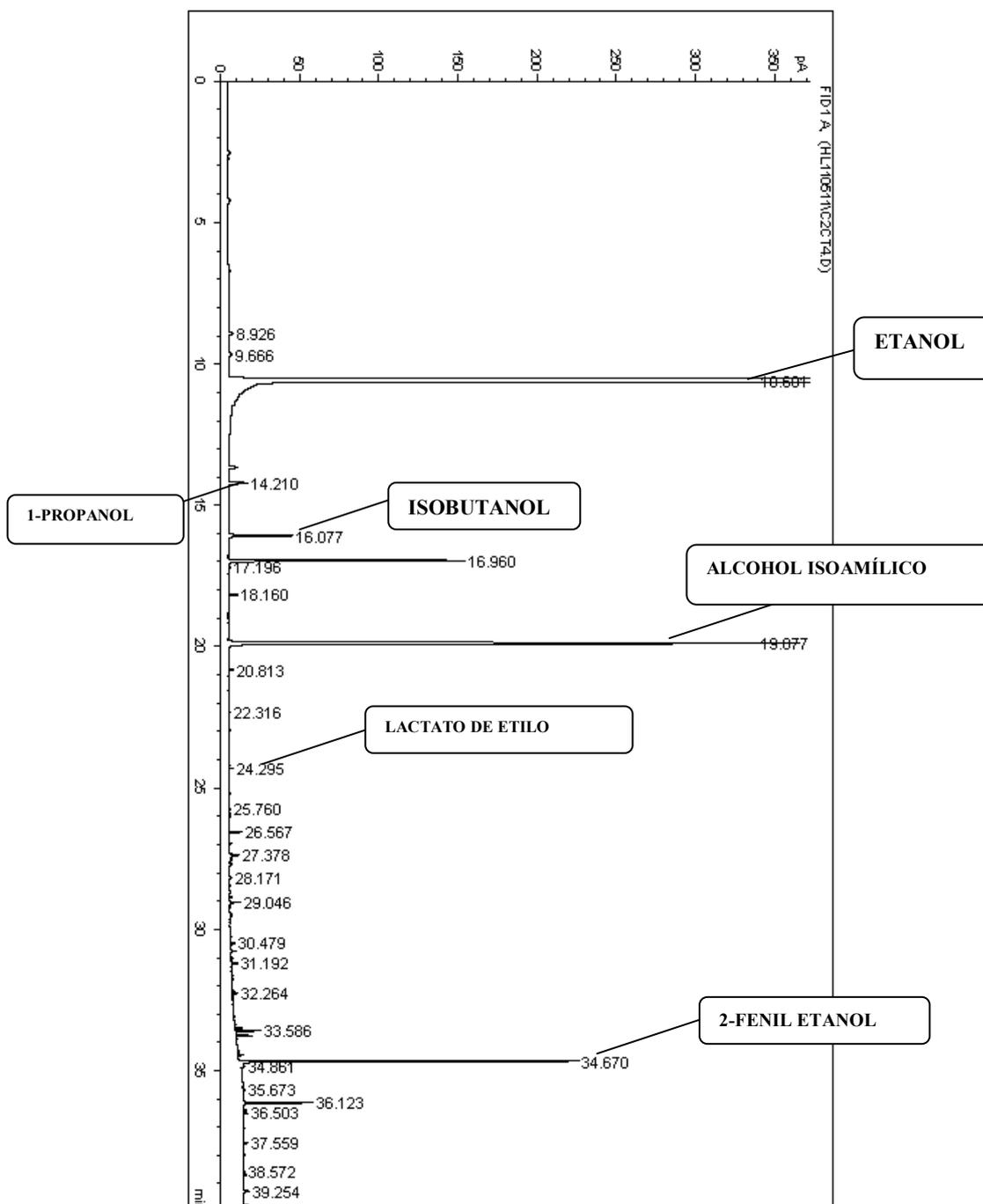


Figura 17. Áreas localizadas en un cromatograma que se obtuvo de una muestra tomada de la fermentación a 13-14°C 168 horas después de su inicio.

La inyección de las muestras se hizo manualmente

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min

En la figura 17 se muestran los tiempos de retención y áreas de los compuestos congénéricos que aparecen a las 168 horas de una fermentación a 19-20°C.

