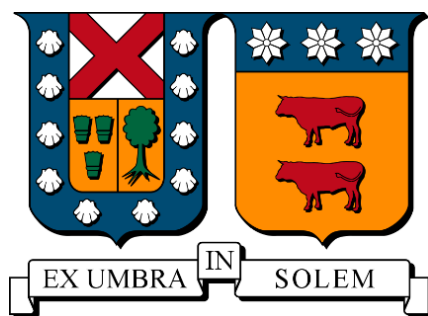


**UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y AMBIENTAL**

VALPARAISO - CHILE



**Caracterización química y volátil de cerveza  
producida con microorganismos nativos  
mediante la implementación y optimización de  
métodos analíticos cromatográficos**

**Karla Andrea Rodríguez Martínez**

Memoria para optar al Título de:

**Ingeniera Civil Químico**

Profesor Guía: Catherine Tessini Ortiz

Profesor Correferente: Cristian Ramírez Bustos

Marzo 2024

## Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización de una cerveza producida por una levadura nativa no *Saccharomyces* a través del estudio de su perfil químico y volátil mediante la optimización de técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) y ultravioleta (UV), así como cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID) y detector selectivo de masas (MS).

Para ello, se elaboró cerveza tipo Ale, utilizando la levadura no *Saccharomyces* nativa *Candida oleophila* y como control *Saccharomyces cerevisiae*, de tal forma de comparar y monitorear la evolución de metabolitos claves de la fermentación alcohólica, como son azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y al término, compuestos volátiles, los cuales aportan las características del perfil organoléptico de la cerveza. Para la detección de ácidos orgánicos (ácido tartárico, ácido láctico, ácido acético y ácido málico) y azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa) se implementó la técnica por HPLC acoplado a detector UV y ELSD respectivamente. Por otro lado, para la detección de etanol y compuestos volátiles se implementa y optimiza la cromatografía de gases acoplada a detector FID y MS respectivamente.

Los principales resultados para los analitos en la cerveza con la levadura nativa indicaron una reducción de analitos en la muestra, en comparación al mosto inicial. Fructosa y maltotriosa se consume un 19% y 27% respectivamente. Por otro lado, la glucosa, maltosa y sacarosa se consumen en un 100%. En la cerveza control, los azúcares fructosa, glucosa y maltosa se consumieron un 100%, la sacarosa no se detecta en la muestra analizada y maltotriosa se consume en un 91%. Con eso se reafirma que la levadura control tiene una mayor capacidad para fermentar una amplia gama de azúcares presentes en el mosto, incluyendo las azúcares más complejas, a diferencia de la levadura nativa donde se evidencia presencia de mayor contenido residual de azúcar en la cerveza.

En relación con los ácidos orgánicos con levadura nativa, tartárico se consume en un 74%, málico, láctico y acético se generan en un 91%, 25% y 26% respectivamente. Por su parte la levadura control presenta generación de todos los analitos: tartárico un 96%, málico un 100%, láctico de un 9,3% y acético de un 21%. Finalmente, para etanol se alcanza un grado alcohólico equivalente a 2,7% v/v en la levadura nativa y 3,9% v/v en la levadura control.

Con respecto a los compuestos volátiles, en ambas cervezas se detecta presencia de compuestos similares, tanto positivos como negativos. A modo de ejemplo, el alcohol isoamílico entrega tonos frutales al producto, y el acetaldehído aporta tonos a manzana verde, los cuales son indeseados en una cerveza en altas concentraciones.

Se puede concluir que, a través de la implementación y optimización realizada de las técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detectores ELSD Y UV, así como la cromatografía de gases (GC) con detectores FID y MS, se logró caracterizar los principales compuestos químicos generados durante el proceso de producción de cerveza utilizando una levadura nativa. Se logro determinar y analizar de manera exhaustiva el perfil químico de la cerveza producida, ofreciendo una comprensión más profunda de los componentes presentes y su impacto en las propiedades sensoriales y la calidad del producto final.

## Índice de Contenidos

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen.....                                                                                | 2  |
| Índice de Contenidos.....                                                                   | 3  |
| Índice de Figuras.....                                                                      | 5  |
| Índice de Tablas .....                                                                      | 7  |
| 1    Introducción .....                                                                     | 8  |
| 1.1    Objetivos .....                                                                      | 9  |
| 1.1.1    Objetivo General.....                                                              | 9  |
| 1.1.2    Objetivo Específico .....                                                          | 9  |
| 2    Fundamentos Teóricos .....                                                             | 10 |
| 2.1    Cerveza .....                                                                        | 10 |
| 2.1.1    Proceso productivo de la cerveza.....                                              | 10 |
| 2.1.2    Compuestos orgánicos de interés presentes en la cerveza .....                      | 12 |
| 2.1.3    Características generales de las levaduras .....                                   | 17 |
| 2.2    Monitoreo Tradicional de Fermentación.....                                           | 18 |
| 2.3    Métodos Analíticos.....                                                              | 19 |
| 2.3.1    Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC).....                               | 23 |
| 2.3.2    Cromatografía de Gases .....                                                       | 26 |
| 3    Materiales y Métodos .....                                                             | 30 |
| 3.1    Implementación y Optimización de métodos cromatográficos .....                       | 30 |
| 3.1.1    Cromatografía Líquida de alta resolución.....                                      | 33 |
| 3.1.2    Cromatografía de Gases .....                                                       | 41 |
| 3.1.3    Validación del método cromatográfico, determinación de parámetros analíticos ..... | 46 |
| 3.2    Desarrollo de Fermentaciones .....                                                   | 46 |
| 3.2.1    Medio de cultivo.....                                                              | 46 |
| 3.2.2    Inóculo .....                                                                      | 47 |
| 3.2.3    Monitoreo de fermentaciones .....                                                  | 47 |
| 3.2.4    Consideraciones para análisis de resultados .....                                  | 52 |
| 3.3    Análisis de la muestra.....                                                          | 53 |
| 3.4    Cuantificación de Analitos.....                                                      | 53 |

|       |                                                                                     |     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.1 | Curva de Calibración.....                                                           | 53  |
| 4     | Resultados y Discusión .....                                                        | 55  |
| 4.1   | Implementación y Optimización de metodología HPLC.....                              | 55  |
| 4.1.1 | Determinación de azúcares .....                                                     | 55  |
| 4.1.2 | Determinación de ácidos orgánicos .....                                             | 58  |
| 4.2   | Implementación y optimización de metodologías GC- FID y GC/MS .....                 | 61  |
| 4.2.1 | Determinación de Etanol.....                                                        | 61  |
| 4.2.2 | Detección de compuestos volátiles .....                                             | 65  |
| 4.3   | Caracterización de fermentaciones: Perfil químico y perfil volátil .....            | 65  |
| 4.3.1 | Identificación y cuantificación de azúcares .....                                   | 66  |
| 4.3.2 | Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos.....                            | 70  |
| 4.3.3 | Identificación y cuantificación de etanol.....                                      | 74  |
| 4.3.4 | Identificación de compuestos volátiles .....                                        | 78  |
| 5     | Conclusión y Recomendaciones .....                                                  | 84  |
| 5.1   | Conclusión .....                                                                    | 84  |
| 6     | Bibliografía.....                                                                   | 85  |
| 7     | Anexos .....                                                                        | 89  |
| 7.1   | Técnicas cromatográficas y detectores utilizados .....                              | 89  |
| 7.1.1 | Cromatografía Líquida .....                                                         | 89  |
| 7.1.2 | Cromatografía de Gases .....                                                        | 95  |
| 7.2   | Curvas de calibración azúcares.....                                                 | 100 |
| 7.3   | Curvas de calibración ácidos orgánicos .....                                        | 102 |
| 7.4   | Curvas de calibración Etanol .....                                                  | 103 |
| 7.5   | Ejemplo de reporte entregado por cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas | 103 |

## Índice de Figuras

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Diagrama de bloques de la producción de cerveza. Fuente: Elaboración propia .....                                  | 11 |
| Figura 2 Perfil de asimilación de carbohidratos en el proceso fermentativo de la cerveza (Priest & Stewart, 2006) .....     | 13 |
| Figura 3 Perfil de respuesta de fermentación (Priest & Stewart, 2006) .....                                                 | 15 |
| Figura 4 Métodos cromatográficos según fase móvil y fase estacionaria. Fuente: Elaboración propia. ....                     | 20 |
| Figura 5 Sistema cromatografía líquida de alta resolución. (Suarez & Morales, 2018) .....                                   | 24 |
| Figura 6 Detector de dispersión de luz evaporativa. (Hsu et al., 1999) .....                                                | 25 |
| Figura 7 Sistema cromatográfico Detector UV. Fuente: Elaboración propia. ....                                               | 25 |
| Figura 8 Sistema Cromatografía de Gases (GC). (M.McNair & M.Miller, 1998) .....                                             | 27 |
| Figura 9 Esquema del espectrómetro de masas. Fuente: Elaboración propia .....                                               | 28 |
| Figura 10 Detector de ionización de llama (FID) (Dressler, 1987) .....                                                      | 29 |
| Figura 11 Diagrama metodología general implementada para obtención de perfil químico de las muestras .....                  | 30 |
| Figura 12 Diagrama métodos a implementar para el análisis de cerveza. ....                                                  | 30 |
| Figura 13 Diagrama proceso de optimización de técnicas cromatográficas. ....                                                | 31 |
| Figura 14 Preparación de estándar. Fuente: Elaboración propia .....                                                         | 35 |
| Figura 15 Preparación estándares de rango de trabajo. Fuente: Elaboración propia .....                                      | 36 |
| Figura 16 Diagrama Pretratamiento de muestra. Fuente: Elaboración propia .....                                              | 37 |
| Figura 17 Diagrama pretratamiento de muestra .....                                                                          | 41 |
| Figura 18 Configuración sistema Headspace .....                                                                             | 44 |
| Figura 19 Esquema de la cámara de Neubauer, indicando la zona de cuadrícula. ....                                           | 49 |
| Figura 20 Esquema que indica la profundidad de la cámara de Neubauer. ....                                                  | 49 |
| Figura 21 Dimensiones de una cámara de Neubauer, y vista superior de sección de conteo celular. ....                        | 50 |
| Figura 22 Secciones de una cámara de Neubauer .....                                                                         | 50 |
| Figura 23 Cuadrícula central de la cámara, indicando los conjuntos utilizados y sus dimensiones. ..                         | 51 |
| Figura 24 Esquema de la convención de levaduras a contabilizar retenidas en la línea. ....                                  | 52 |
| Figura 25 Sugerencia en la dirección del conteo de levaduras por cuadrado tipo B. ....                                      | 52 |
| Figura 26 Curva de calibración. ....                                                                                        | 54 |
| Figura 27 Cromatograma Detección de Azúcares Elución Isocrática por HPLC-ELSD .....                                         | 55 |
| Figura 28 Cromatograma Detección de Azúcares por HPLC-ELSD .....                                                            | 56 |
| Figura 29 Cromatograma Detección de Azúcares Gradiente por HPLC-ELSD .....                                                  | 58 |
| Figura 30 Cromatograma de ácidos Orgánicos con Parámetros iniciales por HPLC-UV .....                                       | 59 |
| Figura 31 Cromatograma detección de ácidos Orgánicos por HPLC-UV con parámetros optimizados .....                           | 61 |
| Figura 32 Pale Ale sin Cloruro de Sodio por GC-FID .....                                                                    | 62 |
| Figura 33 Pale Ale con Cloruro de Sodio por GC-FID .....                                                                    | 63 |
| Figura 34 Cinética de fermentación - Densidad del mosto fermentado con <i>C. oleophila</i> y con <i>S. cerevisiae</i> ..... | 65 |
| Figura 35 Cinética de fermentación – pH del mosto fermentado con <i>C. oleophila</i> y con <i>S. cerevisiae</i> . ....      | 66 |
| Figura 36 Curva de calibración Azúcares Rango de Concentraciones Bajas por HPLC-ELSD .....                                  | 67 |

|                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 37 Curva de calibración Azúcares Rango de Concentraciones Altas por HPLC-ELSD .....                                                                            | 67  |
| Figura 38 Evolución de Maltosa y Maltotriosa en el proceso de fermentación con levadura <i>C. oleophila</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....                              | 68  |
| Figura 39 Evolución de Fructosa, Glucosa y Sacarosa en el proceso de fermentación con levadura <i>C. oleophila</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....                       | 68  |
| Figura 40 Evolución de ácido Tartárico en el proceso de fermentación con levadura <i>C. oleophila</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....                                    | 71  |
| Figura 41 Evolución de ácido Málico en el proceso de fermentación con levadura <i>C. oleophila</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....                                       | 71  |
| Figura 42 Evolución de ácidos orgánicos en el proceso de fermentación con levadura <i>C. oleophila</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....                                   | 72  |
| Figura 43 Evolución de ácidos orgánicos en el proceso de fermentación con levadura <i>S.cerevisiae</i> y <i>C.oleophila</i> .....                                     | 77  |
| Figura 44 Cromatograma compuestos volátiles en muestra fermentada con Levadura <i>S.cerevisiae</i> por GC MS .....                                                    | 79  |
| Figura 45 Cromatograma compuestos volátiles en muestra fermentada con Levadura <i>C.oleophila</i> por GC MS .....                                                     | 80  |
| Figura 46 Abundancia de compuestos volátiles presentes en las muestras de cerveza fermentadas con levadura <i>S.cerevisiae</i> y <i>C. oleophila</i> .....            | 81  |
| Figura 47 Abundancia de compuestos volátiles presentes en las muestras de cerveza fermentadas con levadura <i>S.cerevisiae</i> y <i>C. oleophila</i> sin Etanol ..... | 82  |
| Figura 48 Sistema cromatografía líquida de alta resolución. (Suarez & Morales, 2018).....                                                                             | 91  |
| Figura 49 Detector de dispersión de luz evaporativa. (Hsu et al., 1999).....                                                                                          | 92  |
| Figura 50 Sistema cromatográfico Detector UV. Fuente: Elaboración propia. ....                                                                                        | 94  |
| Figura 51 Sistema Cromatografía de Gases (GC). (M.McNair & M.Miller, 1998) .....                                                                                      | 96  |
| Figura 52 Esquema del espectrómetro de masas. Fuente: Elaboración propia .....                                                                                        | 98  |
| Figura 53 Detector de ionización de llama (FID) (Dressler, 1987) .....                                                                                                | 99  |
| Figura 54 Curva de Concentraciones Fructosa .....                                                                                                                     | 100 |
| Figura 55 Curva de Concentraciones Glucosa .....                                                                                                                      | 100 |
| Figura 56 Curva de Concentraciones Sacarosa.....                                                                                                                      | 100 |
| Figura 57 Curva de Concentraciones Maltosa.....                                                                                                                       | 101 |
| Figura 58 Curva de Concentraciones Maltotriosa .....                                                                                                                  | 101 |
| Figura 59 Curva de concentraciones ácido Tartárico.....                                                                                                               | 102 |
| Figura 60 Curva de concentraciones ácido Málico.....                                                                                                                  | 102 |
| Figura 61 Curva de concentraciones ácido Láctico.....                                                                                                                 | 102 |
| Figura 62 Curva de concentraciones ácido Acético.....                                                                                                                 | 103 |
| Figura 63 Curva de concentraciones Etanol .....                                                                                                                       | 103 |

## Índice de Tablas

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1 Concentración de Ácidos Orgánicos en Cerveza (Hill, 2015; White & Zainasheff, 2010) .....                                                          | 14 |
| Tabla 2 Comparativa monitoreo de fermentación por método tradicional y por cromatografía .....                                                             | 22 |
| Tabla 3 Pureza, gramos requeridos y gramos pesados por cada azúcar .....                                                                                   | 34 |
| Tabla 4 Concentración de estándar y alícuota extraída de estándar madre. ....                                                                              | 35 |
| Tabla 5 Pureza, gramos requeridos y gramos pesados por cada ácido orgánico .....                                                                           | 39 |
| Tabla 6 Concentración de estándar y alícuota extraída de estándar madre. ....                                                                              | 40 |
| Tabla 7 Microlitos de etanol necesarios para cada concentración de estandar.....                                                                           | 43 |
| Tabla 8 Parámetros operacionales iniciales para ELSD.....                                                                                                  | 55 |
| Tabla 9 Gradiente Fase Móvil .....                                                                                                                         | 56 |
| Tabla 10 Parámetros de Operación y Gradiente Optimizados .....                                                                                             | 57 |
| Tabla 11 Parámetros operacionales iniciales para UV.....                                                                                                   | 58 |
| Tabla 12 Parámetros operativos optimizados para UV.....                                                                                                    | 60 |
| Tabla 13 Parámetros Headspace .....                                                                                                                        | 63 |
| Tabla 14 Condiciones operacionales iniciales para FID .....                                                                                                | 64 |
| Tabla 15 Rango lineal, Ecuación de la recta, $R^2$ , Límite de detección y Límite de cuantificación de cada azúcar. ....                                   | 67 |
| Tabla 16 Rango lineal, Ecuación de la recta, $R^2$ , Límite de detección y Límite de cuantificación de cada ácido Orgánico. ....                           | 70 |
| Tabla 17 Condiciones operacionales optimizados para FID .....                                                                                              | 74 |
| Tabla 18 Obtención de valores de Área corregidos mediante el uso de Metanol como estándar de corrección.....                                               | 75 |
| Tabla 19 Rango lineal, Ecuación de la recta, $R^2$ , Límite de detección y Límite de cuantificación del Etanol .....                                       | 75 |
| Tabla 20 Resultados de detección de etanol - <i>C. oleophila</i> .....                                                                                     | 76 |
| Tabla 21 Resultados de detección de etanol - <i>S. cerevisiae</i> .....                                                                                    | 76 |
| Tabla 22 Estimación del grado alcohólico del producto final mediante la densidad día 0 y día 9 con levadura <i>S.cerevisiae</i> y <i>C.oleophila</i> ..... | 77 |
| Tabla 23 Parámetros operacionales optimizados para GC MS.....                                                                                              | 78 |
| Tabla 24 Compuestos volátiles presentes en las muestras de cerveza fermentadas con levadura <i>S.cerevisiae</i> y <i>C. oleophila</i> .....                | 81 |

# 1 Introducción

En la actualidad el sector de la cerveza artesanal va creciendo exponencialmente, constituyendo una clara tendencia de consumo. Junto con esto, el mercado presenta una gran variedad de tipos de cervezas distintas, clasificándose según su fermentación y, por tanto, por las cepas de levaduras que intervienen. Hoy en día en la industria existe un ambiente de innovación y búsqueda de nuevos productos con aromas y sabores variados, por lo que la utilización de microorganismos nativos surge como una oportunidad de fabricación de productos innovadores.

La utilización de levaduras nativas brinda la oportunidad de experimentar y desarrollar nuevos estilos de cerveza. Estas levaduras pueden ofrecer características sensoriales únicas, lo que permite la creación de cervezas innovadoras y diferenciadas en el mercado. Esto es especialmente relevante para las cerveceras artesanales y pequeñas, ya que les permite destacarse y captar la atención de los consumidores.

La compleja composición de la cerveza se puede atribuir a la presencia de varias clases de metabolitos, algunos derivados de las materias primas y otros generados a través de interacciones y reacciones durante el proceso de elaboración gracias a la acción de la levadura, ingrediente principal y más importante en la producción de cerveza. El proceso de fermentación juega un papel fundamental en la creación del sabor de la cerveza, por lo que es importante caracterizar determinados analitos en los productos cerveceros antes, durante y después de la fermentación con el fin de llevar un control durante todo el proceso de elaboración de la cerveza, para garantizar su calidad la cual está estrechamente ligada a parámetros sensoriales relacionados con el estilo, como el amargor, dulzor, sequedad, carácter de la malta y similares.