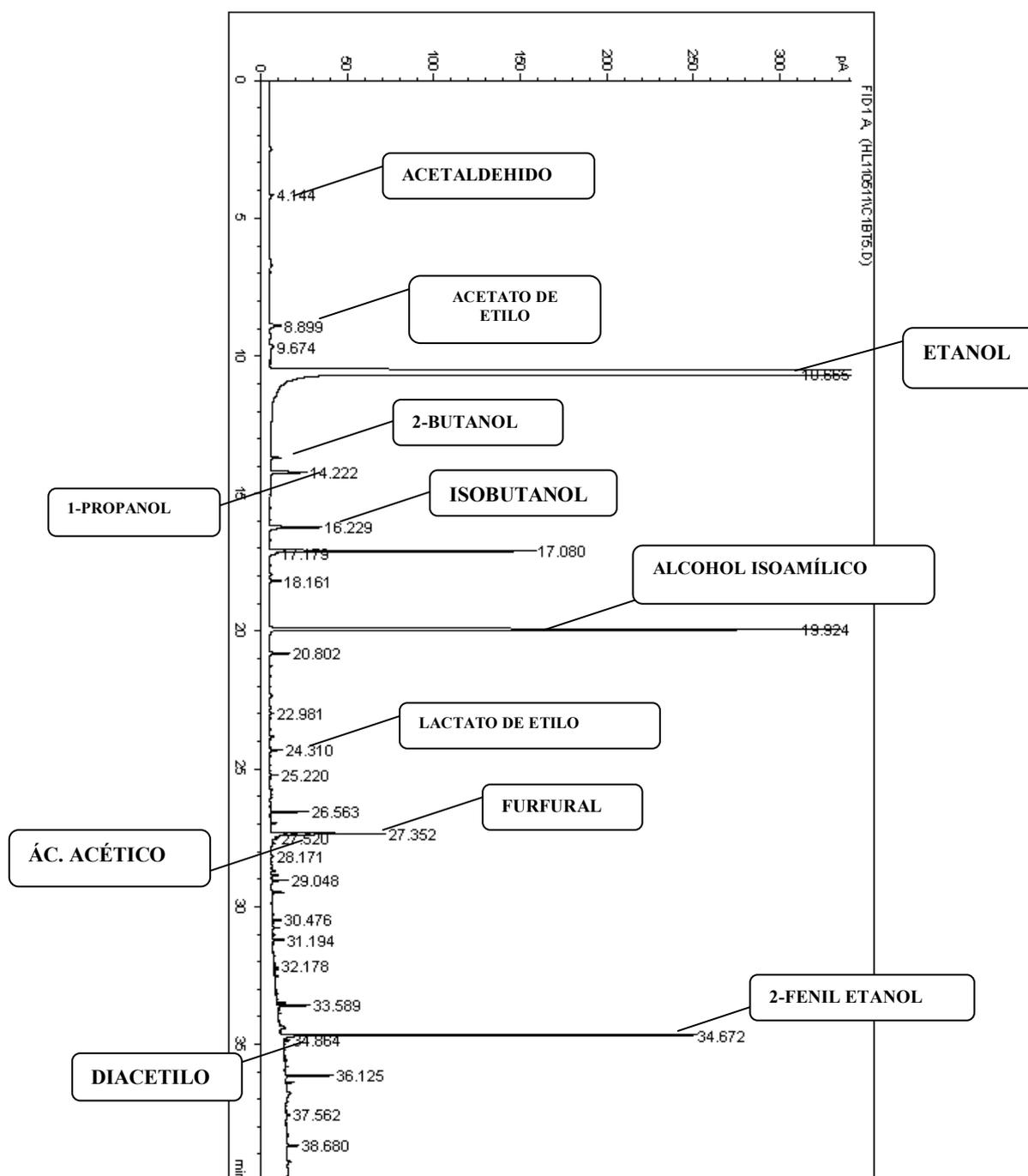


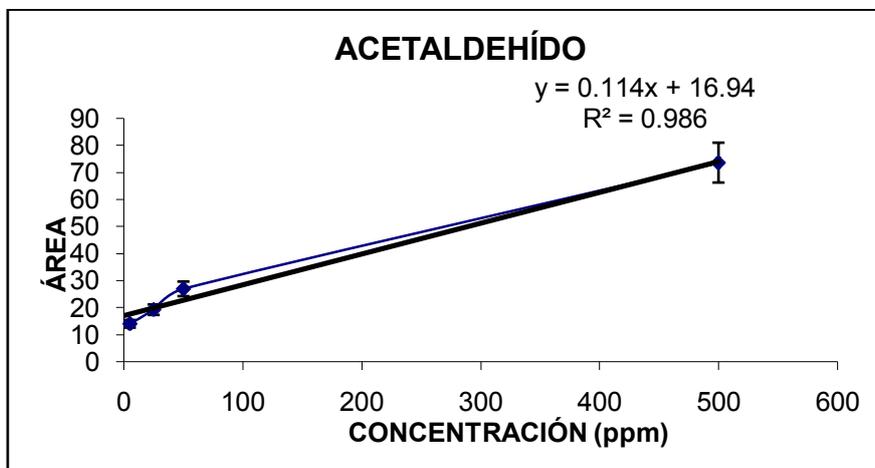
Figura 18. Áreas localizadas en un cromatograma que se obtuvo de una muestra tomada de la fermentación a 19-20°C 168 horas después de su inicio.