Típicamente en el proceso de producción de cerveza se estudian parámetros como pH, densidad y temperatura, los cuales entregan información para conocer propiedades generales de la cerveza y carecen de sensibilidad. Sin embargo, existen técnicas cromatográficas, tales como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía de gases (GC) que permiten caracterizar los compuestos químicos y volátiles, determinando metabolitos claves de un proceso de fermentación como lo son las azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes.

Obtener más información del proceso mediante la determinación de metabolitos relevantes de la fermentación utilizando técnicas como HPLC y GC, permitiría conocer el aporte de usar una levadura no *Saccharomyces* en comparación a un proceso tradicional con una levadura clásica, desde la perspectiva de los alcoholes, perfil organoléptico del producto, calidad del producto final, entre otros.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo General

Caracterizar los principales compuestos químico y volátiles generados en el proceso de producción de cerveza utilizando una levadura nativa mediante las técnicas HPLC acoplado a detectores ELSD y UV y cromatografía de gases acoplada a detectores FID y MS.

### 1.1.2 Objetivo Específico

- Implementar y optimizar el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) y detector ultravioleta (UV) para la determinación de azúcares y ácidos orgánicos presentes en la cerveza.
- Optimizar la metodología de cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID) y detector selectivo de masas (MS) para identificar compuestos volátiles presentes en la cerveza.
- Determinar y analizar el perfil químico y volátil generados en el proceso de producción de cerveza, utilizando una levadura nativa no *Saccharomyces* a través de las metodologías implementadas HPLC con detector ELSD y UV y cromatografía de gases con detector FID y MS.

## 2 Fundamentos Teóricos

### 2.1 Cerveza

#### 2.1.1 Proceso productivo de la cerveza

La cerveza es una bebida producida con malta cebada cuyos nutrientes son fermentados en agua con levadura, donde también se añade lúpulo para proporcionar el amargor, aroma y sabor característicos de la cerveza.

Esta bebida carbonatada puede ser alcohólica o no alcohólica, siendo el rango de alcohol en cervezas tradicionales entre un 4,5% y 5% dependiendo de su proceso productivo, sin embargo, también las hay con 10% y más. Por otro lado, las no alcohólicas tienen un proceso de producción muy similar, la diferencia radica en que una vez finaliza el proceso de fermentación, el producto es calentado para poder evaporar el alcohol que contiene la cerveza (The Beer Times, 2022).

Como se menciona anteriormente, las materias primas involucradas en la producción de cerveza tradicionales son las siguientes:

**Agua:** Es el ingrediente principal de la cerveza y corresponde aproximadamente al 90% de la composición de ésta (Buiatti, 2008). La composición del agua es de suma importancia en el proceso de producción, ésta debe ser de la más alta calidad química y microbiológica. Adicionalmente la distinta concentración de iones y contenido mineral influye directamente sobre las propiedades de la cerveza y da una contribución importante al sabor del producto final.

**Levadura:** Microorganismos unicelulares (hongos) capaces de transformar todos los nutrientes de la cerveza aportados por la malta en alcohol, dióxido de carbono y otros compuestos que le dan sabor a la cerveza, a través de la fermentación alcohólica. La mayoría de las cervezas tradicionales utilizan la cepa de levadura llamada *Saccharomyces*, y dentro de esta categoría hay dos especies que son las más utilizadas para la producción de cerveza: cerveza Lager (*Saccharomyces pastorianus*) y cerveza Ale (*Saccharomyces cerevisiae*). Esta variación en las cepas tiene directa relación con el estilo y el perfil deseado de la cerveza (Allagash Brewing Company, 2022).

**Malta:** Grano principal y fuente de nutrientes de la cerveza, aportando nutrimentos tales como proteínas, hidratos de carbono y vitaminas. La malta se obtiene luego de someter a la cebada a un tratamiento de malteado o germinación controlada. Para el proceso de producción se puede utilizar cebada, cebada malteada o malta.

El color de la cebada malteada adquirido en el proceso de tostado da el color a la cerveza. Dependiendo de la temperatura en la que se trabaja permite variar aspectos como aroma, dulzor, sabor, cuerpo y espuma en el producto final.

**Lúpulo:** Para la producción se ocupa la parte femenina de la planta, la flor, en su interior hay un racimo de pequeños globos amarillos llamados lupina, los cuales da amargor aroma e influye en el

sabor de la cerveza. Las lupinas almacenan ácidos y aceites que le dan a la cerveza su amargor y aroma. Estas características son aportadas por alfa ácidos, uno de los componentes más importantes del lúpulo en términos de elaboración de cerveza. Por sí solos no son amargos, pero la isomerización térmica los convierte en ácidos iso-alfa, que tienen un sabor intensamente amargo y, por lo tanto, forman la base de una característica sensorial típica de la cerveza (Metrohm, 2020). Adicionalmente, el lúpulo aumenta la estabilidad de la espuma, ayuda a conservar el frescor y confiere otras propiedades dependiendo de la etapa en la que es agregada al mosto. Usualmente se añade en la ebullición.(Roberts, 2016).

A continuación, en la Figura 1, se muestra un diagrama del proceso de elaboración de la cerveza:

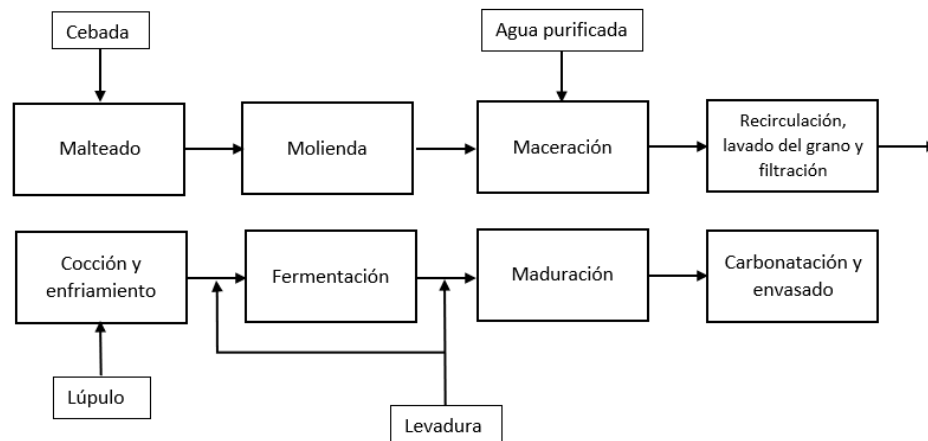


*Figura 1 Diagrama de bloques de la producción de cerveza. Fuente: Elaboración propia*

**Malteado:** La cebada es sometida a un proceso de germinación controlada, donde se hidrata el grano de cebada generando raíces. Los granos son lavados y luego se dejan en remojo en agua, posteriormente se retira el agua y los granos se dejan incubando para permitir la germinación. Para detener la germinación se seca en el horno, a temperaturas que aumentan entre 65°C y 220°C. Las temperaturas están relacionadas con las características del grano que se desea para el estilo de cerveza que se quiera producir, donde las temperaturas menores entregan un grano más claro y menos tostado utilizado principalmente para cervezas de tipo lager y las temperaturas mayores entregan un grano más oscuro y tostado implementado en la producción de cervezas de tipo ale.

Para ser fermentado por la levadura, la reserva alimenticia de la cebada, almidón y proteínas, debe ser convertido por enzimas en azúcares simples fermentables. Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas son las enzimas encargadas de llevar a cabo la conversión. Esta última está presente en la cebada, pero el primero se produce durante la germinación del grano. Cepas de cebada especialmente criadas (generalmente con bajo contenido de nitrógeno) se utilizan para el malteado (Young, 2022).

**Molienda:** Los granos secos de cebada malteada, o malta, se muelen y se reduce su tamaño permitiendo que se expongan todos los componentes presentes al interior del grano y se produzca una eficiente extracción con agua.

**Maceración:** Los granos molidos se mezclan con agua a una temperatura entre 62 a 72 °C y se completa la transformación enzimática de proteínas y almidón en aminoácidos y azúcares fermentables. El líquido que se obtiene de este proceso se denomina mosto y es separado de los granos residuales.

**Filtración y recirculación:** En esta etapa ocurre la clarificación del mosto, eliminando la borra o grano para obtener el mosto (líquido) lo más puro posible.

**Cocción:** El mosto puro pasa a una olla para su cocción, necesaria para detener la actividad enzimática y para obtener los valores de amargor del lúpulo que es añadido en esta etapa del proceso.

**Fermentación:** En esta etapa se le añade la levadura al mosto, y las azúcares simples de la malta se convierten en alcohol, dióxido de carbono y cantidades menores de glicerol y ácido acético. La temperatura inicial y el tiempo de fermentación depende del estilo de cerveza que se desea producir, con rangos desde de 18 a 21°C con un tiempo de fermentación entre 2 a 5 días para cervezas tipo Ale, y de 7 a 13 °C con una duración que fluctúa entre 1 a 3 semanas para las de tipo Lager. Al final de este proceso se obtiene un producto llamado cerveza verde (The Beer Connoisseur, 2016).

**Maduración:** La cerveza verde es almacenada a temperaturas bajas, cercanas a 0°C por un periodo de tiempo prolongado, con la finalidad de transformar compuestos indeseables en unos más neutros. Adicionalmente en este proceso las partículas que pueden causar turbidez en la cerveza, como levaduras, precipitan y de esta manera se obtiene una cerveza limpia y purificada.

**Carbonatación y envasado:** Este proceso puede generarse de manera natural o forzada. En producciones más artesanales es más común la carbonatación natural, la cual se lleva a cabo mediante la adición de dextrosa a la cerveza madura, produciendo más dióxido de carbono una vez la cerveza esta embotellada. A escala industrial se emplea mayoritariamente la carbonatación forzada, que consta de la inyección de dióxido de carbono a presión y posteriormente el envasado del producto final carbonatado.

## 2.1.2 Compuestos orgánicos de interés presentes en la cerveza

### 2.1.2.1 Azúcar

Los azúcares fermentables contribuyen directamente a la dulzura de la cerveza, mientras que los carbohidratos con más de cuatro unidades de glicosil pueden ser beneficiosos para la percepción de la cerveza, ya que contribuyen al cuerpo o la sensación en boca (Nogueira et al., 2005).

La importancia de la detección de carbohidratos recae en que estos son responsables del contenido alcohólico, sabor, gusto, color, carbonatación, producción de espuma y calidad nutricional de la cerveza, lo que se vuelve fundamental para conocer la calidad del producto (Floridi et al., 2001). Por otro lado, la cantidad de carbohidratos presentes durante el proceso de producción de la cerveza depende del tipo de cebada implementada, las condiciones de malteado de ésta, las cepas de levadura, entre otros, es por esta razón que varía el tipo de cebada a utilizar dependiendo del estilo de cerveza y dulzor que se quiera obtener.

Analizar las azúcares en el mosto permite un monitoreo del proceso, además, determinar las azúcares fermentables y no fermentables presentes, entregando información respecto de la tasa de fermentación, el comportamiento de la levadura, y las características organolépticas de la cerveza. Las azúcares glucosa, fructosa, sacarosa y azúcares con alto grado de polimerización, tales como maltosa y maltotriosa son los principales carbohidratos fermentables en el mosto de cerveza (Floridi et al., 2001). Varios sacáridos permanecen en la cerveza después de la fermentación, incluidos los monosacáridos (principalmente D-glucosa, D-fructosa, D-ribosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-galactosa en cantidades traza) que contribuyen a la dulzura del producto y comprenden aproximadamente el 10% de los carbohidratos del mosto (Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., & Young, 1982). Los principales disacáridos son maltosa y sacarosa, mientras que algunos de los principales trisacáridos son maltotriosa, iso-maltosa y rafinosa, que han demostrado tener varios beneficios para la salud, como la prevención de enfermedades del corazón.(Das et al., 2014)

El seguimiento del contenido de carbohidratos en el mosto y la cerveza es importante en la elaboración de cerveza moderna, especialmente para el desarrollo de nuevos sabores y selección de las materias primas. La composición de la cerveza es de aproximadamente 3,3 a 4,4 % de carbohidratos, que comprenden 75 a 80 % de dextrinas, 20 a 30 % de monosacáridos y oligosacáridos, y 5 a 8 % de pentosanos, lo que convierte a los carbohidratos en el principal componente no volátil de cerveza (Anderson et al., 2019).

A continuación, en la Figura 2 se puede observar el perfil típico de la evolución de los carbohidratos durante el proceso fermentativo de la cerveza.

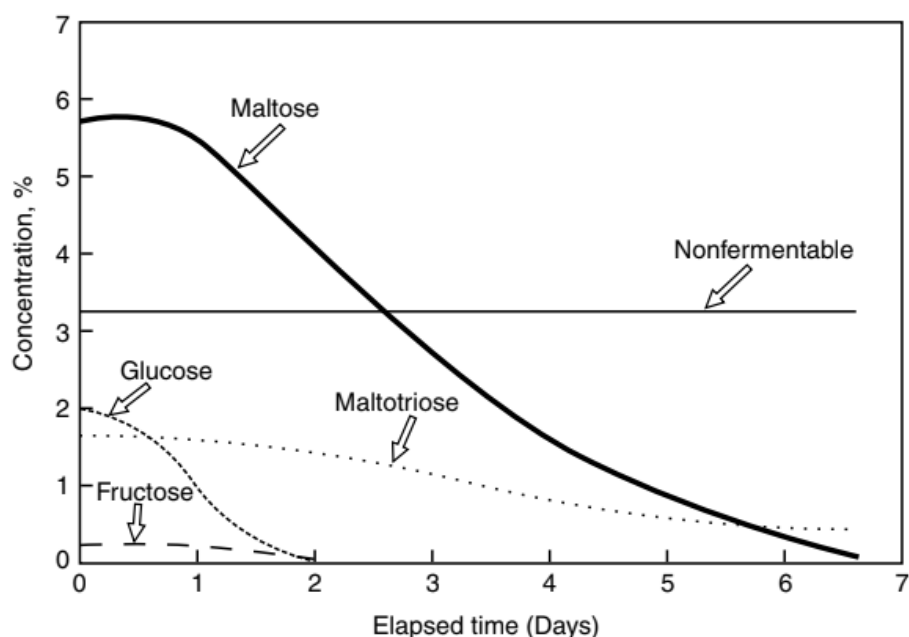


Figura 2 Perfil de asimilación de carbohidratos en el proceso fermentativo de la cerveza (Priest & Stewart, 2006)

Con respecto a los rangos típicos de azúcares en cerveza, estos pueden variar según el estilo de cerveza. Según (Briggs et al., 2004) , los rangos comunes son de aproximadamente 5 a 10 g/L para cervezas más ligeras y de 15 a 25 g/L para cervezas más fuertes y maltosas.

### 2.1.2.2 Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos son productos finales tanto de la fermentación de la levadura como de la fermentación bacteriana. Estos ácidos son fundamentales para el perfil de sabor, pero debido a la fermentación bacteriana pueden introducir un sabor agrio, que podría ser intencional al elaborar cervezas agrias o no intencional, debido al deterioro. La identidad y la cantidad de ácidos orgánicos generados durante la fermentación dependen de la cepa de levadura y el protocolo de elaboración utilizado. Los ácidos orgánicos afectan el pH y el sabor (~~agrio~~, agrio, ácido) de la cerveza y proporcionan efectos fisiológicos positivos, como la reducción del ácido úrico. La presencia de estos ácidos también puede ayudar a aumentar la vida útil de la cerveza al inhibir el crecimiento de algunas bacterias de deterioro como la Salmonella (Anderson et al., 2019).

Los ácidos orgánicos comunes presentes en la cerveza incluyen ácido láctico, tartárico, málico, acético, cítrico y succínico, siendo el ácido láctico el que típicamente tiene la concentración más alta. Estos ácidos orgánicos contribuyen a la acidez y sabores únicos y distintivos de las cervezas y también son responsables de las propiedades organolépticas, además de ayudar en el proceso de conservación (Das et al., 2014).

Los rangos típicos de ácidos orgánicos en cervezas pueden variar dependiendo del estilo específico y de otros factores como la receta y el proceso de fermentación. A continuación, se presentan algunos rangos generales de ácidos orgánicos en cervezas tipo Ale:

*Tabla 1 Concentración de Ácidos Orgánicos en Cerveza (Hill, 2015; White & Zainasheff, 2010)*

| Ácido Orgánico  | Concentración (g/L) |
|-----------------|---------------------|
| Ácido Acético   | 0,05-0,2            |
| Ácido Láctico   | 0,1-0,8             |
| Ácido Tartárico | 0,02-0,06           |
| Ácido Málico    | 0,02-0,2            |

En la Figura 3 se puede observar el perfil de respuesta de diversos factores en el proceso de fermentación. Con relación a los ácidos orgánicos se tiene que el pH cae a medida que se producen ácidos orgánicos y compuestos amortiguadores. El pH mínimo alcanzado durante la fermentación es en función del pH del mosto, la capacidad amortiguadora del mosto y la cantidad de crecimiento de levadura durante la fermentación. Un pH más bajo de la cerveza está asociado con un pH más bajo del mosto, una menor capacidad amortiguadora del mosto y un mayor crecimiento de la levadura. El pH reducido inhibe el deterioro bacteriano durante la fermentación. Durante la fermentación el pH va disminuyendo y alcanza un mínimo de 3,8 a 4,4 antes de aumentar ligeramente hacia el final de la fermentación.

EL pH del mosto se encuentra en un rango 6 a 7 debido al pH del agua y el de la cerveza en un rango de 4,1 a 4,6.

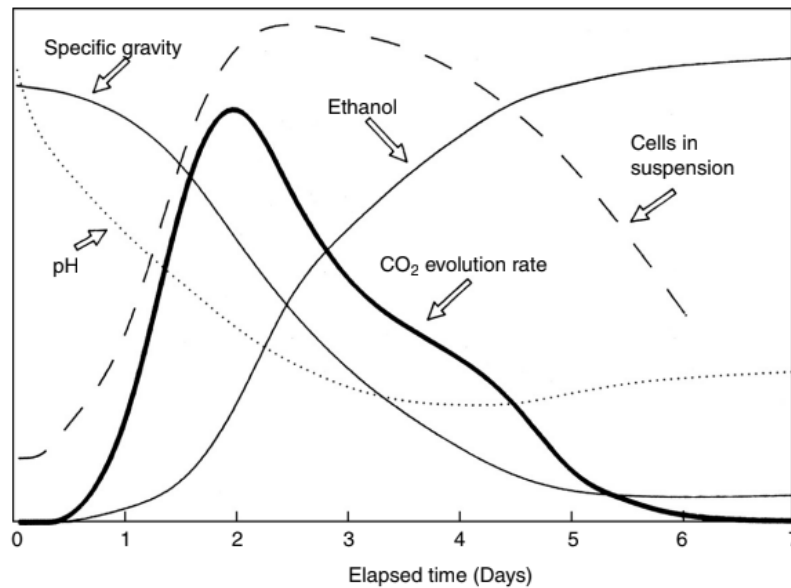


Figura 3 Perfil de respuesta de fermentación (Priest & Stewart, 2006)

### 2.1.2.3 Compuestos Volátiles

En la industria cervecera existe un gran interés en identificar los compuestos orgánicos volátiles de la cerveza ya que estos se ven directamente relacionados con el sabor y aroma únicos del producto, y estos con el contenido químico. Algunos de estos compuestos volátiles tienen un efecto positivo, o atributo, en el sabor y el olor de una cerveza, mientras que otros tienen un efecto negativo, o defecto. Es por esto que caracterizar estos componentes en los productos cerveceros antes, durante y después de la fermentación es de vital importancia en el desarrollo del producto, el control del proceso y el control de calidad de todo el proceso de elaboración de la cerveza (Morotta & Thomas, 2016). Este grupo consta de compuestos químicamente diversos que incluyen alcoholes superiores, ácidos orgánicos (y sus derivados), aldehídos, cetonas, heterocíclicos, terpenos y compuestos de azufre (Nešpor et al., 2018).