La inyección de las muestras se hizo manualmente

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min

ANEXO 2 CURVAS PATRÓN

En la grafica 4 se muestra la curva patrón de acetaldehído y la ecuación de la recta para este compuesto.

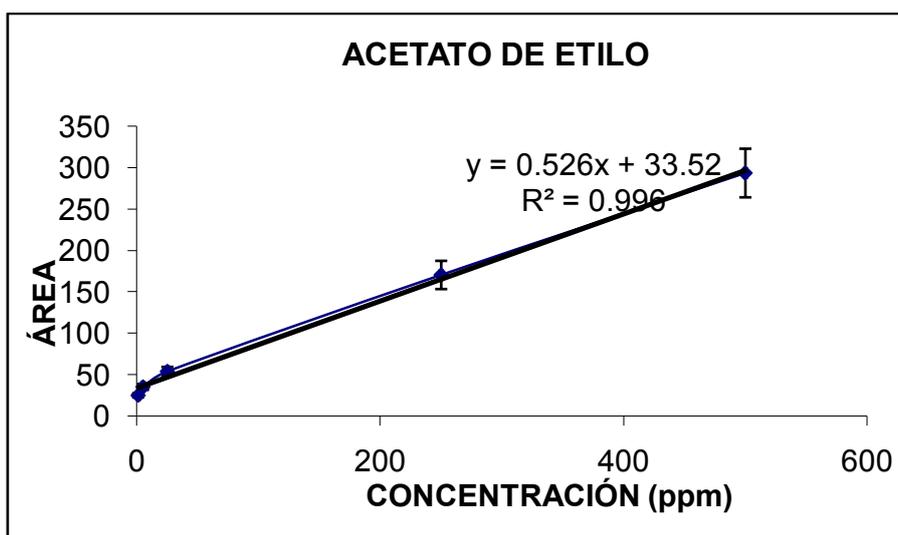


Gráfica 4 Curva patrón acetaldehído

La inyección de las muestras se hizo manualmente, se hicieron 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 5 se muestra la curva patrón de acetato de etilo y la ecuación de la recta para este compuesto.

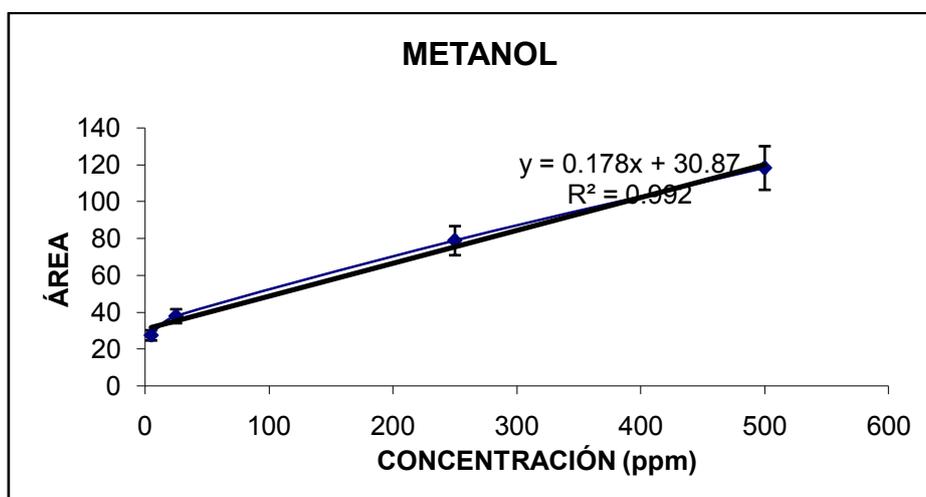


Gráfica 5 curva patrón acetato de etilo

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración.

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 6 se muestra la curva patrón de metanol y la ecuación de la recta para este compuesto.

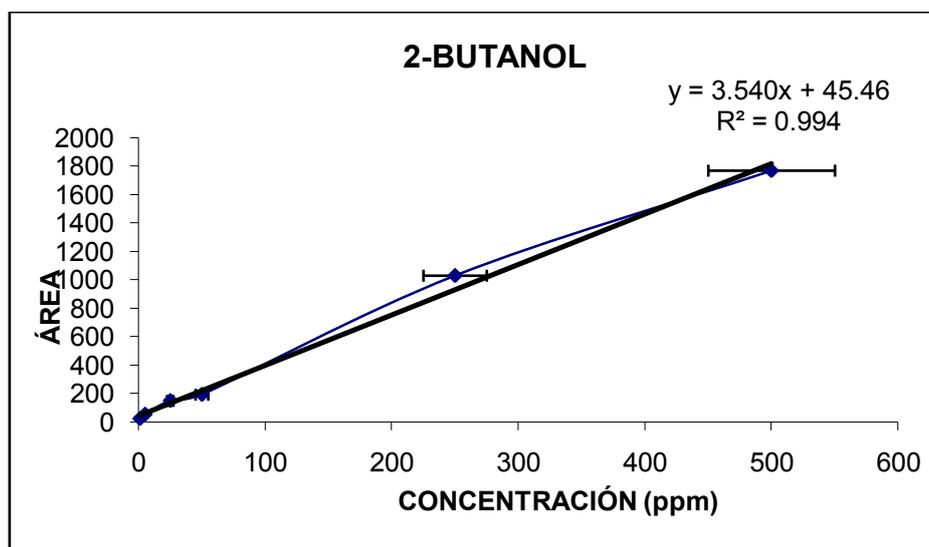


Gráfica 6 curva patrón de metanol

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 7 se muestra la curva patrón de 2-butanol y la ecuación de la recta para este compuesto.

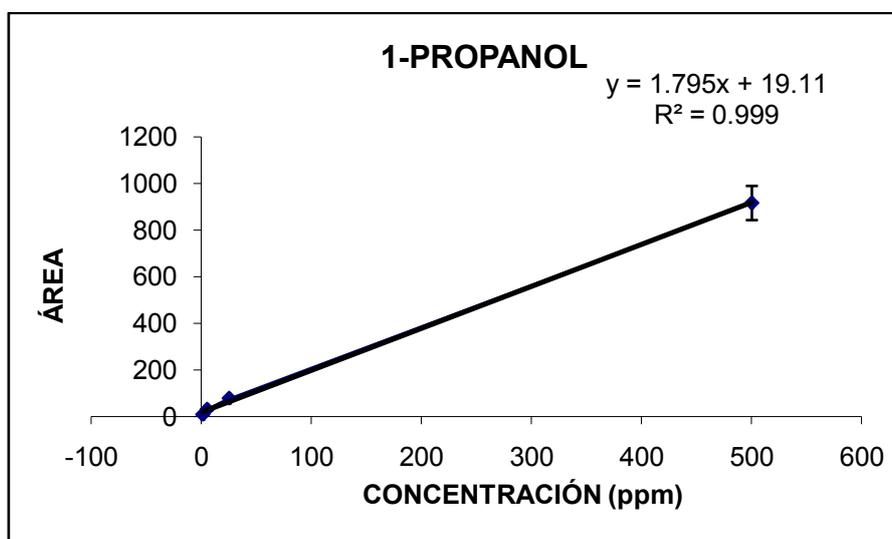


Gráfica 7 curva patrón de 2-butanol

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 8 se muestra la curva patrón de 1-propanol y la ecuación de la recta para este compuesto.

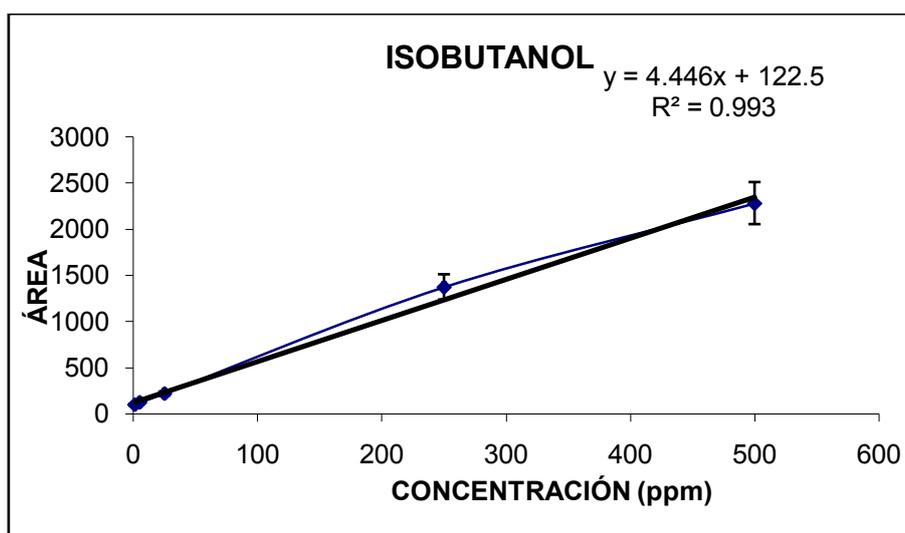


Grafica 8 curva patrón de 1-propanol

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 9 se muestra la curva patrón de isobutanol y la ecuación de la recta para este compuesto.