La fermentación conduce a la producción de etanol y una serie de subproductos, incluidos otros alcoholes, compuestos carbonílicos, ésteres, aldehídos y ácidos. Estos compuestos ayudan a crear el perfil de aroma y sabor de la cerveza, por lo que comprender la naturaleza y la concentración de las sustancias volátiles puede ser increíblemente importante para la selección de materias primas y cepas de levadura, así como para el control de calidad (Anderson et al., 2019).

Los ésteres se caracterizan por su sabor afrutado y presentan un impacto en el equilibrio general del sabor. Los alcoholes contribuyen al olor y sabor agrio de la cerveza, y los alcoholes superiores actúan como precursores inmediatos de los ésteres más activos en el sabor. Durante el proceso de producción de cerveza la concentración de compuestos volátiles, especialmente esteres y alcoholes superiores, va aumentando (Nešpor et al., 2018) por la acción de las levaduras a partir del metabolismo de aminoácidos. Tanto las levaduras como las condiciones de fermentación y la composición del mosto afectan el perfil de alcoholes superiores y sus concentraciones (Loviso & Libkind, 2019). Los sabores rancios aumentan directamente con el desarrollo de aldehídos y cetonas

durante el almacenamiento. Los ácidos carboxílicos pueden contribuir a múltiples olores, como afrutado, a queso, amargo o rancio (Cajka et al., 2010).

Adicional a esto, es importante también mencionar que el etanol es uno de los ingredientes principales en las bebidas alcohólicas como la cerveza. Es un subproducto natural de la fermentación y determina la cantidad de alcohol que tiene la bebida, definido como ABV siglas de *Alcohol By Volumen* y se define como los mililitros de etanol puro que hay en 100 mL de una cerveza. Es importante conocer el nivel de alcohol de una cerveza ya que esto ayuda a determinar su sabor, ya que el ABV tiene un gran impacto en el cuerpo de la bebida, así como en la sensación que deja en boca. Adicionalmente, el etanol disminuye significativamente la retención de aldehídos, lo que lleva a una menor percepción de las características del mosto (Perpète & Collin, 2000).

En la Figura 3 presentada en la sección anterior también se evidencia la evolución de alcohol en la muestra a lo largo del proceso de fermentación, el cuál fluctúa entre 0% al inicio de la fermentación hasta entre 3 y 3,5% de alcohol pudiendo llegar hasta 5% dependiendo del tipo de cerveza. (Buiatti, 2008).

A continuación, se presenta una lista de algunos de los principales compuestos volátiles encontrados en la cerveza, junto con sus descriptores aromáticos:

- Ésteres: Compuesto que destaca por sus notas frutales y florales. Algunos ejemplos de ésteres encontrados en cerveza son el acetato de etilo (aroma afrutado, similar a plátano), acetato de isoamilo (aroma a plátano), acetato de etilo (aroma a pera), acetato de hexilo (aroma a manzana). Estos son usualmente compuestos deseables por su contribución en aroma.
- Alcoholes: Compuesto que aporta notas dulces, floral y a frutas maduras. Los alcoholes más comunes son el etanol (aroma a alcohol), metanol (aroma ligero a alcohol), propanol (aroma dulce), isoamilo (aroma a plátano, frutas tropicales). Los alcoholes superiores son deseables al aportar notas de frutas maduras y complejidad aromática.
- Aldehídos: Los descriptores aromáticos característicos más comunes son aroma a almendras, afrutado, a nueces y caramelo. Algunos ejemplos son el acetaldehído (aroma afrutado, a manzana verde), benzaldehído (aroma a almendras), furfural (aroma a nueces, avellanas). En exceso son compuestos indeseables, ya que pueden producir aromas a madera verde, astringentes o rancios.
- Compuestos sulfurados: Con aroma característico tales como aroma a azufre, cebolla, ajo, entre otros. Algunos ejemplos son el metil mercaptano (aroma a cebolla, ajo), sulfuro de dimetilo (aroma a vegetales, maíz), tiofenos (aroma a azufre). Usualmente indeseables, pueden generar aromas a azufre, cebolla o huevos podridos en altas concentraciones.

Cabe mencionar que algunos compuestos pueden ser deseables para determinados estilos de cerveza, mientras que para otros pueden ser indeseables en altas concentraciones y contribuir a defectos sensoriales (Bamforth, 2003).

### 2.1.3 Características generales de las levaduras

Las levaduras son microorganismos ampliamente utilizados en diversos campos incluyendo a la industria alimentaria, para la producción de alimentos fermentados como el pan, el vino y la cerveza. En el proceso de fermentación de la cerveza, es ampliamente utilizada gracias a su capacidad de ser anaerobios facultativos, es decir, pueden desarrollarse sin la necesidad de oxígeno en el medio en el que se encuentran (Martínez, 2015).

Las levaduras tienen la capacidad de metabolizar los azúcares presentes en el medio de fermentación, como los azúcares de malta en el proceso de producción de cerveza, a través del proceso de fermentación. En el proceso de fermentación las levaduras convierten los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono, además de producir una variedad de metabolitos como ácidos orgánicos, ésteres y compuestos aromáticos. Este proceso de fermentación es esencial en la producción de cerveza, ya que proporciona la carbonatación y contribuye a los perfiles de sabor y aroma característicos de la cerveza. Las levaduras también desempeñan un papel importante en la clarificación y la estabilización de la cerveza durante el proceso de maduración. (White & Zainasheff, 2010).

Existen variadas especies de levaduras, entre las que destaca *Saccharomyces cerevisiae*, que se utiliza a menudo en la fermentación de alimentos y bebidas. Por otro lado, en la naturaleza también se encuentran las levaduras nativas y se utilizan cada vez más en la producción de cerveza para proporcionar características únicas.

Las características de las levaduras pueden variar con la especie y cepas específicas, lo que puede afectar en la capacidad fermentativa y perfiles aromáticos.

#### 2.1.3.1 Levaduras de género *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura heterótrofa que obtiene energía de la glucosa y tiene una alta capacidad de fermentación. El uso más extendido es en la industria de la panificación y la fabricación de cerveza, vino y alcohol (Suárez-Machín et al., 2016).

Es una levadura altamente utilizada en la producción de cerveza debido a su alta capacidad de fermentación, siendo capaz de convertir el azúcar presente en el mosto en alcohol y dióxido de carbono de forma rápida y eficiente, en condiciones ideales, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de alcanzar un rendimiento cercano al 100%, es decir que convertiría la mayoría de los azúcares disponibles en alcohol. Adicionalmente, produce una alta gama de compuestos aromáticos contribuyendo a los sabores y perfil aromático de la cerveza con aportes de notas frutales, florales y especiadas a la cerveza. Por otro lado, esta levadura es capaz de tolerar condiciones adversas como lo son pH ácido o altas concentraciones de alcohol, logrando completar la fermentación en ambientes desfavorables (Bamforth, 2003).

#### 2.1.3.2 Levaduras no *Saccharomyces*

El continuo crecimiento del mercado de la cerveza artesanal y el mayor interés de los consumidores han desviado los esfuerzos hacia la producción de cervezas diferenciadas e innovadoras. En este

punto, la levadura no convencional se ha convertido en una herramienta para el desarrollo de nuevos productos.

En los últimos años, la selección de cepas iniciadoras también se ha llevado a cabo dentro de especies no *Saccharomyces* que han sido aisladas y caracterizadas por tener componentes aromáticos y de sabor distintivos. Las levaduras no *Saccharomyces* representan una gran fuente de biodiversidad para la producción de nuevos estilos de cerveza, y tienen el potencial para una aplicación más amplia a otras bebidas y para otras aplicaciones industriales (Budroni et al., 2017).

En estudios realizados en diferentes especies, se evaluó el rendimiento de la fermentación y el potencial para la producción de compuestos aromáticos como alcoholes superiores, acetatos y ésteres etílicos, y los resultados mostraron que muchas especies de levaduras no convencionales como las *Brettanomyces*, *Pichia pastoris* y *Candida* tienen una alta capacidad para producir compuestos aromáticos, sabores, tiene un buen potencial de aplicación en la producción de cerveza diferenciada (Burini et al., 2021).

Las levaduras no *Saccharomyces* se destacan por sintetizar una gran variedad de compuestos volátiles. Estas levaduras no convencionales se reproducen en la primera etapa de fermentación, siendo una población drásticamente reducida debido a una supuesta intolerancia al etanol. Sin embargo, se ha determinado que estas levaduras tienen rendimientos entre 25 y 49 g/L de etanol llegando a producir concentraciones de etanol incluso semejantes a las del género *Saccharomyces*, esto cuando se encuentra bajo las condiciones óptimas para su desarrollo (Chavez-Parga et al., 2016)

Dentro de las levaduras no *Saccharomyces* que se pueden utilizar como cultivos iniciadores puros para la fermentación del mosto, se han propuesto diferentes géneros y especies, entre ellos *B. bruxellensis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Lachancea thermotolerans*, *Saccharomycodes ludwigii* y *Pichia kluyveri* (Budroni et al., 2017).

## 2.2 Monitoreo Tradicional de Fermentación

El monitoreo de la fermentación en la producción de cerveza es crucial para asegurar la calidad del producto y poder conseguir un producto con las características deseadas.

El monitoreo tradicional del proceso se basa en la medición de parámetros clave durante la fermentación tales como la temperatura, la densidad específica, el pH y el dióxido de carbono. Estas mediciones se realizan con regularidad y con esto se genera un seguimiento del progreso de la fermentación (White & Zainasheff, 2010).

- Medición de la densidad: La densidad del mosto se mide antes de la fermentación y durante la misma. Permite monitorear el progreso de la fermentación alcohólica mediante la disminución de la misma, dado que los azúcares se van convirtiendo en etanol por acción de las levaduras. Alcanzar la estabilidad en este valor puede determinar el fin de la fermentación.
- Control de temperatura: La temperatura de la fermentación es importante para controlar la actividad de las levaduras y la producción de compuestos volátiles en la cerveza. Es importante mantener la temperatura dentro de un rango específico, la mayoría de las levaduras de cerveza fermentan mejor a una temperatura entre 18° C y 22 °C.

- **Análisis de pH:** el pH de la cerveza también es un factor importante en la fermentación, ya que puede afectar la actividad de la levadura y la producción de sabores y aromas en la cerveza. El pH ideal para la fermentación de la cerveza puede variar de 4,2 a 4,8, hoy dependiendo del estilo de la cerveza y la cepa de la levadura utilizada.
- **Dióxido de carbono:** el dióxido de carbono es un subproducto de la fermentación de la cerveza y es responsable de la carbonatación de ella. Se utiliza un medidor de carbonatación para las mediciones. Es importante monitorear la cantidad de CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación para garantizar que la cerveza esté adecuadamente carbonatada. La cantidad de dióxido de carbono producido durante la fermentación puede variar de 1,5 a 3,5 volúmenes de CO<sub>2</sub>, dependiendo del estilo de la cerveza y la preferencia del consumidor.

Es recomendable llevar un registro detallado de los parámetros de fermentación para poder ajustar el proceso en caso de ser necesario. Un adecuado monitoreo garantiza un óptimo término de la fermentación. En este sentido, al menos, debe monitorearse el consumo de sustrato, el crecimiento de la biomasa de levaduras, temperatura y pH. Sin embargo, más información permite un mayor conocimiento del proceso y del producto. Es a través de la rigurosa atención a la evolución de la fermentación que se logra garantizar la calidad constante del producto y cumplir con los estándares predeterminados.

### 2.3 Métodos Analíticos

A pesar de que las técnicas de monitoreo de fermentación tradicionales son las comúnmente utilizadas en la industria, y permiten tener una impresión del proceso, estas carecen de sensibilidad y precisión. Es aquí donde la implementación de técnicas cromatográficas ofrece numerosos beneficios y ventajas por sobre las técnicas tradicionales.

Con la cromatografía es posible realizar un análisis preciso de los compuestos de interés, al permitir separar, identificar y cuantificar una amplia gama de componentes, proporcionando información detallada de la composición de la cerveza a lo largo del proceso fermentativo. Por otro lado, con el monitoreo continuo es posible obtener información de la muestra en un tiempo específico de la fermentación pudiendo así realizar ajustes inmediatos de ser necesario. Otra ventaja es que el uso de la cromatografía permite una mejor comprensión de los cambios químicos que ocurren en el proceso brindando información clave que ayuda a la optimización de los parámetros de fermentación para mejorar la calidad de la cerveza y desarrollo de nuevas recetas. Una gran ventaja es que con la cromatografía es posible analizar compuestos volátiles pudiendo determinar los compuestos responsables de los distintos aromas y sabores presentes en la cerveza.

Las técnicas cromatográficas son muy utilizadas en todas las ramas de la ciencia ya que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos presentes en mezclas, especialmente complejas. Esta técnica consta de procesos de separación, basadas en las propiedades físico-químicas de los materiales.

Para realizar este proceso de separación de componentes mediante cromatografía, la muestra es introducida en un flujo de fase móvil que pasa a través de una fase estacionaria. La fase estacionaria se encuentra fija en el interior de una columna y comúnmente es un líquido viscoso enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas

empaquetadas dentro de la columna (Harris, 2012). Por otro lado, la fase móvil o eluyente corresponde al disolvente que circula a través de la columna y normalmente es un líquido o un gas. En la cromatografía por elución existen dos modalidades de trabajo: la elución isocrática consiste en que la composición del eluyente se mantiene constante a lo largo de todo el proceso y la elución por gradiente la composición del eluyente varía gradualmente a lo largo del tiempo.

La cromatografía se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria, en la Figura 4 se esquematiza la clasificación general de las técnicas cromatográficas.

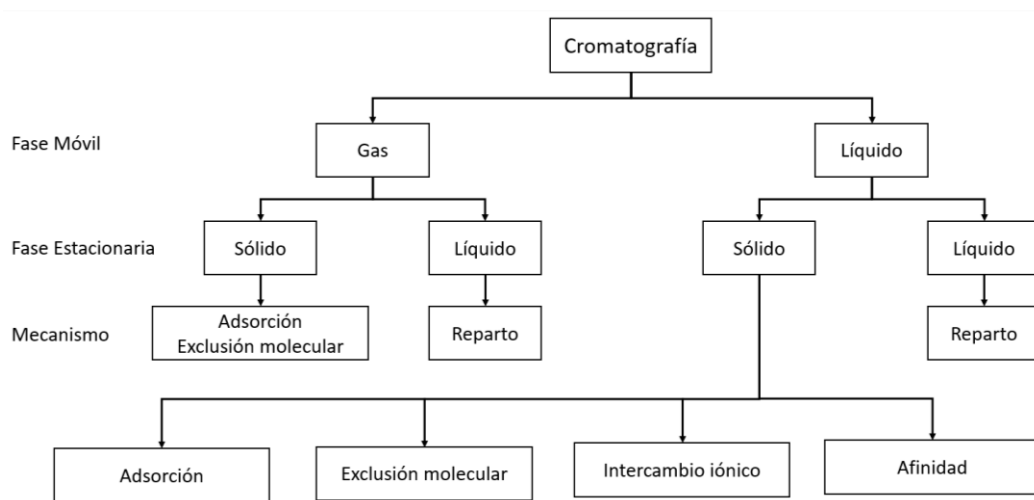


Figura 4 Métodos cromatográficos según fase móvil y fase estacionaria. Fuente: Elaboración propia.

La fase estacionaria interactúa con mayor o menor intensidad con las diferentes especies moleculares que pasan a través de ella. A medida que los solutos o analitos avanzan sobre la columna, se separan, lo que permite su purificación. La separación de los analitos en diferentes tiempos de retención se refleja en el cromatograma.

El cromatograma es un gráfico que representa la señal analítica, generalmente eléctrica, generada por el detector al recibir los analitos en el efluente. Estas señales se visualizan en forma de picos, que varían en altura y área dependiendo de la concentración de los compuestos. En el cromatograma se muestran todos los compuestos detectados que forman parte de la mezcla analizada, con su respectivo tiempo de retención. El tiempo de retención se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima del compuesto en el sistema.

En la industria cervecera, la cromatografía es empleada para el monitoreo de la fermentación y la calidad de la cerveza al permitir la separación de los compuestos volátiles y no volátiles para su análisis.

En el caso de los compuestos volátiles, la cromatografía de gases (GC) es una técnica ampliamente utilizada. Esta técnica se basa en la separación de dichos componentes de una muestra utilizando una columna cromatográfica y un gas portador como fase móvil. Los componentes de la muestra se separan mediante una columna cromatográfica y se detectan por medio de un detector de masa.

(MS) o un detector de ionización de llama (FID). La GC permite determinar la concentración de alcoholes, ésteres, aldehídos, ácidos y otros compuestos volátiles presentes en la cerveza, que pueden influir en el sabor y aroma de la cerveza. También permite el control de la calidad de la cerveza mediante el análisis de contaminantes y la detección de procesos de deterioro.

Por otro lado, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utiliza para separar y analizar compuestos no volátiles presentes en la cerveza, como ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y otros compuestos. La HPLC se basa en la separación de componentes en una columna cromatográfica, con una fase móvil líquida, y la detección por medio de un detector UV o de fluorescencia o un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD).

En general, la cromatografía es una herramienta útil para el monitoreo de la fermentación en la industria cervecera, ya que permite determinar la concentración de compuestos clave en la cerveza y asegurar la calidad del producto final mediante la obtención de información detallada sobre los componentes de la cerveza y su evolución durante el proceso de fermentación, proporciona una mayor cantidad de información sobre los compuestos presentes en la cerveza y su evolución durante el proceso de fermentación. La cromatografía puede ayudar a identificar compuestos específicos que pueden afectar la calidad de la cerveza, lo que permite a los productores ajustar el proceso de producción para mejorar la calidad del producto final.

A continuación, en la Tabla 2 se presenta de forma comparativa el análisis de cerveza por metodología presentando las ventajas y desventajas más importantes de cada uno de los métodos.

*Tabla 2 Comparativa monitoreo de fermentación por método tradicional y por cromatografía*

|             | <b>Método tradicional</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Cromatografía</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ventajas    | <p>-Es un método sencillo y económico que no requiere de equipos especializados.</p> <p>-Los parámetros que se miden son fundamentales en la fermentación de la cerveza y permiten obtener información importante sobre el estado de la fermentación.</p>                                                                            | <p>-Proporciona información detallada sobre la composición de la cerveza y la concentración de compuestos específicos.</p> <p>-Permite ajustar el proceso de elaboración en tiempo real, ya que se pueden detectar problemas de fermentación y corregirlos.</p> <p>-Es útil para identificar problemas de calidad en la cerveza y mejorar el producto final.</p> |
| Desventajas | <p>-La información que se obtiene es limitada y no proporciona detalles sobre la composición de la cerveza o la concentración de compuestos específicos.</p> <p>-No se pueden detectar compuestos volátiles que influyen en el aroma y sabor de la cerveza.</p> <p>-No permite ajustar el proceso de elaboración en tiempo real.</p> | <p>-Requiere de equipos y personal especializado, lo que puede ser costoso.</p> <p>-Puede ser una técnica compleja y requiere de un alto grado de habilidad para su realización y análisis de los resultados.</p>                                                                                                                                                |

En resumen, el monitoreo tradicional es un método sencillo y económico que proporciona información fundamental sobre el estado de la fermentación de la cerveza, pero no proporciona detalles sobre la composición de la cerveza. Por otro lado, la cromatografía es una técnica analítica avanzada que proporciona información detallada sobre la composición de la cerveza, pero puede ser costosa y compleja de realizar.

### 2.3.1 Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)

En la cromatografía líquida (LC) la mezcla de interés se disuelve en un líquido que actúa como fase móvil que pasa a través de una fase estacionaria sólida. La fase móvil recorre por la fase estacionaria trayendo consigo los componentes de la muestra separados durante la cromatografía.

En LC, la interacción entre las moléculas de la muestra y el medio cromatográfico puede basarse en varios factores, como el tamaño, la carga, la unión por afinidad o la hidrofobicidad. Existen variedades de cromatografía líquida, según las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria (fase normal versus fase inversa) y si la fase móvil está presurizada (alto rendimiento).

La cromatografía líquida de alto rendimiento o alta resolución (HPLC) la fase estacionaria suele tener la forma de una columna llena de partículas porosas muy pequeñas ( $1\text{-}5\ \mu\text{m}$  de diámetro) y la fase móvil líquida (o eluyente) se mueve a través de la columna impulsada por una bomba (a presión elevada).

Los solutos se inyectan en la fase móvil como un pequeño volumen en la cabeza de la columna cromatográfica. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Moldoveanu & David, 2013). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Al pasar el efluente de la columna a través del detector, alguna propiedad química o física del analito se transduce a una señal eléctrica y los solutos se identifican a medida que se eluyen de la columna.

El sistema cromatográfico consta del solvente o fase móvil, posteriormente pasa por un desgasificador o *degasser* para evitar daños en el equipo que puedan generarse por una fase móvil gasificada, posteriormente se encuentra una bomba que cumple la función de inyectar con presión la fase móvil dentro de una columna. También el sistema cuenta con un inyector que es donde se inyecta la muestra donde se encuentra el analito y esta muestra se incorpora a la corriente de fase móvil. Posteriormente se encuentra la columna, la cual varía y depende del analito que se quiera identificar y es específica a las necesidades éste. A continuación, se encuentra el detector, el cuál recibe y transforma la información de los compuestos, las señales que detecta y entrega el detector se reflejan en un cromatograma que corresponde a un gráfico compuestos de diversos picos de variados tamaños y alturas dependiendo de las concentraciones de los compuestos que se encuentren en la muestra analizada.

En la Figura 5 se esquematiza el sistema cromatográfico típico de la cromatografía líquida de alta resolución.

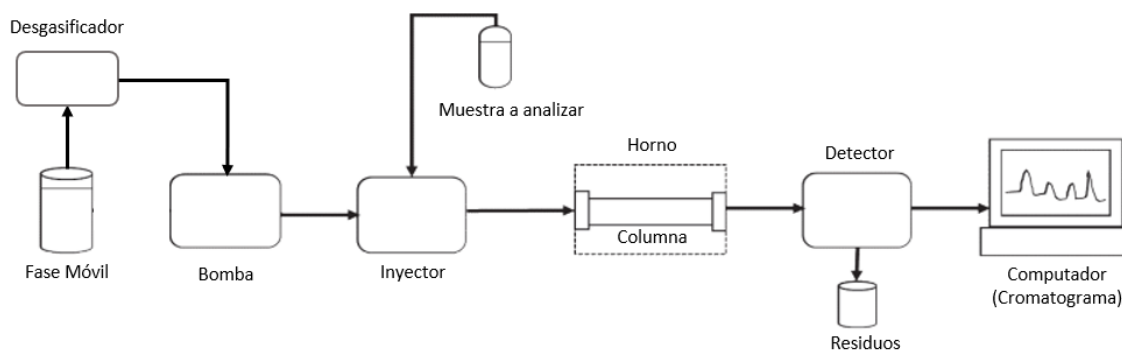


Figura 5 Sistema cromatografía líquida de alta resolución. (Suarez & Morales, 2018)

### 2.3.1.1 HPLC ELSD

El detector ELS o *evaporative light scattering detector* por sus siglas en inglés, es un detector de dispersión de luz evaporativa empleado para la detección de componentes de muestras no volátiles en un eluyente volátil. El fundamento de este equipo se basa en que miden la luz dispersada generada por micropartículas del soluto en la muestra, transportadas por un flujo de gas y dirigidas a través de un haz de luz para dispersar la luz.

En el detector intervienen tres operaciones principales: primero la nebulización (o atomización) de la fase móvil transformándose en una nube de gotas pequeñas, posteriormente la vaporización de la nube de gotas, y finalmente la dispersión de la luz incidente por la nube de partículas residuales.

Uno de los métodos más comunes para la separación y la cuantificación de carbohidratos en la cerveza es HPLC con detector ELSD, esto ya que se ha demostrado que tiene una precisión, repetibilidad y límite de cuantificación (LOQ) aceptables para la producción y garantizar la calidad (Anderson et al., 2019). El análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), puede proporcionar no solo el análisis cualitativo sino también la determinación cuantitativa (Nogueira et al., 2005).

A continuación, se presenta la Figura 6 que esquematiza un detector ELSD.

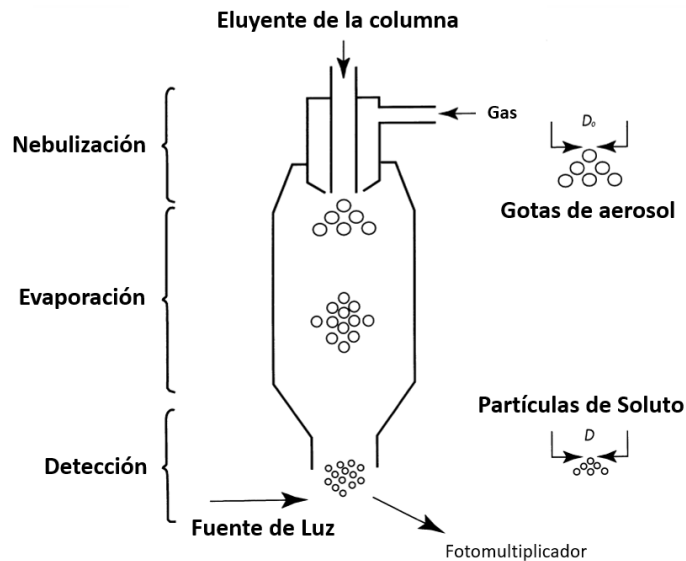


Figura 6 Detector de dispersión de luz evaporativa. (Hsu et al., 1999)

#### 2.3.1.2 HPLC UV

Un detector UV es un dispositivo en línea que mide la absorbancia UV del eluyente de HPLC y proporciona una señal continua que se puede utilizar para cuantificar la cantidad de compuestos que emergen de la columna de HPLC. Hay tres tipos de detectores UV: detectores de longitud de onda fija, longitud de onda variable y matriz de fotodiodos.

El sistema cromatográfico básico consta de una fuente de radiación, un selector de longitud de onda y un detector para medir la absorbancia del eluyente que pasa a través de una celda de flujo.

En la Figura 7 se observa una esquematización del detector UV.

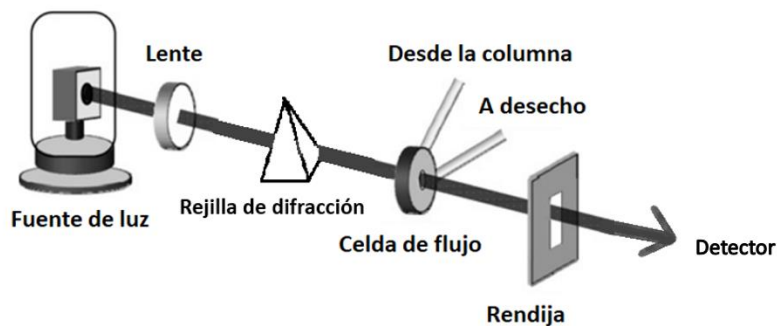


Figura 7 Sistema cromatográfico Detector UV. Fuente: Elaboración propia.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es el método más popular para analizar ácidos orgánicos debido a la sencillez, rapidez y estabilidad. La columna de intercambio iónico como HPX-87H se ha utilizado para separar ácidos orgánicos porque puede separar azúcares y ácidos simultáneamente (Han et al., 2019). Las resinas de intercambio iónico de ácidos fuertes, en combinación con detectores de índice de refracción (IR) o ultravioleta (UV), se pueden utilizar para la determinación simultánea de ácidos, azúcares y algunos alcoholes (Falqué López & Fernández Gómez, 1996).

Los ácidos orgánicos separados por HPLC suelen ser detectado con detector ultravioleta (UV) a longitudes de onda por debajo de 220 nm donde los grupos carboxilo tienen una banda de absorción (Han et al., 2019).

### 2.3.2 Cromatografía de Gases

En cromatografía de gases la fase móvil de este sistema cromatográfico es un gas y la fase estacionaria es comúnmente un líquido, pero también existe como sólido. Este líquido se encuentra en forma de una capa microscópica sobre un soporte sólido inerte dentro de un pequeño tubo de vidrio, por ende, la cromatografía de gases funciona como una técnica de cromatografía en columna. La muestra fluye a través del sistema de gas y se gasifica antes de ingresar finalmente a la columna cromatográfica para lograr una separación efectiva.

La cromatografía de gases tiene las ventajas de alta sensibilidad, uso de muestras pequeñas, fuerte capacidad de separación, buena selectividad, amplia aplicación y análisis rápido.

La cromatografía de gases usa un gas inerte, generalmente nitrógeno o helio, también llamado *carrier* como fase móvil para transportar la muestra de interés a través del sistema. La muestra, que puede ser líquida o gaseosa, ingresa al cromatógrafo de gases mediante la implementación de una jeringa al inyector. Conectada al inyector se encuentra la entrada de la columna, esta se encuentra localizada dentro de un horno el cual es calentado durante el proceso de análisis para eluir a los componentes, por ende, en esta sección del sistema es donde ocurre la separación de analitos. La salida de la columna se encuentra conectada al detector, quién genera una señal eléctrica en respuesta a los componentes químicos eluidos previamente. Esta señal generada es procesada por un *software* en un computador acoplado al sistema GC generando un cromatograma. (Turner, 2020)

Lo anterior se esquematiza en la siguiente Figura.

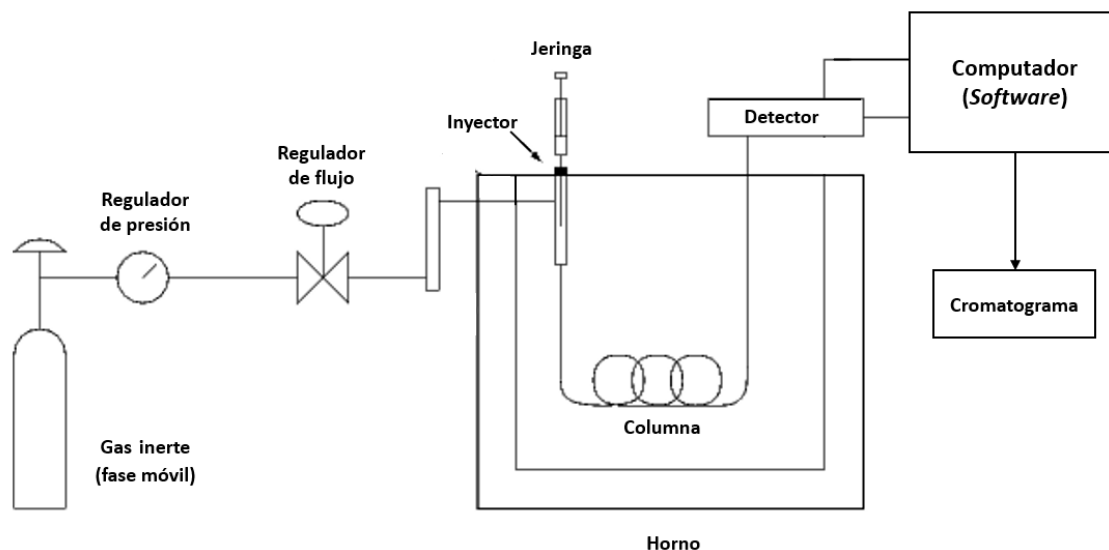


Figura 8 Sistema Cromatografía de Gases (GC). (M.McNair & M.Miller, 1998)

La cromatografía de gases es la técnica más utilizada para el análisis de compuestos volátiles en cerveza a nivel de laboratorio. Implementando detectores como FID o MS y complementándolo técnicas de extracción tales como como Microextracción en Fase Sólida (SPME) o espacio de cabeza (Headspace) es posible obtener resultados con exactitud de manera sencilla, rápida y selectiva.

La técnica de extracción Headspace o “espacio de cabeza”, se utiliza para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en muestras líquidas y sólidas. Las muestras se introducen en un vial cerrado con aire, posterior a esto se realiza un equilibrio térmico entre la muestra y la fase gaseosa. Una vez que se llega al equilibrio termodinámico, con una jeringa o sistema de dosificación se retira una parte de la muestra que está en fase de vapor y se introduce directamente al inyector del GC.

#### 2.3.2.1 GC/MS

La cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (GC/MS) es una técnica compuesta por dos procedimientos analíticos acoplados en serie: una cromatografía de gases (GC) para la separación de compuestos volátiles y una espectrometría de masas (MS) para la identificación y determinación de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de la molécula. El GC ayuda en la separación de la mezcla de múltiples componentes para que puedan alcanzar la espectrometría de masas uno a la vez. (Ahmed, 2013)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que se puede acoplar a un GC y usarse en lugar de un detector convencional. Las moléculas neutras eluyen de la columna analítica y se incorporan al detector mediante el sistema de vacío. Una vez en el detector la muestra se ioniza en la fuente de iones para producir iones moleculares que pueden degradarse en iones fragmentados. Esta ionización ocurre mediante el uso de electrones (EI, ionización electrónica) o un reactivo químico (CI, ionización química). Es esta etapa, un electrón, producido por un filamento, se acelera con 70 electronvoltios (eV) y elimina un electrón de la molécula para producir un ion molecular que es un catión radical.

A continuación, el fragmento y los iones moleculares se separan en el analizador de masas por su relación masa/carga ( $m/z$ ), típicamente un analizador de masas cuadripolar, y se detectan.

Después de que el analizador de masas haya separado los iones, estos llegan al detector donde la señal es amplificada por un multiplicador de electrones o una placa multicanal. El software de adquisición registra la señal en una computadora para producir un cromatograma y un espectro de masas para cada punto de datos los fragmentos con diferentes proporciones de masa a carga generarán señales diferentes, por lo que se detectará cualquier compuesto que produzca iones dentro del rango de masa del analizador de masa (Turner, 2022). Los datos de un GC-MS son tridimensionales y proporcionan espectros de masas que se pueden usar para confirmar la identidad, identificar analitos desconocidos y determinar las propiedades estructurales y químicas de las moléculas, así como el cromatograma que se puede usar para el análisis cualitativo y cuantitativo.

Lo antes mencionado se esquematiza en la siguiente Figura.

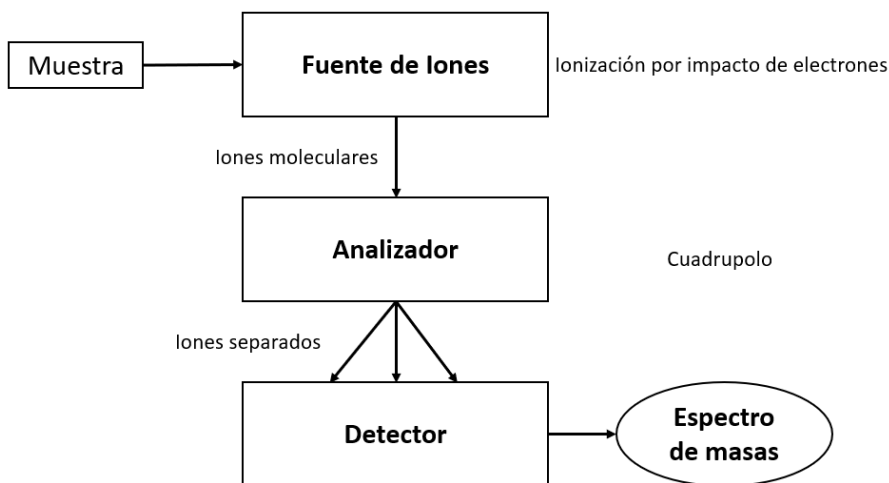


Figura 9 Esquema del espectrómetro de masas. Fuente: Elaboración propia

#### 2.3.2.2 GC-FID

El detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más usados en la cromatografía de gases debido a sus precisión y versatilidad. El principio de operación del detecto FID se basa en la detección de iones formados durante la combustión de compuestos orgánicos en una llama de hidrógeno y aire. La generación de estos iones es proporcional a la concentración de la especie organiza en la muestra por analizar. Este tipo de detector responde a analitos cuyos compuestos contienen carbono, la presencia de oxígeno y nitrógeno en la muestra disminuye la señal producida por el detector.

El gas portador con la muestra proveniente de la columna entra al detector por la parte inferior y se mezcla con gas de combustión de hidrógeno más aire (oxígeno) en el área debajo de la llama y se

quema justo por encima de la punta de la llama. Se aplica un voltaje de polarización negativa entre la punta de la llama y un electrodo colector, a medida que se forman los electrones, el campo eléctrico los acelera a través del espacio entre la punta del chorro y el colector y los envía a un electrómetro. Los gases de escape de aire, dióxido de carbono y agua se ventilan desde la parte superior del cuerpo del detector (Henshaw, 2005).

A medida que se forman iones dentro del detector, estos son impulsados por un potencial eléctrico hacia un electrodo colector, produciendo una corriente diminuta del orden de picoamperios ( $10^{-12}$  A).

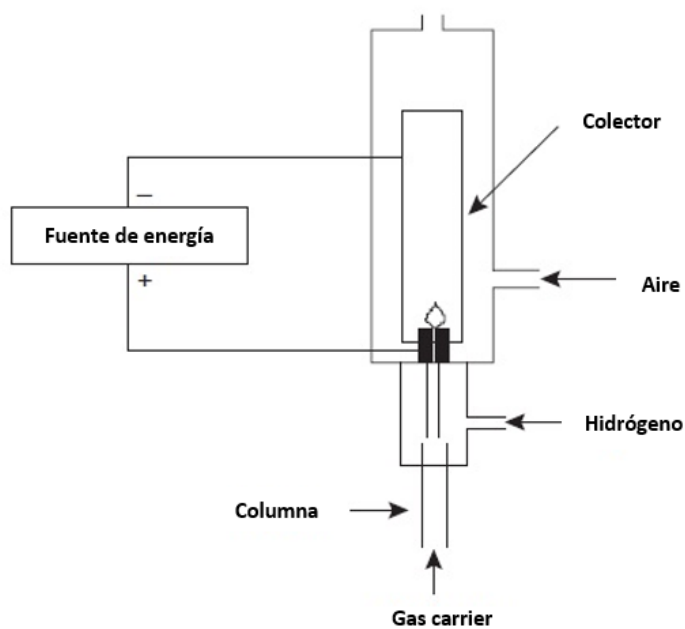


*Figura 10 Detector de ionización de llama (FID) (Dressler, 1987)*

En el Anexo 9.1 se detalla a mayor profundidad las técnicas cromatográficas y detectores utilizados.