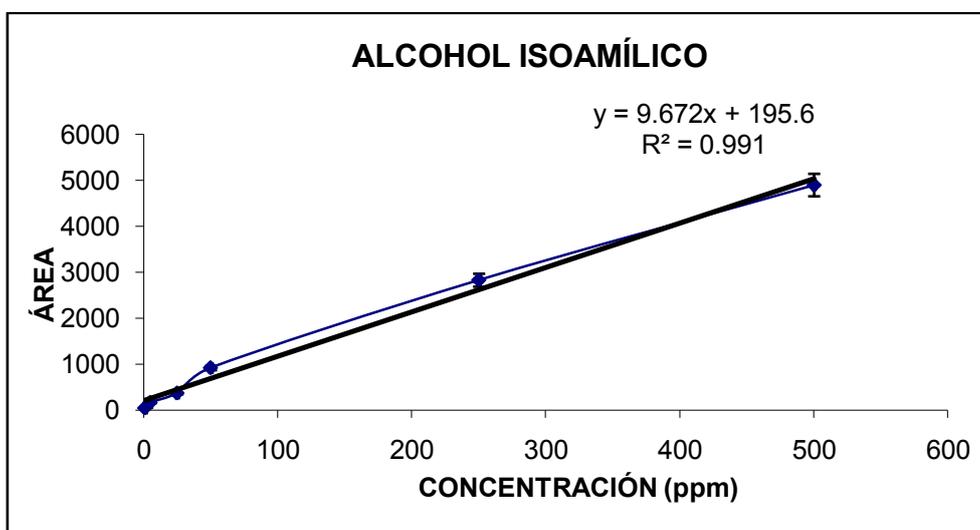


Grafica 9 curva patrón de isobutanol

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 10 se muestra la curva patrón de alcohol isoamílico y la ecuación de la recta para este compuesto.

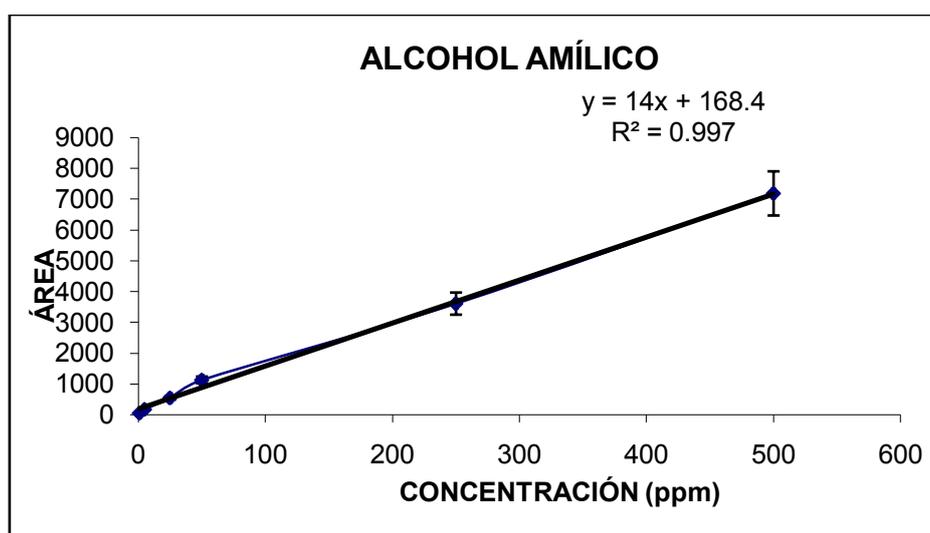


Gráfica 10 curva patrón de alcohol isoamílico

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 11 se muestra la curva patrón de alcohol amílico y la ecuación de la recta para este compuesto.

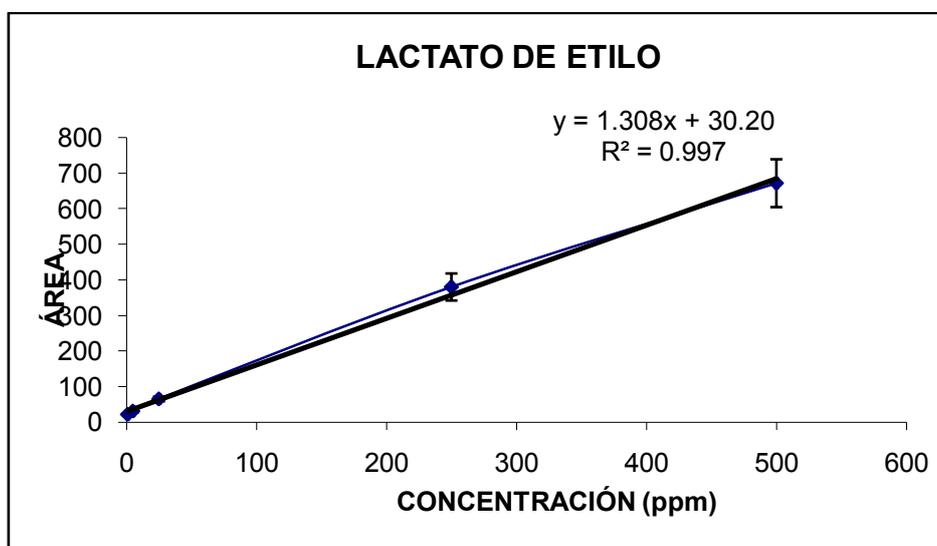


Gráfica 11 curva patrón de alcohol amílico

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 12 se muestra la curva patrón de lactato de etilo y la ecuación de la recta para este compuesto.