### 3 Materiales y Métodos

Para la caracterización de la cerveza elaborada a partir de microorganismos nativos en primer lugar hubo que implementar y optimizar las metodologías cromatográficas, para finalmente utilizarlas para la determinación de los analitos de interés químico. La Figura 11 enseña la metodología desarrollada:



Figura 11 Diagrama metodología general implementada para obtención de perfil químico de las muestras

#### 3.1 Implementación y Optimización de métodos cromatográficos

La optimización del método cromatográficos para la detección y cuantificación de azúcares, ácidos orgánicos, alcohol y compuestos volátiles en cerveza se lleva a cabo implementando dos tipos de cromatografía.

Cromatografía líquida para el caso de las azúcares y ácidos orgánicos, mediante HPLC con detector ELSD y UV respectivamente.

Por otro lado, para alcohol y compuestos volátiles se implementa cromatografía de gases con detector FID y MS respectivamente complementando con la técnica de extracción Headspace.

En la Figura 12 a continuación se esquematiza las técnicas cromatográficas y los respectivos detectores utilizados para el análisis de cada uno de los metabolitos de interés estudiados:

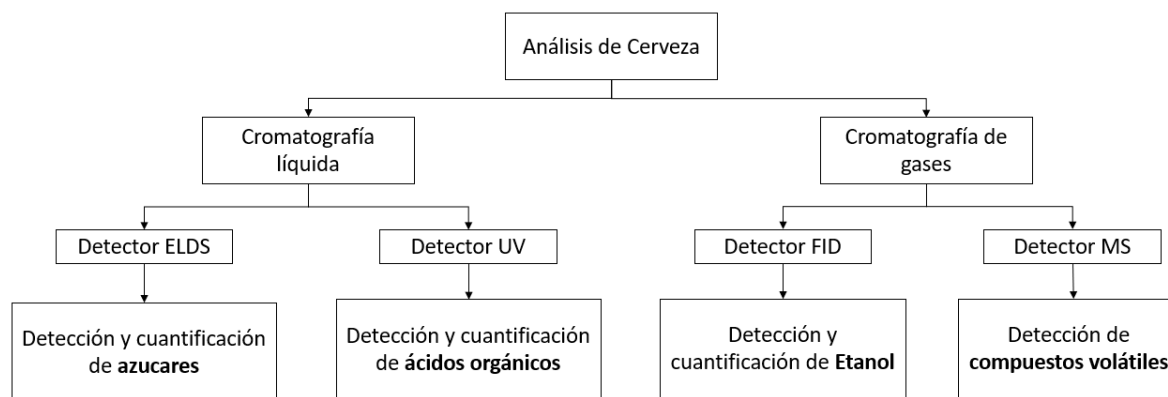


Figura 12 Diagrama métodos a implementar para el análisis de cerveza.

Con el fin de lograr los objetivos se implementó la metodología esquematizada en la Figura 13 explicada a continuación:

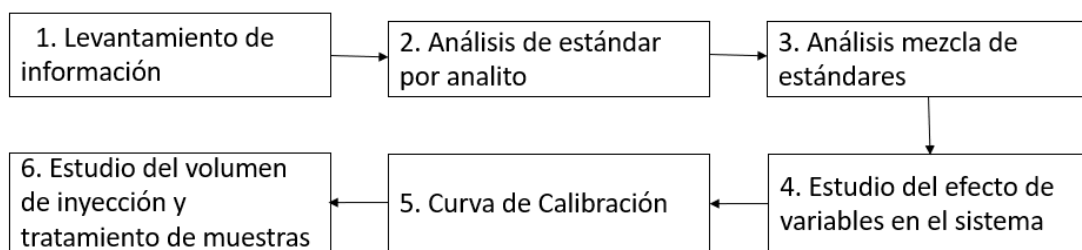


*Figura 13 Diagrama proceso de optimización de técnicas cromatográficas.*

El proceso de optimización de la metodología para la detección de metabolitos en las muestras de cerveza consistió en una serie iteraciones de inyecciones cromatográficas, variando los diversos parámetros hasta encontrar los ideales para obtener una clara lectura y detección de los metabolitos de interés presentes en la muestra. Que un parámetro sea óptimo significa que el cromatograma obtenido del análisis presente picos claros y bien definidos, sin solapamiento y con una separación adecuada entre ellos, además de minimizar lo máximo posible el tiempo de análisis.

A continuación, se señalan las actividades a realizar en cada una de las etapas mencionadas en el diagrama de la Figura 13:

- **Levantamiento de información:** Inicialmente se determina la metodología a utilizar mediante el levantamiento de información de diversos estudios realizados anteriormente relacionados con la detección de los metabolitos de interés mediante cromatografía. En esta etapa se decide que técnica cromatográfica utilizar inicialmente, cuál detector es el más apropiado para el estudio y los parámetros a utilizar tales como, fase móvil, fase estacionaria, temperatura, presión flujo, entre otros y dependiendo de que tipo de cromatografía y detector se utilice.
- **Análisis de estándar por analito:** Una vez se determine los parámetros cromatográficos iniciales bajo los cuales se realizarán las inyecciones se debe inyectar al sistema cromatográfico un estándar de cada analito a una determinada concentración conocida, la concentración elegida debe ser suficiente que permita que la señal cromatográfica obtenida de la inyección entregue un pico visible y definido. Estas inyecciones iniciales permiten conocer el tiempo de retención de cada uno de los analitos.
- **Análisis de mezcla de estándares:** Este paso se realiza para determinar el tiempo total de análisis en el que se obtendrá la señal de todos metabolitos de interés.
- **Estudio del efecto de variables en el sistema:** Una vez se obtenga el cromatograma de la mezcla de analitos a concentración conocida, dependiendo de los resultados obtenidos, se comienza el proceso de optimización de parámetros cromatográficos. Esto se logra mediante el estudio del comportamiento del sistema ante determinadas variaciones en diferentes parámetros operativos, tales como la temperatura, presión, fase móvil, flujo de solvente, volumen de inyección, entre otros. Para esto, se realizan diversos experimentos en los cuales se varían estos parámetros uno a la vez, mientras se mantienen las demás

constantes. El objetivo de esta iteración es conocer el efecto que cada uno de ellos tiene en la resolución, separación de los analitos y tiempo de detección, con el fin de optimizar los tiempos de análisis y obtener picos bien definidos en área y altura, con buena separación entre ellos. Además, se busca obtener un método robusto y con buena reproducibilidad, por lo que se estudian todas las posibles fluctuaciones en las condiciones de trabajo.

- Curva de calibración: Para poder determinar la concentración del analito de interés se realiza la curva de calibración de sistema para cada analito. En este proceso se preparan un conjunto de estándares a distintas concentraciones conocidas utilizando el mismo método cromatográfico que se aplicará a las muestras en análisis.
- Estudio de volumen de inyección y tratamiento de muestras: Una vez realizada la curva de calibración con los estándares, se debe estudiar el volumen de inyección y tratamiento al que debe ser sometido la muestra para hacer ingreso al sistema cromatográfico, y ambas tiene incidencia la capacidad del equipo que se utiliza. Por un lado, el estudio del volumen de inyección a implementar se lleva a cabo mediante la realización de varias inyecciones a diferentes volúmenes y comprobar con cual se obtiene una respuesta cromatográfica suficientemente clara y que a su vez no cause daños al equipo ni lo sobrecargue. Por otro lado, el proceso de pretratamiento de las muestras varía dependiendo del equipo al que serán inyectadas, y la descripción de cada uno de los pretratamientos realizados se detalla en la sección a continuación.

A continuación, se detallará la metodología y materiales empleados para la preparación de fase móvil, preparación de estándares y pretratamiento de las muestras para cada método implementado.

### 3.1.1 Cromatografía Líquida de alta resolución

#### 3.1.1.1 Optimización de metodología HPLC-ELSD para detección de azúcares.

##### 3.1.1.1.1 Materiales e Instrumentos

A continuación, se listan los materiales utilizados en cada una de las etapas del proceso de análisis cromatográfico de las muestras de cerveza:

##### Para análisis:

- HPLC-ELSD: Degasser, bomba, horno de columna y detector de dispersión de luz evaporativa, Waters 2424.
- Fase estacionaria: Columna Inertsil NH2 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula, 15 cm de largo, (GL Sciences).
- Fase móvil: Acetonitrilo grado HPLC (*Multisolvant*, Scharlau, HES) y agua ultrapura (utilizando el purificador de agua MILLIPORE Simplicity)
- Ultrasonido (*Ultrasonic Cleaner Single Frequency Type*, BIOBASE), para sonicar previo a cada análisis todos los solventes a utilizar para evitar las burbujas en el sistema cromatográfico, ya que la presencia de éstas puede causar daños en el equipo y errores en las mediciones.
- Jeringa para cromatografía líquida.
- Loop de inyección, que determina el volumen de muestra que ingresa al detector.
- Cronómetro, ya que al ser inyecciones manuales se debe cronometrar los tiempos de inyección con el propósito de agilizar el proceso y no perder fase móvil.

##### Para preparación de estándares:

- Estándares para análisis (PA):
  - Fructosa: D-Fructosa 98,8% (Central Drug House (P) Ltd.)
  - Glucosa: D-Glucosa, Anhidra (pureza no especificada) (J.T. Baker)
  - Sacarosa: D (+)-Sacarosa 99,7% (ACROS ORGANICS)
  - Maltosa: D-(+)-Maltosa monohidrato 99% (SIGMA-ALDRICH)
  - Maltotriosa: Maltotriosa 95% (SIGMA-ALDRICH).
- Solvente: Acetonitrilo grado HPLC (Multisolvant, Scharlau) y Agua ultrapura para disolver el analito.
- Balanza analítica para pesar los mg de soluto necesarios.
- Matrices aforados de 5 ml para preparar la solución.
- Gotero para el aforo del matraz con fase móvil.
- Agitador (*Vortex Mixer*, FAITHFUL) para homogeneizar la mezcla.

##### Para el pretratamiento de la muestra:

- Muestra de cerveza.
- Tubos Falcon para colocar las muestras y llevar a la centrifuga.
- Centrifuga para lograr separar la posible borra presente de la muestra líquida.

- Filtros 0,22  $\mu\text{m}$  (Membrana MCE, JET BIOFIL) para eliminar las pequeñas partículas de sólido que puedan estar suspendidas en la muestra y obtener una muestra limpia.
- Jeringa plástica desechable para impulsar el líquido a través del filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Matraz aforado de 5 mL para realizar las disoluciones de la muestra.
- Micropipeta y puntas correspondientes para las diluciones.

#### 3.1.1.1.2 Preparación de fase móvil

Debido a que se adapta a los requerimientos del sistema, se opta por trabajar con una mezcla de acetonitrilo y agua como fase móvil.

Para la preparación de la fase móvil se debe tener en consideración que por recomendaciones del fabricante se debe mantener la columna con al menos 50% de solvente orgánico (Acetonitrilo en este caso) ya que de lo contrario se reduce la vida útil de la columna.

Antes de iniciar el equipo se debe asegurar de sonicar ambas fases móviles para evitar burbujas en el sistema, este proceso fue realizado en el ultrasonido durante 15 minutos cada solvente.

La proporción de cada uno de los solventes fue modificada a lo largo del proceso de optimización y se inicia utilizando como guía reportes científicos sobre detección de carbohidratos mediante HPLC (Nogueira et al., 2005).

#### 3.1.1.1.3 Preparación de estándares

La fase móvil con la que se aforan los matraces para la preparación de los estándares es acetonitrilo y agua en razón 85% y 15% respectivamente, por las razones antes mencionadas.

Para este caso los estándares fueron realizados en matraces aforados de 5 mL variando los gramos de soluto dependiendo de la concentración elegida. Se prepararon estándares de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 ppm.

Inicialmente se prepara un matraz madre de 5000 ppm en un matraz aforado de 25 mL, donde se pesan los gramos requeridos de analito y luego se afora con agua ultrapura. Posteriormente, del estándar madre se tomarán las alícuotas para la preparación de los estándares más diluidos del rango de concentraciones antes mencionado.

En la Tabla 1 a continuación se detalla la pureza de los analitos utilizados, los gramos de analito requeridos para obtener el estándar de 5000 ppm considerando dicha pureza y los gramos pesados por azúcar para la preparación del estándar madre.

*Tabla 3 Pureza, gramos requeridos y gramos pesados por cada azúcar*

| Azúcar   | Pureza        | Gramos requeridos | Gramos pesados |
|----------|---------------|-------------------|----------------|
| Fructosa | 98,8%         | 0,1265            | 0,1262         |
| Glucosa  | N. E          | 0,1250            | 0,1265         |
| Sacarosa | 99,7%         | 0,1254            | 0,1258         |
| Maltosa  | $\geq 99,0\%$ | 0,1329            | 0,1329         |

|             |       |        |        |
|-------------|-------|--------|--------|
| Maltotriosa | 95,0% | 0,1316 | 0,1317 |
|-------------|-------|--------|--------|

\*N. E = No especificada

En la Figura 14 se ilustra el proceso de preparación del estándar madre de 5000 ppm:

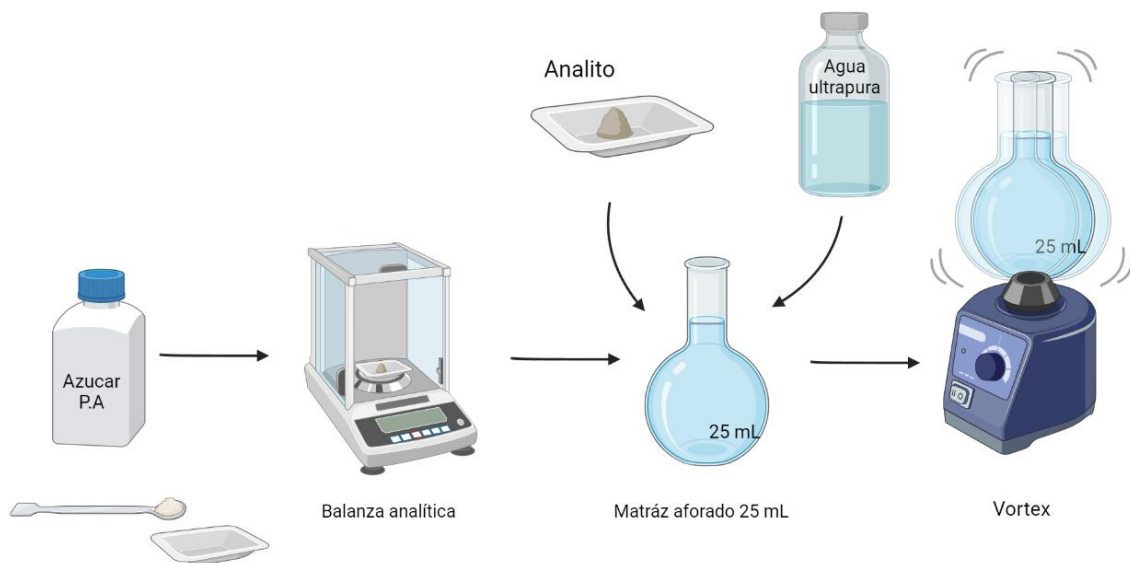


Figura 14 Preparación de estándar. Fuente: Elaboración propia

Como se menciona anteriormente, posterior a la preparación del estándar madre se toma una alícuota determinada para obtener cada uno de los estándares más diluidos. En la Tabla 4 a continuación se presentan las alícuotas extraídas del estándar madre para obtener cada uno de los estándares del rango de trabajo.

Tabla 4 Concentración de estándar y alícuota extraída de estándar madre.

| Concentración del estándar (Y) | Alícuota extraída (X) | Concentración del estándar (Y) | Alícuota extraída (X) |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 50 ppm                         | 50 uL                 | 400 ppm                        | 400 uL                |
| 100 ppm                        | 100 uL                | 500 ppm                        | 500 uL                |
| 150 ppm                        | 150 uL                | 600 ppm                        | 600 uL                |
| 200 ppm                        | 200 uL                | 700 ppm                        | 700 uL                |
| 300 ppm                        | 300 uL                | 800 ppm                        | 800 uL                |

A continuación, en la Figura 15 se ilustra la preparación de todos los estándares del rango de trabajo seleccionado.

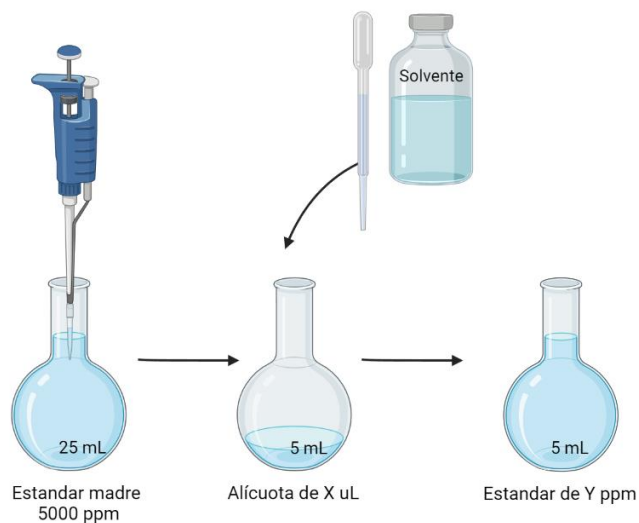


Figura 15 Preparación estándares de rango de trabajo. Fuente: Elaboración propia

#### 3.1.1.1.4 Pretratamiento de la muestra

Las muestras son extraídas del mismo mosto en los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9, esto para los dos distintos tipos de cerveza a estudiar.

- 1) Inicialmente la muestra es retirada del congelador y se deja fuera hasta que alcance una temperatura ambiente.
- 2) Posteriormente se centrifuga a 3500 RPM durante 15 minutos para que decante la borra presente en la muestra, que puede corresponder a levadura o lúpulo.
- 3) Luego de esto se procede a filtrar el líquido con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  situado en una jeringa como se muestra en la figura 23, esto para eliminar las pequeñas partículas sobrenadantes que pueda tener el mosto.
- 4) A continuación, la muestra es diluida en fase móvil con la finalidad de no saturar la columna con los compuestos que presenta la cerveza. Las diluciones dependerán del carbohidrato que se quiere medir.
- 5) Posterior a la dilución de la muestra en fase móvil se vuelve a centrifugar. Esto ya que cuando la cerveza entra en contacto con el acetonitrilo, la fase móvil provoca que precipiten las proteínas presentes en la muestra, esto se distingue como una capa de líquido más denso que debe ser retirado de la muestra para evitar causar daños en la columna y una forma efectiva de separar ambas fases se logra mediante la centrifugación de la muestra.

En la Figura 16 se ilustra el proceso de pretratamiento de muestras de cerveza para la detección de azúcares.

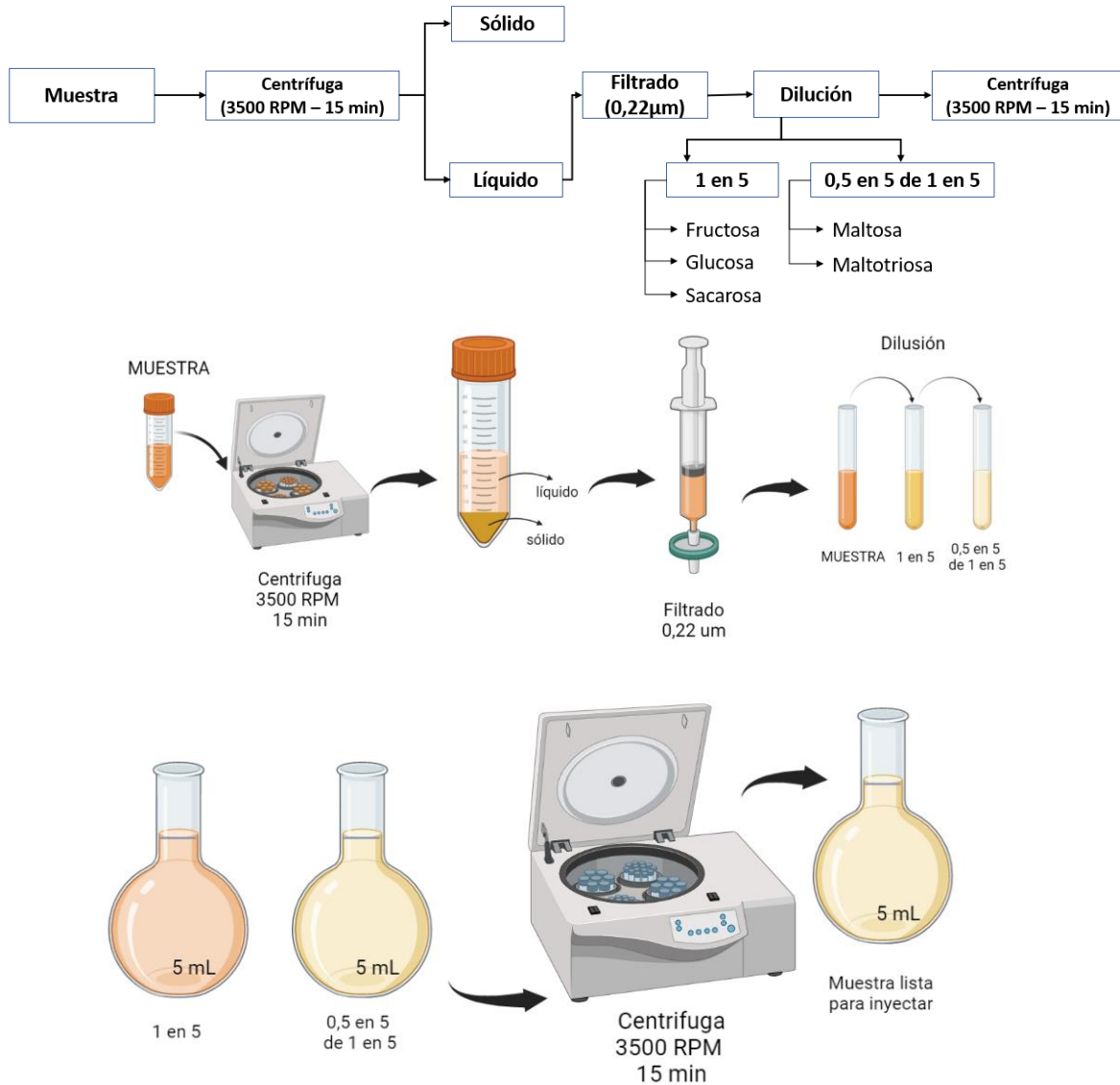


Figura 16 Diagrama Pretratamiento de muestra. Fuente: Elaboración propia

Cabe destacar que, si la muestra es un producto ya fermentado y por ende presenta dióxido de carbono, debe ser sonicada antes de inyectar en el HPLC ya que la presencia de burbujas en el sistema genera errores en las lecturas y mediciones del equipo, además del deterioro de este.

### 3.1.1.2 Optimización de metodología HPLC-UV para detección de ácidos orgánicos.

#### 3.1.1.2.1 Materiales e Instrumentos

A continuación, se listan los materiales utilizados en cada una de las etapas del proceso de análisis cromatográfico de las muestras de cerveza:

##### Para análisis:

- HPLC-UV: Bomba, autosampler, compartimiento de la columna y detector de longitud de onda múltiple, UltiMate 3000.
- Fase estacionaria: Columna Aminex HPX-87H 300 mm x 7,8 mm 9 µm de diámetro de partícula, (Bio-Rad).
- Fase móvil: Ácido Sulfúrico 0,005 M (PA,95-97%, Merck) agua ultrapura (utilizando el purificador de agua MILLIPORE Simplicity)
- Ultrasonido (*Ultrasonic Cleaner Single Frequency Type*, BIOBASE), para sonicar previo a cada análisis todos los solventes a utilizar para evitar las burbujas en el sistema cromatográfico, ya que la presencia de éstas puede causar daños en el equipo y errores en las mediciones.

##### Para preparación de estándares:

- Estándares PA:
  - Ácido Acético: Ácido Acético 100% (SIGMA-ALDRICH)
  - Ácido Láctico: L-(+)-Ácido Láctico 98% (SIGMA-ALDRICH)
  - Ácido Málico: DL-Ácido Málico (pureza no especificada) (Merck)
  - Ácido Tartárico: L(+) Ácido Tartárico AR 99,75% (CDH)
- Solvente: Ácido Sulfúrico (PA, Merck) y Agua ultrapura.
- Balanza analítica para pesar los mg de soluto necesarios.
- Matraces aforados de 5 ml para preparar la solución.
- Gotero para el aforo del matraz con fase móvil.
- Agitador (*Vortex Mixer*, FAITHFUL) para homogeneizar la mezcla.

##### Para el pretratamiento de la muestra:

- Muestra de cerveza
- Tubos Falcon para colocar las muestras y llevar a la centrifuga.
- Centrifuga para lograr separar la posible borra presente de la muestra líquida.
- Filtros 0,22 µm (Membrana MCE, JET BIOFIL) para eliminar las pequeñas partículas de sólido que puedan estar suspendidas en la muestra y obtener una muestra limpia.
- Jeringa plástica desechable para impulsar el líquido a través del filtro de 0,22 µm.
- Matraz aforado de 5 mL para realizar las disoluciones de la muestra.
- Micropipeta y puntas correspondientes para las diluciones.

#### 3.1.1.2.2 Preparación de fase móvil

Debido a que se adapta a los requerimientos del sistema, se opta por trabajar Ácido Sulfúrico 0,005 M en agua ultrapura como fase móvil.

Antes de iniciar el equipo se debe asegurar de sonicar ambas fases móviles para evitar burbujas en el sistema, este proceso fue realizado en el ultrasonido durante 15 minutos cada solvente.

Para la preparación de la fase móvil se utiliza Ácido Sulfúrico PA y agua ultrapura para alcanzar la concentración requerida para el análisis.

Para obtener un volumen de 500 mL de solución se aplicó el siguiente cálculo:

$$500 \text{ mL solución } H_2SO_4 * \frac{0,005 \text{ mol } H_2SO_4}{1000 \text{ mL solución } H_2SO_4} * \frac{98 \text{ g } H_2SO_4}{1 \text{ mol } H_2SO_4} * \frac{1 \text{ mL solución } H_2SO_4}{1,83 \text{ g } H_2SO_4} * \frac{100 \text{ mL solución } H_2SO_4}{97 \text{ mL } H_2SO_4} = 0,0690 \text{ mL} = 69\mu\text{L}$$

Debido a que esta solución se debe preparar tanto para la disolución de la muestra, como para la preparación de estándares y para utilizar como fase móvil en el análisis se requiere preparar la solución en diferentes volúmenes. Para esto solo de debe reemplazar el volumen deseado de la solución en la ecuación y se obtendrá la cantidad de Ácido Sulfúrico puro que se debe aforar con agua ultrapura para obtener la solución a una concentración de 0,005 M.

#### 3.1.1.2.3 Preparación de estándares

La fase móvil con la que se aforan los matraces para la preparación de los estándares Ácido Sulfúrico al 0,005 M, por las razones antes mencionadas.

Para este caso los estándares fueron realizados en matraces aforados de 5 mL variando los gramos de soluto dependiendo de la concentración elegida. Se prepararon estándares de 5, 25, 50, 250, 500 y 1000 ppm.

Inicialmente se prepara un matraz madre de 5000 ppm en un matraz aforado de 25 mL, donde se pesan los gramos requeridos de analito y luego se afora con agua ultrapura. Posteriormente, del estándar madre se tomarán las alícuotas para la preparación de los estándares más diluidos del rango de concentraciones antes mencionado.

En la Tabla 5 a continuación se detalla la pureza de los analitos utilizados, los gramos de analito requeridos para obtener el estándar de 5000 ppm considerando dicha pureza y los gramos pesados por ácido orgánico para la preparación del estándar madre.

Tabla 5 Pureza, gramos requeridos y gramos pesados por cada ácido orgánico

| Ácido Orgánico  | Pureza | Gramos requeridos | Gramos pesados |
|-----------------|--------|-------------------|----------------|
| Ácido Acético   | 100 %  | 0,1250            | 0,1250         |
| Ácido Láctico   | 98%    | 0,1276            | 0,1282         |
| Ácido Málico    | N. E   | 0,1250            | 0,1258         |
| Ácido Tartárico | 99,75% | 0,1253            | 0,1256         |

\*N. E = No especificada

Cabe destacar que el ácido acético se encuentra en estado líquido por lo que se le aplica la siguiente conversión:

$$125 \text{ mg} * \frac{1 \text{ cm}^3}{1,206 \text{ g}} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,1036 \text{ cm}^3 = 103,65 \mu\text{L}$$

En la Figura 14 se ilustra el proceso de preparación del estándar madre de 5000 ppm.

Como se menciona anteriormente, posterior a la preparación del estándar madre se toma una alícuota determinada para obtener cada uno de los estándares más diluidos. En la tabla a continuación se presentan las alícuotas extraídas del estándar madre para obtener cada uno de los estándares del rango de trabajo.

*Tabla 6 Concentración de estándar y alícuota extraída de estándar madre.*

| Concentración del estándar (Y) | Alícuota extraída (X) |
|--------------------------------|-----------------------|
| 5 ppm                          | 5 uL                  |
| 25 ppm                         | 25 uL                 |
| 50 ppm                         | 50 uL                 |
| 250 ppm                        | 250 uL                |
| 500 ppm                        | 500 uL                |
| 1000 ppm                       | 1000 uL               |

En la Figura 15 se ilustra la preparación de todos los estándares del rango de trabajo seleccionado.

#### 3.1.1.2.4 Pretratamiento de la muestra

Las muestras son extraídas del mismo mosto en los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9, esto para los dos distintos tipos de cerveza a estudiar.

- 1) Inicialmente la muestra es retirada del congelador y se deja fuera hasta que alcance una temperatura ambiente.
- 2) Posteriormente se centrifuga a 3500 RPM durante 15 minutos para que decante la borra presente en la muestra, que puede corresponder a levadura o lúpulo.
- 3) Luego de esto se procede a filtrar el líquido con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  situado en una jeringa como se muestra en la Figura 16, esto para eliminar las pequeñas partículas sobrenadantes que pueda tener el mosto.
- 4) A continuación, la muestra es diluida en fase móvil con la finalidad de no saturar la columna con los compuestos que presenta la cerveza. La dilución óptima en este caso para cuantificar los ácidos orgánicos presentes en la muestra es de 0,5 mL de muestra aforado a 5 mL con fase móvil (se pipetea 0,5 ml de la muestra en un matraz aforado de 5 mL y se afora con fase móvil correspondiente a ácido sulfúrico 0,005 M).

Cabe destacar que, si la muestra es un producto ya fermentado y por ende presenta dióxido de carbono, debe ser sonicada antes de inyectar en el HPLC ya que la presencia de burbujas en el sistema genera errores en las lecturas y mediciones del equipo, además del deterioro de este.

En la Figura 17 se ilustra el proceso de pretratamiento de muestras de cerveza para la detección de ácidos orgánicos.

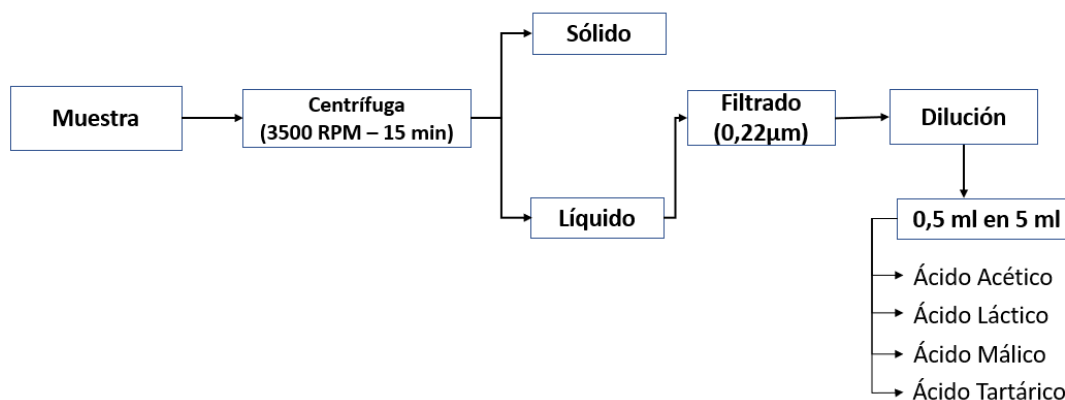


Figura 17 Diagrama pretratamiento de muestra

### 3.1.2 Cromatografía de Gases

#### 3.1.2.1 Optimización de metodología GC – FID para determinación de Etanol

##### 3.1.2.1.1 Materiales e Instrumentos

A continuación, se listan los materiales utilizados en cada una de las etapas del proceso de detección de Etanol en las muestras de cerveza:

##### Para análisis:

- GC-FID: Cromatógrafo de gases acoplado a detector de ionización de llama, HP 5890 SERIES II.
- Fase estacionaria: Columna capilar 007-624, Cyanopropylphenyl Methylpolysiloxane 60m (L) x 0.25mm (ID) x 1.4µm espesor de película, QUADREX.
- Gas portador: Nitrógeno, hidrógeno y aire sintético.
- Jeringa para cromatografía de gases: *Gastight Samplelock* 500 µL o 1 mL (Incorpora una válvula de jeringa On/Off con una aguja RN. Esta terminación se usa para el espacio del cabezal, la recolección y almacenamiento de muestras ambientales y el ensamblaje de muestras)
- Aguja para microjeringa: Aguja intercambiable ajustada al cero de la escala de la jeringa. Autoclavable cuando se desmonta. Punta cónica con orificio lateral.
- Liner de copa para inyección Splitless
- Septum 11 [m]
- Cronómetro, ya que al ser inyecciones manuales se debe cronometrar los tiempos de inyección.

##### Para Headspace:

- Viales de vidrio 20 ml para Headspace
- Tapas de crimpado 20 mm
- Crimpadora de viales
- Manta termoregulada con agitación.

- Cristalizador
- Agua destilada
- Soporte universal
- Termómetro
- Agitador magnético grande y pequeño

Para preparación de estándares:

- Estándares pa:
  - Etanol: Etanol 100% (Supelco)
- Pipeta graduada
- Propipeta
- Agua ultrapura
- Cloruro de Sodio PA
- Metanol PA
- Embudo de vidrio
- Espátula de laboratorio
- Agitador (*Vortex Mixer*, FAITHFUL) para homogeneizar la mezcla.

Para el pretratamiento de la muestra:

- Muestra de cerveza
- Filtros 0,22  $\mu\text{m}$  (Membrana MCE, JET BIOFIL)
- Jeringa plástica desechable para impulsar el líquido a través del filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.2.1.2 Preparación de fase móvil

En este sistema se trabaja con gas auxiliar (Hidrógeno y aire) y gas que pasa por la columna (Nitrógeno), éstos se ajustan a 30,400 y 30 mL/min respectivamente. Para configurar la presión de cabeza de columna se utiliza el programa *Restek EZGC Method Translator and Flow Calculator*, dependiendo de las características de la columna como el largo, diámetro interno, grosor de película y temperatura del sistema.

#### 3.1.2.1.3 Preparación de estándares

Ya que se implementa el método de extracción Headspace para la detección de alcohol en la muestra de cerveza, se utiliza el mismo método para la realización de estándares.

Los estándares fueron preparados pipeteando 10 mL de agua ultrapura en los viales de 20 mL y añadiendo 1 gramo de Cloruro de sodio, que actúa como agente extractor al favorecer la volatilización de los alcoholes de la muestra, y la cantidad determinada de etanol conocida. Adicionalmente se agregan 200  $\mu\text{L}$  de Metanol a la solución, este actúa como estándar de corrección para tener una mayor precisión en la cuantificación de Etanol en la muestra.

El rango de concentraciones empleado para los estándares fue seleccionado basándose en la concentración de alcohol promedio de las cervezas artesanales, por este motivo la concentración es

medida en grados %APV (alcohol por volumen) o %v/v. Se prepararon estándares de 5%, 2,5%, 1,25%, 0,63% y 0,31%.

En la Tabla 7 a continuación se detalla el volumen de etanol utilizado para obtener las distintas concentraciones de alcohol en los estándares realizados.

*Tabla 7 Microlitos de etanol necesarios para cada concentración de estandar*

| Concentración de Etanol en STD | Microlitros de etanol pipeteados |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 5% v/v                         | 500 µL                           |
| 2,5% v/v                       | 250 µL                           |
| 1,25% v/v                      | 125 µL                           |
| 0,63% v/v                      | 62,5 µL                          |
| 0,31% v/v                      | 31,25 µL                         |

#### 3.1.2.1.4 Pretratamiento de la muestra

Las muestras son extraídas del mismo mosto en los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9, esto para los dos distintos tipos de cerveza a estudiar.

- 1) La muestra es retirada del congelador y se deja fuera hasta que alcance una temperatura ambiente.
- 2) La muestra líquida es filtrada con un filtro de 0,22 µm situado en una jeringa como se muestra en la figura 23, esto para eliminar la levadura remanente en la muestra y de esta manera inhibir la fermentación ya que las muestras serán sometidas a altas temperaturas posteriormente.
- 3) Se pipetea 5 mL de muestra, se afora a 10 mL con agua ultrapura y se colocan en el vial de 20 mL.
- 4) A la solución se le añade 1 g de Cloruro de Sodio y 200 µL de Metanol.
- 5) Se introduce al vial el agitador magnético pequeño y se cierra con la tapa crimpado.

Posterior a esto se implementa el método Headspace para obtener la muestra gaseosa que será inyectada al cromatógrafo de gases.

La configuración del sistema se puede observar en la Figura 18 a continuación:



Figura 18 Configuración sistema Headspace

El sistema consiste en colocar un cristalizador con agua destilada y un agitador magnético sobre una manta termorregulada y con agitación. Sumergida dentro del recipiente se encuentra el vial con la muestra sujetado con la ayuda de una pinza y un soporte universal. En este soporte también se posiciona un termómetro para monitorear la temperatura del baño en todo momento. Dentro del vial se inserta un agitador magnético pequeño que, gracias al agitador que se encuentra en el cristalizador, es capaz de agitar la muestra que se encuentra dentro del vial para así favorecer la volatilización del alcohol.

### 3.1.2.2 Optimización de metodología GC/ MS para detección de compuestos volátiles

#### 3.1.2.2.1 Materiales e Instrumentos

A continuación, se listan los materiales utilizados en cada una de las etapas del proceso de detección de compuestos volátiles en las muestras de cerveza:

#### Para análisis:

- GC/MS: Cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas, HP 5973 *Mass Selective Detector*.
- Fase estacionaria: Columna capilar 007-624, Cyanopropylphenyl Methylpolysiloxane 60m (L) x 0.25mm (ID) x 1.4µm espesor de película, QUADREX.
- Gas portador: Helio.
- Jeringa para cromatografía de gases: *Gastight Samplelock* 500 µL o 1 mL (Incorpora una válvula de jeringa On/Off con una aguja RN. Esta terminación se usa para el espacio del cabezal, la recolección y almacenamiento de muestras ambientales y el ensamblaje de muestras)
- Aguja para microjeringa: Aguja intercambiable ajustada al cero de la escala de la jeringa. Autoclavable cuando se desmonta. Punta cónica con orificio lateral.