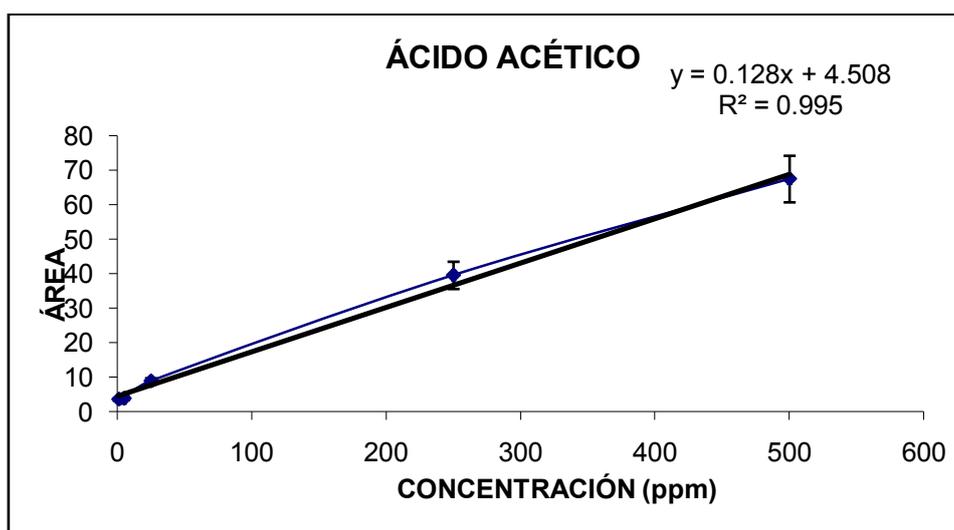


Gráfica 12 curva patrón de lactato de etilo

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 12 se muestra la curva patrón de ácido acético y la ecuación de la recta para este compuesto.

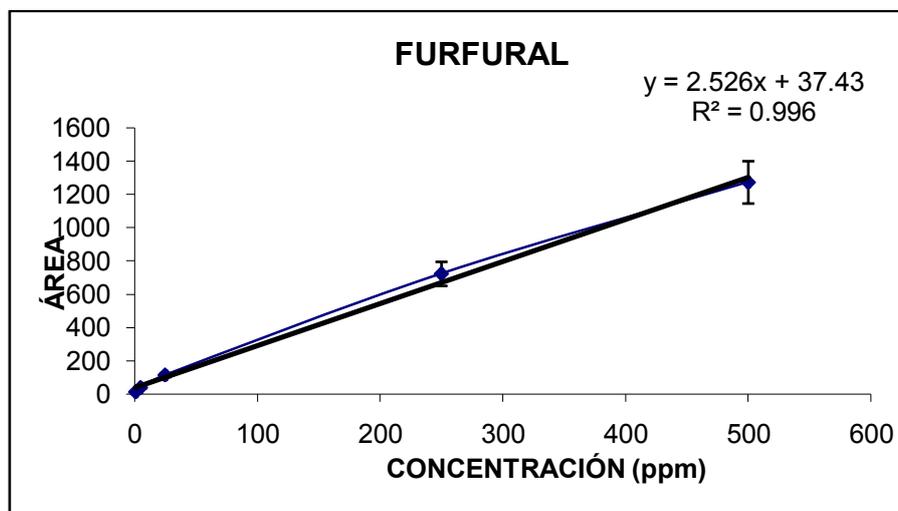


Gráfica 13 curva patrón de ácido acético

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 13 se muestra la curva patrón de furfural y la ecuación de la recta para este compuesto.