- *Liner* de copa para inyección *Splitless*
- Septum 11 [m]
- Cronómetro, ya que al ser inyecciones manuales se debe cronometrar los tiempos de inyección.

#### Para *Headspace*:

- Viales de vidrio 20 ml para *Headspace*
- Tapas de crimpado 20 mm
- Crimpadora de viales
- Manta termoregulada con agitación.
- Cristalizador
- Agua destilada
- Soporte universal
- Termómetro
- Agitador magnético grande y pequeño

#### Para el pretratamiento de la muestra:

- Muestra de cerveza
- Filtros 0,22  $\mu\text{m}$  (Membrana MCE, JET BIOFIL)
- Jeringa plástica desechable para impulsar el líquido a través del filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.2.2.2 Preparación de fase móvil

La fase móvil implementada para este estudio con cromatografía de gases acoplada a detector de masas es el gas inerte Helio. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito, sino que su función es transportar el analito a través de la columna. Por lo antes mencionado, la fase móvil no requiere preparación previa.

#### 3.1.2.2.3 Preparación de estándares

Al utilizar un detector de masas no se requiere de estándares ya que el sistema cuenta con una base de datos capaz de identificar el analito presente en la muestra inyectada.

Los espectros de masas proporcionan mucha información sobre la estructura de los compuestos analizados. Además de las posibilidades de identificación ya mencionadas por comparación de los espectros obtenidos con los existentes en la base de datos, entregando un listado de los analitos con espectro de masas similares y su porcentaje de similitud para tomar decisiones respecto a la identificación del analito estudiado.

#### 3.1.2.2.4 Pretratamiento de la muestra

Para la detección de compuestos volátiles en la muestra se implementa el método de extracción por *Headspace* por lo que el tratamiento de la muestra es igual que para el caso de detección de alcoholes descrita en la sección anterior.

### 3.1.3 Validación del método cromatográfico, determinación de parámetros analíticos

Para demostrar que un procedimiento analítico es idóneo para la cuantificación de un analito en una matriz dada, en un rango de concentración apropiado (intervalo de la curva de calibración) es necesario determinar variables que delimiten la fiabilidad del método y cuya sensibilidad nos permite definir el mínimo nivel de cuantificación, al cual es posible obtener una precisión, exactitud e incertidumbre entre otros.

Cuando las mediciones se realizan a concentraciones bajas, es importante conocer la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado. El límite de detección de un analito corresponde a aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Entonces el límite de detección se define como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $y_B$ , más 3 veces la desviación estándar del blanco,  $s_B$ . (Miller & Miller, 2002)

$$\text{Límite de detección} = y_B + 3s_B$$

Adicionalmente es importante establecer el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica. El límite de cuantificación de un método analítico es la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar bajo las condiciones experimentales descritas para dicho método. Se calcula con la siguiente fórmula que relaciona la desviación estándar del blanco ( $s_B$ ) y la pendiente de la recta ( $m$ ):

$$\text{Límite de cuantificación} = 10 \frac{s_B}{m}$$

## 3.2 Desarrollo de Fermentaciones

Se realizaron fermentaciones monocultivo en reactores de volumen 500 ml, en triplicado. La temperatura utilizada fue de 30°C y 100 rpm de agitación. Las levaduras utilizadas fueron *Saccharomyces Cerevisiae* (Safale US-05) como control, del proveedor *Fermentis*, y la levadura no *Saccharomyces* evaluada correspondió a *Candida Oleophila* proveniente de la librería de microorganismos UTFSM-PUC.

A continuación, se describen el medio de cultivo, inóculo, monitoreo de fermentaciones y algunas consideraciones para interpretar los resultados obtenidos de las mediciones:

### 3.2.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado se preparó disolviendo 100 g/L de extracto de malta y 10 g/L de extracto de levadura en agua desmineralizada. Se dejó la solución en un autoclave, en donde se esterilizó durante 15 minutos a 121°C. Una vez terminado el ciclo de esterilización, se adicionaron 2 g/L de lúpulo Cascade (8,1% AA) a la solución estéril y se llevó la mezcla nuevamente al autoclave, durante

30 minutos a una temperatura de 100°C, para así poder isomerizar los alfa-ácidos (AA) contenidos y generar un equivalente a 40 IBU.

Se enfrió la solución hasta alcanzar 30°C y se vertió a matraces de 500 ml bajo condiciones de esterilidad (Desinfección de mesones y uso de mecheros), agregando la cantidad de inóculo necesario para obtener una concentración equivalente de 10<sup>6</sup> células/ml en cada matraz de 500 ml. La preparación del inóculo de levadura se detalla en la sección 5.1.2

Una vez agregada la levadura, se homogeneizó la solución y se tomaron muestras los días 0,1,3,5,7 y así sucesivamente, hasta que la densidad se hizo constante durante al menos dos mediciones sucesivas.

### 3.2.2 Inóculo

Para el inóculo de ambas levaduras se realizó el mismo procedimiento: Se preparó medio Saboraud Dextrose Broth (SDBroth) y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se enfrió la solución hasta 30°C-35°C y se vertió en tubos Falcon estériles de 50 ml. Se agregaron 5 colonias de levadura por cada 10-15 ml de medio estéril. Se dejaron los tubos Falcon en una incubadora con agitación, a 100 rpm y 30°C, durante 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, para poder separar la levadura del medio de cultivo, se llevó la solución con levadura a 6000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se mezcló la levadura precipitada con agua peptonada al 1% estéril. Se homogeneizó la mezcla y se realizó conteo celular en el microscopio, con el método de azul de metileno, para poder así, verificar las células viables presentes en la solución.

Se debe asegurar un inóculo de al menos 10<sup>6</sup> cel/ml para lograr un inicio robusto y rápido en el proceso de fermentación, lo que es crucial para obtener resultados consistentes y eficientes.

### 3.2.3 Monitoreo de fermentaciones

La fermentación será monitoreada mediante el seguimiento de variables claves que permiten conocer su evolución. Estas son densidad, sólidos solubles, densidad óptica y conteo celular.

#### 3.2.3.1 Densidad

##### 3.2.3.1.1 Materiales

- Picnómetro.
- Balanza digital con precisión de 0,001 g o 0,01 g.

##### 3.2.3.1.2 Procedimiento

1. Se registra la masa del picnómetro seco y vacío.
2. Se llena el picnómetro con muestra, se limpia y seca el exterior y se registra la masa.
3. La densidad de la muestra se obtiene a partir de la siguiente expresión.

$$\rho_{muestra} = \frac{(masa_{picnómetro+muestra} - masa_{picnómetro})[g]}{volumen_{picnómetro}[ml]} = \frac{masa_{mosto}[g]}{volumen_{mosto}[ml]}$$

### 3.2.3.2 *Sólidos solubles (°Brix)*

#### 3.2.3.2.1 Materiales

- Refractómetro.
- Gotario.
- Agua destilada.

#### 3.2.3.2.2 Procedimiento

1. Se calibra el refractómetro con agua destilada.
2. Se lleva la muestra a una temperatura aproximada de 20°C y se agita para homogeneizar la solución.
3. Se toma una muestra con el gotario, se le ubica en el prisma del refractómetro limpio, se presiona la opción “Read” y se registra el valor. Este valor se entrega en % sólidos solubles o °Brix.
4. Se repite nuevamente el procedimiento anterior, para obtener al menos dos registros sucesivos.

### 3.2.3.3 *Densidad óptica*

#### 3.2.3.3.1 Materiales

- Espectrofotómetro.
- Celdas de paso óptico 1 cm.
- Papel Tissue.

#### 3.2.3.3.2 Procedimiento

1. Se enciende el espectrofotómetro.
2. Se agrega la solución a medir en una celda limpia y se mide su absorbancia a 600 nm, utilizando un blanco de agua desmineralizada. Si la absorbancia excede un valor de 1, realizar la dilución correspondiente a la muestra, para que así se encuentre en el rango de linealidad.

### 3.2.3.4 *Conteo celular*

#### 3.2.3.4.1 Materiales

- Microscopio óptico.
- Azul de metileno.
- Agua destilada.
- Vortex.
- Cámara Neubauer.
- Cubre objetos.

#### 3.2.3.4.2 Procedimiento

1. Preparar el microscopio óptico con la cámara fotográfica.
2. Se diluye el medio según corresponda.
3. Preparar una solución con la muestra que se medirá en tubo Eppendorf, agregando 0,25 mL de azul de metileno, 0,25 mL de agua destilada y 0,5 mL de la solución preparada en el punto anterior.
4. Agitar vigorosamente la muestra por medio de Vortex.

5. El cubreobjetos se coloca sobre la cámara Neubauer y se adicionan 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla agitada en el punto anterior por medio de una pipeta en un borde del cubreobjetos (acción capilar llena la cámara).
6. Se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio y se contabilizan las células totales de 5 cuadrados de la zona central (se detalle en el protocolo su identificación).
7. La concentración celular viene dada por la siguiente relación:

$$\left[ \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right] = f \cdot N \cdot 10^5 = \frac{N \cdot 10^5}{\text{dilución}}$$

Donde N corresponde al total de células contadas en los 5 cuadrados y f al factor de dilución empleado en la muestra.

A continuación, se detallará el uso de la cámara Neubauer para la determinación de la concentración celular de una muestra.

Para el conteo de células viables, se usará una cámara Neubauer para levaduras. Esta cámara posee dos zonas cuadriculadas, por lo que se pueden realizar hasta dos conteos por unidad de cámara, tal como se muestra en la Figura 19:

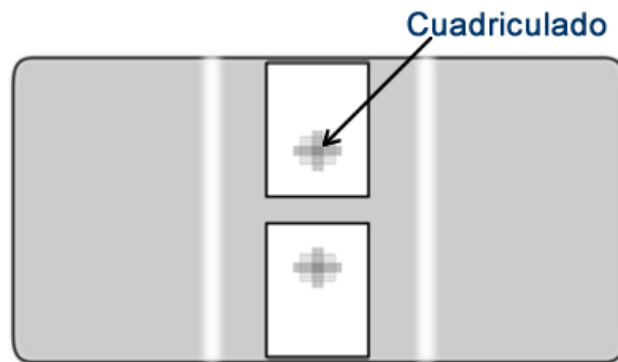


Figura 19 Esquema de la cámara de Neubauer, indicando la zona de cuadrícula.

Esta sección está a exactamente 0.1 mm más bajo que las secciones laterales, estableciendo un volumen fijo una vez colocado el cubreobjetos especial (cubre hematocímetro), lo que se ve esquematizado en la Figura 20:

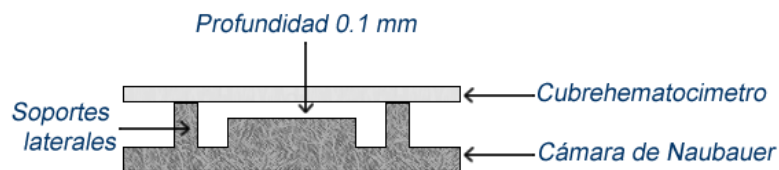


Figura 20 Esquema que indica la profundidad de la cámara de Neubauer.

Al observar al microscopio la sección central, podremos identificar un cuadrado de tres por tres, que en conjunto mide 9  $\text{mm}^2$ . Esta cámara de conteo posee un cuadrado de 1 [mm] por lado, y en su sección central está dividido en 25 cuadrados, y cada uno subdividido en 16 cuadrados más pequeños.

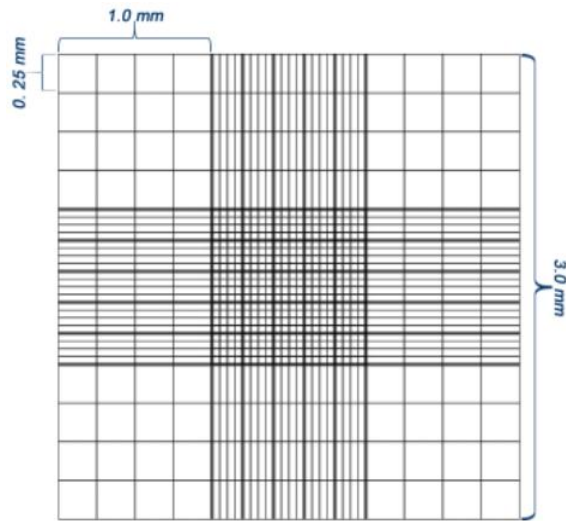


Figura 21 Dimensiones de una cámara de Neubauer, y vista superior de sección de conteo celular.

En esta cuadrícula podemos localizar los cuadrantes que están en los extremos, cada uno de ellos dividido a su vez en un conjunto de  $4 \times 4$ , representados por la letra A en la Figura 22. En la parte central se aprecia un cuadro central de  $1 \times 1$  mm dividido en 25 cuadrantes de  $0.2 \times 0.2$  mm, delimitado por un recuadro e indicado por una flecha en la Figura 22.

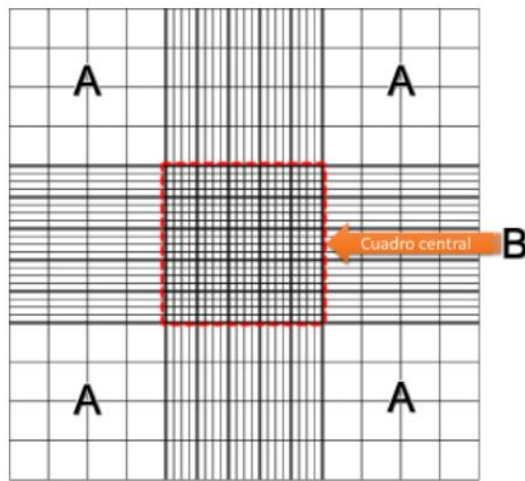


Figura 22 Secciones de una cámara de Neubauer.

El cuadro central, al observarlo a mayor aumento, vemos que cada cuadro de esos cinco limitados por una triple línea, están constituidos a su vez por un conjunto de  $4 \times 4$ . De estos 5 cuadros se utilizan de manera rutinaria los cuatro conjuntos de los extremos y el central, tal como se presenta en la Figura 23.

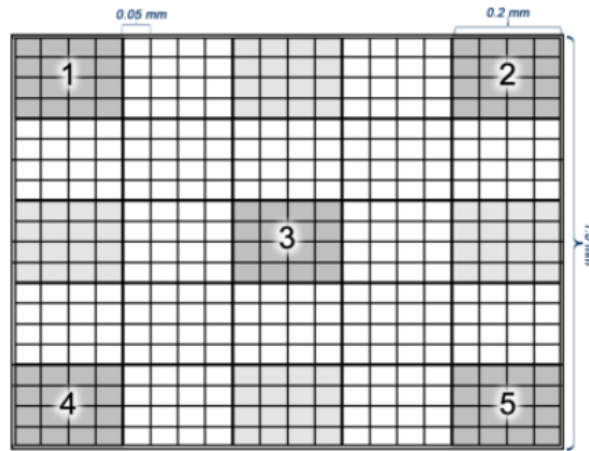


Figura 23 Cuadrícula central de la cámara, indicando los conjuntos utilizados y sus dimensiones.

De lo anterior, se desprende que la concentración celular se obtiene de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left[ \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right] = \frac{N}{0,1[\text{mm}] \cdot 1,0[\text{mm}] \cdot 0,2[\text{mm}] \cdot 10^{-3} \left[ \frac{\text{mL}}{\text{mm}} \right]} = \frac{N \cdot 10^5}{2,0}$$

Considerando la dilución realizada y la relación con azul de metileno, se desprende:

$$\left[ \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right] = \frac{2 \cdot f \cdot N \cdot 10^5}{2,0} = \frac{2 \cdot N \cdot 10^5}{2,0 \cdot \text{dilución}}$$

$$\left[ \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right] = f \cdot N \cdot 10^5 = \frac{N \cdot 10^5}{\text{dilución}}$$

Donde N corresponde al total de células contadas en los 5 cuadrados y f al factor de dilución empleado en la muestra. Cabe destacar que el factor multiplicado de 2 surge de la dilución con azul de metileno (0,25 mL de azul de metileno, 0,25 mL de agua destilada y 0,5 mL de muestra).

NOTA: Si así se requiere, es posible contar otras zonas (ej: A en Figura 22). Es importante ajustar la formula según corresponda.

Algunas de las consideraciones generales para la determinación de la concentración celular son las siguientes:

- Por convención, las aglomeraciones de levaduras en donde no se distinga la cantidad de éstas, son contabilizadas como una unidad.
- Las levaduras en gemación son contabilizadas como una unidad.

- Por convención, las células que quedan retenidas en la línea sólo son contabilizadas si el contacto es en las líneas superior y derecha. Las células que se encuentran retenidas en las líneas izquierda e inferior no se contabilizan, con el objetivo de no contarlas por duplicado. En la Figura 24, se esquematiza esta convención, contabilizando para el cuadrado central sólo las levaduras en color verde:

Figura 24 Esquema de la convención de levaduras a contabilizar retenidas en la línea.

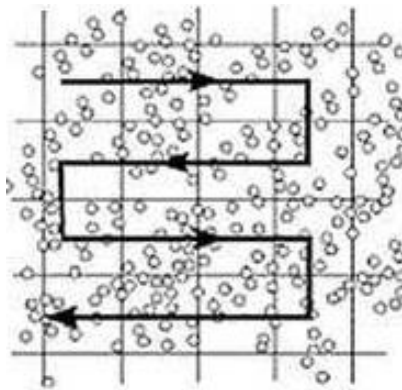


*Figura 25 Sugerencia en la dirección del conteo de levaduras por cuadrado tipo B.*

Con respecto a los resultados que se esperan del monitoreo de la fermentación mediante la medición de los parámetros antes mencionados, se estudia la evolución de la fermentación mediante la verificación de consumo por parte de las levaduras.

Los grados Brix son una medida indirecta para medir azúcares al igual que densidad, debe tener un comportamiento muy parecido al de la densidad en el resultado de las mediciones.

Con respecto a la densidad óptica, es una medida indirecta al crecimiento de la biomasa, entonces debería ir aumentando en el tiempo y debería ser similar a una curva de crecimiento exponencial.

Por otro lado, en el estudio del conteo celular debe cumplirse una curva tipo crecimiento exponencial donde ya al terminar la fermentación debería ser o la fase estacionaria o la fase de muerte.

Estas mediciones corresponden a una medida indirecta para determinar el consumo de los azúcares y ver que la fermentación está efectivamente.

### 3.3 Análisis de la muestra

Posterior a la optimización de la metodología, se utilizan los métodos para el análisis de muestras de cerveza y determinación del perfil químico y volátil de las muestras.

La frecuencia de muestreo fue los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9 del proceso de fermentación, iniciando con una muestra del día de producción, o día 0 de proceso fermentativo y terminando con una muestra del producto final el día 9 del proceso fermentativo, incluyendo también muestras obtenidas los días intermedios de la fermentación del producto, de esta manera se logra monitorear el proceso de fermentación.

Para el análisis se midieron muestras de tres matraces distintos de la misma fermentación (día y cepa de levadura) en las mismas condiciones, es decir, un análisis en triplicado, y para cada uno de éstos se realizó un duplicado de detección.

### 3.4 Cuantificación de Analitos

#### 3.4.1 Curva de Calibración

Luego de optimizado el método cromatográfico bajo el cual van a ser inyectadas las muestras en estudio al sistema, se realiza la curva de calibración para cada método.

Esto se realiza para poder conocer la concentración de los analitos en la muestra y así poder generar el perfil químico a través de la identificación y cuantificación de los compuestos químicos presentes en la muestra de cerveza.