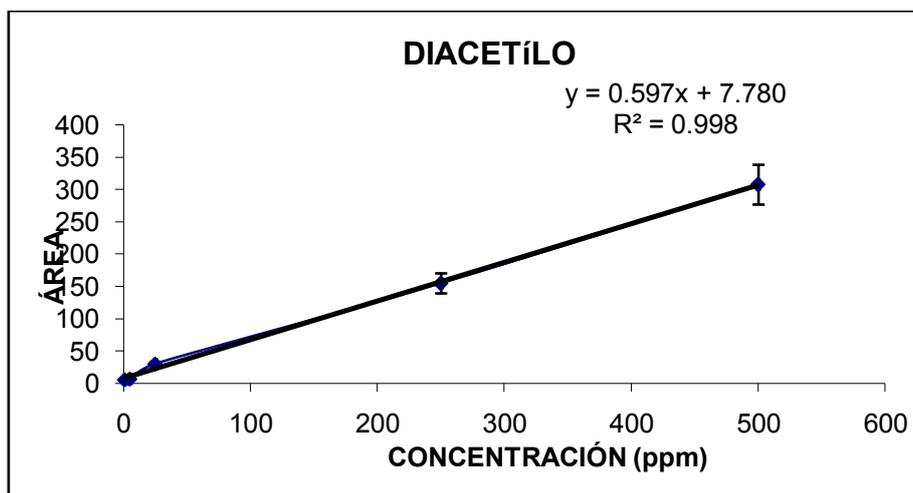


Gráfica 14 curva patrón de furfural

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 14 se muestra la curva patrón diacetilo y la ecuación de la recta para este compuesto.

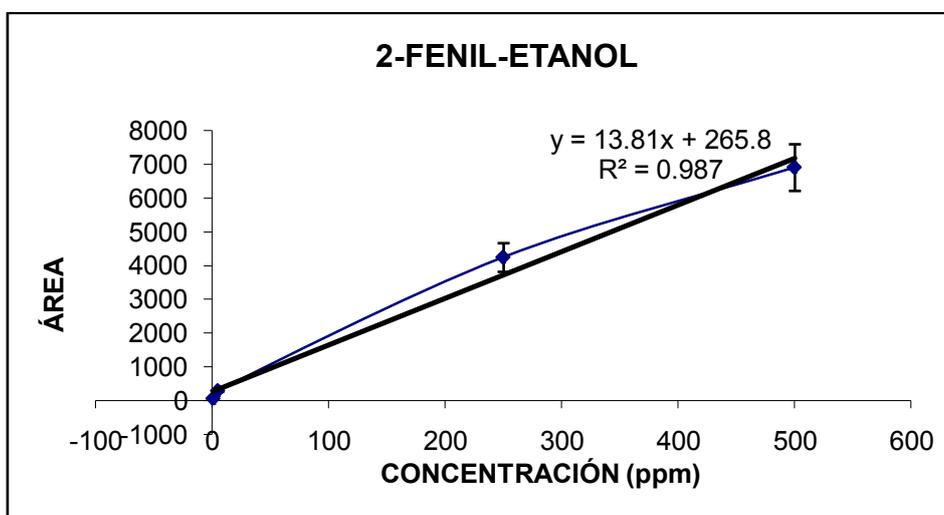


Gráfica 15 curva patrón de diacetilo

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 15 se muestra la curva patrón de 2-fenil etanol y la ecuación de la recta para este compuesto.

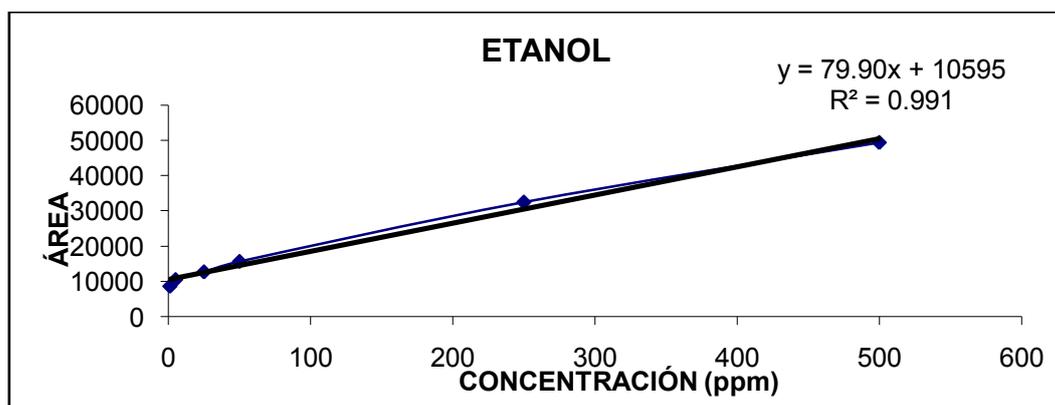


Gráfica 16 curva patrón de 2-fenil etanol

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 18 se muestra la curva patrón de 2-fenil etanol y la ecuación de la recta para este compuesto.

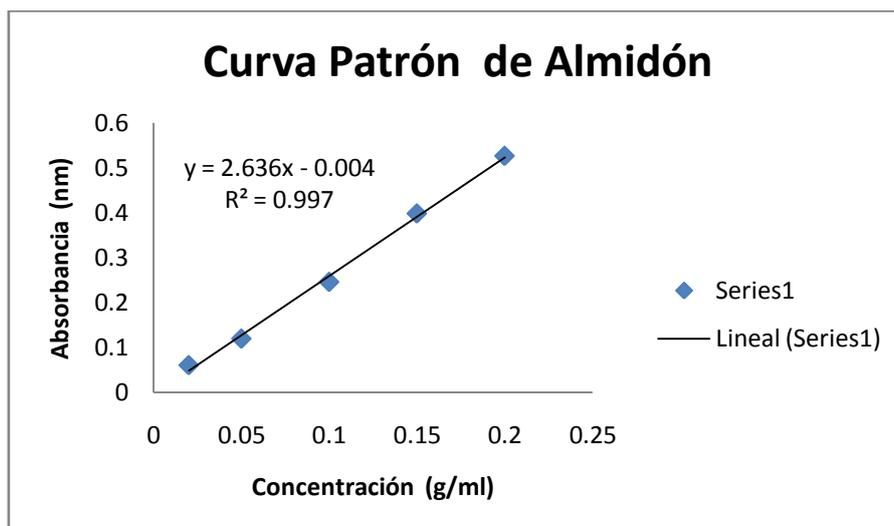


Gráfica 18 curva patrón de etanol

La inyección de las muestras se hizo manualmente 5 repeticiones para cada concentración

Condiciones del cromatógrafo: El inyector se encontraba a una temperatura de 250°C con un flujo de 28.3mL/min, la temperatura del detector fue de 250°C, flujo de hidrogeno=40mL/min, flujo de aire =400mL/min y flujo de nitrógeno=30mL/min.

En la grafica 18 se muestra la curva patrón de almidón y la ecuación de la recta para este compuesto.



Grafica 18 curva patrón de almidón

Las mediciones se hicieron por triplicado,

Se hicieron diluciones a partir de una solución madre que contenía 1g de almidón en 100mL de agua destilada, la solución se preparó mezclando el almidón en agua destilada a 30°C hasta que la desapareciera el precipitado.

ANEXO 3 LISTA DE LOS ESTANDARES DE LOS COMPUESTOS CONGENERICOS

En la tabla 7 está contenida la información de cada reactivo utilizado para determinar el tiempo de retención de cada compuesto congénico, cada estándar se preparó a 10 000 ppm.

CONGENÉRICO	MARCA	PUREZA	SOL. EN AGUA	SOL. EN EtOH	PTO. .EB.	PTO. FUS	t de RET. (min)
2-pentanol	SIGMA	98%	Poco soluble	Miscible	119.3 °C	***	15.969
Acetona HPLC	FERMONT	99.80%	Miscible	Miscible	56.5 °C	-94 °C	9.362
Éter etílico	REASOL	Q.P.	Poco soluble	*****	34.6 °C	-116.3 - (-123.3)	5.328
Hexanol	SIGMA	98%	Poco soluble	Miscible	157 °C	-51.6 °C	19.767
2-fenil-etanol	CHEM SERVICE	98.7%	Muy poco soluble	Poco soluble	219-221 °C	***	27.780
5-HM-furfural	ALDRICH	99%	Soluble	Soluble	110 °C	31.5 °C	23.268
Acetaldehído	SIGMA	>99.5%	Miscible	Miscible	21 °C	-123.5	6.725

						°C	
Acetato de etilo anhidro	ALDRICH	99%	Muy poco soluble	****	76.5-77.5 °C	-84 °C	11.165
Acetato de isoamilo	SIGMA	98%	Muy poco soluble	Miscible	142 °C	***	16.132
Ácido acético	SIGMA	≥99%	Miscible	Miscible	117-118 °C	16 °C	20.416
Alcohol amílico	SIGMA	>99%	Muy poco soluble	Miscible	128 °C	***	18.140
Alcohol isoamílico	J. T. BAKER		Muy poco soluble	Miscible	132 °C	-117.2 °C	17.434
Diacetilo	ALDRICH	97%	Soluble	Miscible	88 °C	***	26.936
Etanol absoluto	J. T. BAKER	99.9 %	Miscible	*****	78.5 °C	***	12.331
Formiato de etilo	SIGMA	97%	Poco soluble	Miscible	53-54 °C	-80 °C	9.415
Furfural	SIGMA	99%	Poco Soluble	Soluble	161.8 °C	-36.5 °C	21.710
Iso-butanol	J. T. BAKER	99.90%	Poco soluble	Miscible	108 °C	-108 °C	15.335
Lactato de etilo	FLUKA	>98%	Miscible	Miscible	154 °C	***	19.642
Metanol	J. T. BAKER	99.98%	Miscible	Miscible	64.7 °C	-97.8 °C	11.135
Propanol	SIGMA	99.8%	Miscible	Miscible	97-98 °C	-127° C	14.15
Sec-butanol (2-butanol)	MERCK	99%	Poco soluble	Miscible	99.5 °C	***	13.827