Para realizar la curva de calibración se realizan los siguientes pasos:

1. Preparación de las soluciones estándar: Se prepara una serie de soluciones estándar con concentraciones conocidas del analito que se desea cuantificar. Estas soluciones deben abarcar un rango de concentraciones que sea relevante para las muestras desconocidas, esto con la finalidad de generar un rango de concentraciones entre los cuales se cuantifica la muestra que se analiza.
2. Inyección de las soluciones: Posteriormente, se inyecta secuencialmente cada una de estas mezclas de estándares a concentración conocida bajo las mismas condiciones cromatográficas que serán utilizadas para detectar los analitos en las muestras a estudiar.

3. Construcción de la curva: La curva de calibración es la representación gráfica que relaciona una señal instrumental en función de la concentración de un analito, donde el eje x corresponde a la concentración en la solución estándar y el eje y la respuesta cromatográfica que puede ser el área o la altura del pico como se observa en la Figura 26.

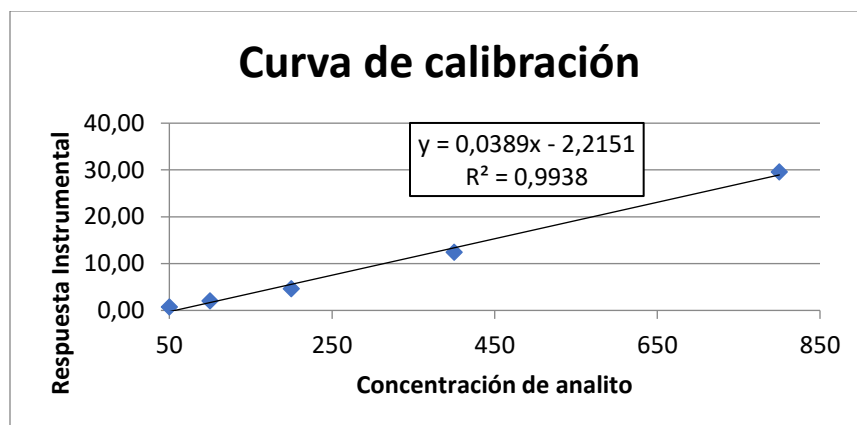


Figura 26 Curva de calibración.

En la gráfica se traza una línea de regresión lineal y se extrae la ecuación de la recta que corresponde a una interpolación de la señal instrumental con la que se podrá obtener la concentración del analito en la muestra y el coeficiente  $R^2$  que permite justificar la linealidad del sistema, para lo que debe ser mayor a 0,995.

4. Análisis de las muestras de interés: Se utiliza la curva de calibración para determinar la concentración de los analitos en la muestra. Se inyectan las muestras en el sistema cromatográfico y se registra la respuesta obtenida en el cromatograma. Con el valor de altura o área obtenida se utiliza la curva de calibración para interpolar la concentración del analito.

## 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Implementación y Optimización de metodología HPLC

#### 4.1.1 Determinación de azúcares

Se inició el proceso de optimización en base a las siguientes condiciones cromatográficas:

*Tabla 8 Parámetros operacionales iniciales para ELSD*

| Parámetro                             | Valor                                   |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| Fase Móvil                            | Acetonitrilo: Agua (85%:15%) Isocrático |
| Flujo fase móvil                      | 1 ml/min                                |
| Volumen de inyección                  | 20 $\mu$ L                              |
| Temperatura de la columna             | 30°C                                    |
| Temperatura del tubo de deriva        | 60°C                                    |
| Temperatura Nebulizador               | COOL                                    |
| Presión gas transportador (Nitrógeno) | 40 psi                                  |
| Gain                                  | 70                                      |

Al realizar el análisis con los parámetros detallados en la Tabla 9 se obtuvo el siguiente cromatograma:

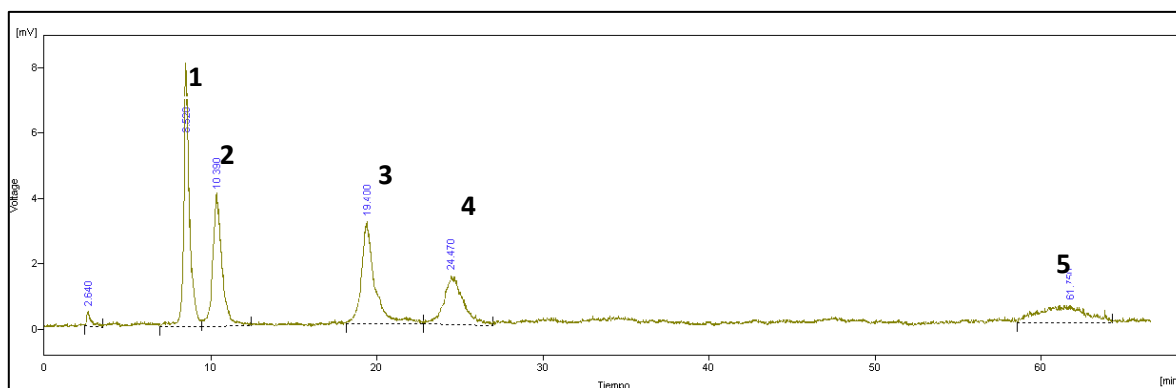


*Figura 27 Cromatograma Detección de Azúcares Elución Isocrática por HPLC-ELSD*

En la Figura 27 se puede observar en orden la elución de (1) fructosa ( $t_R$  8,52 min), (2) glucosa ( $t_R$  10,39 min), (3) sacarosa ( $t_R$  19,40 min), (4) maltosa ( $t_R$  24,47 min) y (5) maltotriosa ( $t_R$  61,79 min).

El tiempo de retención de cada uno de los analitos se obtuvo mediante el análisis individual de cada uno de ellos previo al análisis de la mezcla de analitos. El cromatograma corresponde a los resultados del análisis de una mezcla de 100 ppm.

Al trabajar con elución isocrática se evidencia un largo tiempo de análisis y se inicia las iteraciones de experimentos para disminuir este tiempo con la implementación de elución en gradiente, es decir, modificar a lo largo del tiempo la composición de la fase móvil que pasa por la columna. Adicionalmente se observa que se debe mejorar la definición de los últimos picos en eluir.

A partir de esto se trabaja en formular un gradiente optimo, es decir, que logre la elución de todos los componentes sin presentar solapamiento entre ellos y con una separación razonable, adicionalmente obtener unos picos bien definidos.

Analizando la afinidad que presentan los analitos tanto con la fase móvil como con la fase estacionaria, de los resultados obtenidos se puede observar que la maltotriosa es el último analito en eluir por lo que tiene una mayor afinidad con la fase estacionaria.

La fase estacionaria utilizada corresponde a una columna de enlaces amino, los metabolitos polares con grupos funcionales polares interactuarán con mayor afinidad con los grupos amino en la fase estacionaria, lo que resultará en una mayor retención, como es el caso de la maltotriosa que tiene una mayor cantidad de grupos hidroxilo. La presencia de agua disminuye la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre los analitos y la fase estacionaria, por esto se necesita un mayor porcentaje de agua en la fase móvil para eluir con mayor facilidad los analitos que forman enlaces de hidrógeno más fuertes con la fase estacionaria.

Por lo anterior se hacen diversas pruebas con la finalidad de acotar el tiempo de elución de la mezcla de analitos. Dichas pruebas se realizaron modificando la composición de la fase móvil en diferentes proporciones, principalmente incrementando la cantidad de agua en el solvente y manteniendo todos los otros parámetros operativos.

Se realizan diversas iteraciones hasta llegar al siguiente gradiente de fase móvil:

*Tabla 9 Gradiente Fase Móvil*

|                    |                |         |
|--------------------|----------------|---------|
| Acetonitrilo: Agua | En el minuto 0 | (85:15) |
|                    | Al minuto 8    | (80:20) |
|                    | Al minuto 19   | (75:25) |
|                    | Al minuto 30   | (85:15) |

Con el experimento realizado utilizando el gradiente de la Tabla 9 se obtuvo el cromatograma de la Figura 28. Cabe destacar que para esta inyección solo se modificó el valor de la proporción de la fase móvil y se mantuvo los otros parámetros operativos como se indica en la Tabla 8.

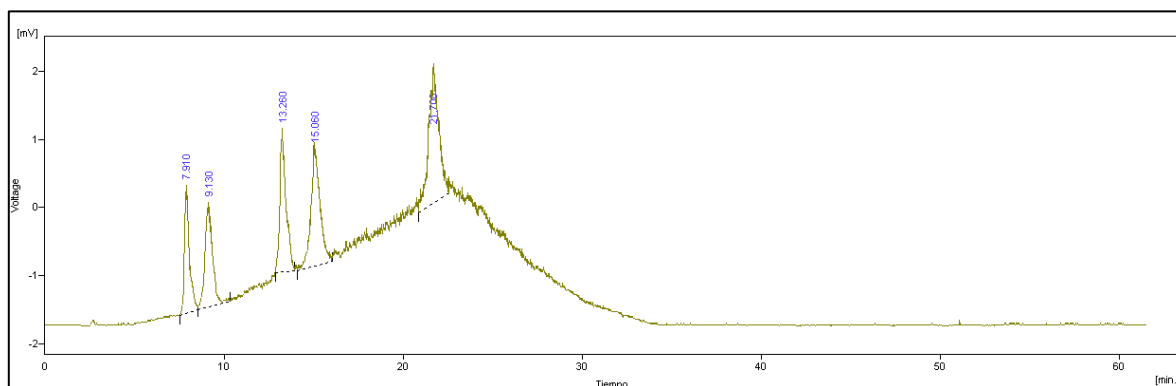


*Figura 28 Cromatograma Detección de Azúcares por HPLC-ELSD*

Con los resultados obtenidos de los experimentos realizados previamente hasta llegar al cromatograma de la Figura 28 se logró observar que efectivamente los tiempos de análisis se disminuyen al aumentar la proporción de agua en la fase móvil, sin embargo, esta variación en la composición de la fase móvil debe ser de forma continua y paulatina a lo largo del tiempo y no alcanzar el 50% de agua ya que la columna aparentemente se satura con esta concentración de solvente acuoso.

En los experimentos donde se evaluó el efecto de la variación del *gain* o ganancia con la finalidad de reducir el ruido que se genera en el análisis. La disminución de la ganancia genera una menor sensibilidad en la lectura que se refleja en la disminución de ruido de la señal. Esto es favorable ya que se trabaja con elución en gradiente donde hay constante cambio en la composición de la fase móvil lo que genera más ruido y luego del análisis se comprueba que efectivamente el ruido disminuye y adicionalmente disminuye la altura de los picos siendo el valor mínimo donde las señales aún son visibles

Adicionalmente, como se trabaja con muestras de cerveza con alta concentración de analitos (al menos las muestras de los días iniciales de la fermentación) se opta por disminuir el volumen de inyección a 10 µL con la finalidad de evitar dañar la columna, teniendo en consideración que es una columna de 15 cm y que puede saturarse con facilidad y de esta manera disminuir su vida útil. Al realizar inyecciones con este volumen siguen siendo visibles todos los picos y permite además realizar curvas de calibración más concentradas que se ajustan mejor a las muestras por analizar.

Con los experimentos del efecto de la variación de temperatura en el sistema cromatográfico se observó que una temperatura de 60 °C fue suficiente para permitir la evaporación completa del solvente, minimizar la inclinación de la línea base y, por lo tanto, generar un ruido insignificante.

A continuación, se presenta una tabla que resume los parámetros de operación optimizados, con la metodología presentada en la sección anterior, para la detección de azúcares en cerveza:

*Tabla 10 Parámetros de Operación y Gradiente Optimizados*

| Parámetro                                       | Valor          |                      |
|-------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| Fase Móvil:<br>Acetonitrilo y Agua en Gradiente | Minutos        | (Acetonitrilo: Agua) |
|                                                 | En el minuto 0 | (85:15)              |
|                                                 | Al minuto 8    | (80:20)              |
|                                                 | Al minuto 23   | (73:27)              |
|                                                 | Al minuto 23.1 | (85:15)              |
|                                                 | Al minuto 30   | (85:15)              |
| Flujo fase móvil                                | 1 ml/min       |                      |
| Volumen de inyección                            | 10 µL          |                      |
| Temperatura de la columna                       | 30°C           |                      |
| Temperatura del tubo de deriva                  | 60°C           |                      |
| Temperatura Nebulizador                         | COOL           |                      |
| Presión gas transportador (Nitrógeno)           | 40 psi         |                      |
| Gain                                            | 10             |                      |

En la Figura 29 se presenta el cromatograma obtenido a partir de la inyección de la mezcla de estándares de fructosa (1), glucosa (2), sacarosa (3), maltosa (4) y maltotriosa (5) a una concentración conocida, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas que se detallan en la Tabla 10 Parámetros de Operación y Gradiente Optimizados:

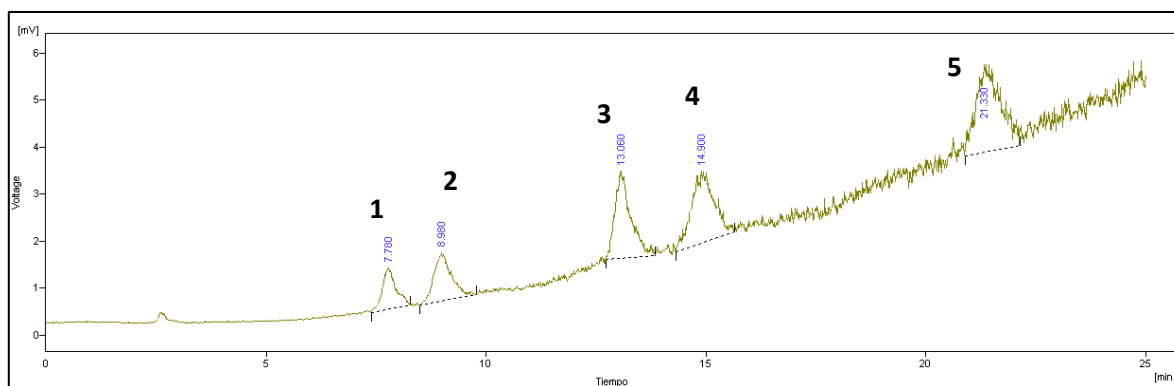


*Figura 29 Cromatograma Detección de Azúcares Gradiente por HPLC-ELSD*

#### 4.1.2 Determinación de ácidos orgánicos

Como se mencionó anteriormente, para la detección de ácidos orgánicos se implementa una columna de enlaces amino. Con este tipo de columnas, diversas variables cromatográficas influyen en la resolución y los tiempos de retención, y ayudan a controlar la velocidad de análisis. Estas variables incluyen la temperatura de la columna, el caudal y la concentración del orgánico (Bio Rad Laboratories, 1994).

La elección de Ácido Sulfúrico como fase móvil se basó en la recomendación del proveedor de la columna (Bio-Rad, 2012).

Con respecto a los caudales, al operar con flujos superiores a 1,2 ml/min pueden producir una contrapresión excesiva y provocar una ruptura de la simetría de los picos, mientras que los caudales inferiores a 0,4 ml/min aumentan el tiempo de análisis.

Los parámetros iniciales de operación se seleccionaron en base a recomendaciones del proveedor (Bio-Rad, n.d.) y diversos documentos científicos de estudios relacionados (Falqué López & Fernández Gómez, 1996)(Park et al., 2017).

*Tabla 11 Parámetros operacionales iniciales para UV*

| Parámetro                 | Valor                              |
|---------------------------|------------------------------------|
| Fase móvil                | Ácido Sulfúrico 0,005 M isocrático |
| Flujo fase móvil          | 0,5 ml/min                         |
| Volumen de inyección      | 20 µL                              |
| Temperatura de la columna | 25°C                               |
| Detección UV              | 210 nm                             |

Inicialmente, se realiza la inyección individual de cada uno de los analitos con la finalidad de conocer el orden de elución de éstos y los tiempos de retención iniciales de cada uno, esto ya que al variar los parámetros de operación puede existir variaciones en el tiempo de retención.

Posteriormente, al realizar el análisis de la mezcla de 50 ppm de los reactivos bajos los parámetros de análisis detallados en la Tabla 11 se obtuvo el siguiente cromatograma:

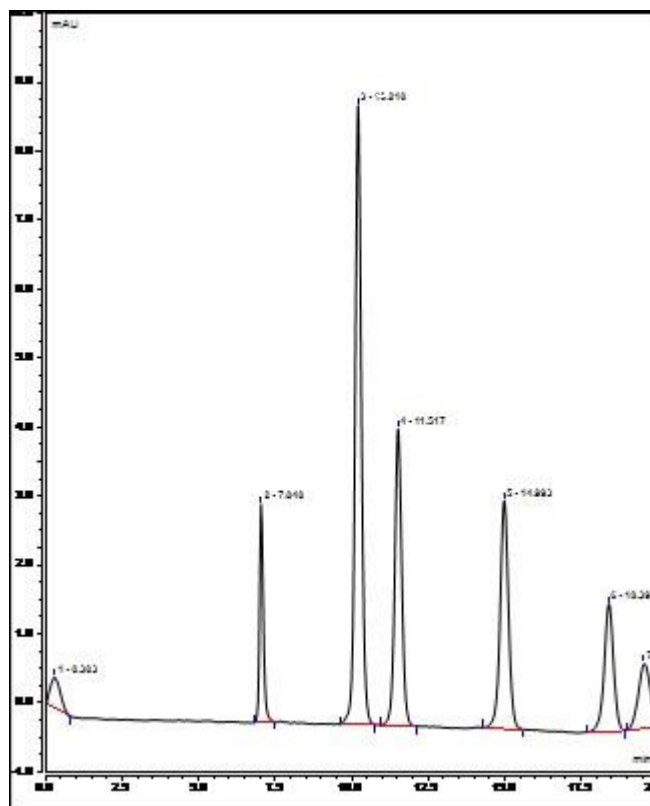


Figura 30 Cromatograma de ácidos Orgánicos con Parámetros iniciales por HPLC-UV

En la Figura 30 se observa el orden de elución de cada uno de los analitos, donde (3) Acido Tartárico ( $t_R$  10,21 min), (4) Ácido Málico ( $t_R$  11,51 min), (5) Ácido Láctico ( $t_R$  14,99 min) y (6) Ácido Acético ( $t_R$  18,39 min). Los picos (1) y (2) corresponden a la señal del solvente.

Cabe destacar que el ácido Fumárico es un contaminante conocido en el ácido Málico comercial y puede aparecer como un pico de elución cercano al ácido Acético en el cromatograma y se evidencia en el pico (7).

Se observa que la separación entre los picos es suficiente para que estos eluyan completamente sin solapamiento, exceptuando en el caso del ácido Acético que se ve un poco de solapamiento con el contaminante que presenta el ácido málico. Además, el tiempo total de análisis no es muy extenso sin embargo se observa que el primer pico eluye a los 10 minutos aproximadamente.

Para estudiar el efecto de la temperatura en el sistema, se realizan inyecciones con los mismos parámetros cromatográficos de la Tabla 11 y solo se modifica la temperatura. Se realizaron pruebas a 30 °C, 40°C y 50°C.

Se observa que al aumentar la temperatura se reducen levemente los tiempos de retención y se logra separar el pico contaminante del pico de ácido acético eluido.

Teniendo la noción del efecto que causa la variación de temperatura en el sistema, se opta evaluar la magnitud del efecto del caudal de fase móvil en el tiempo de retención. Para esto se realiza un experimento con un aumento de flujo a 0,6 con las diferentes temperaturas. Cabe destacar que, por especificaciones del fabricante de la columna, no se puede trabajar a más de 0,6 ml/min.

Adicionalmente, con estas pruebas se quiere estudiar la presión del sistema ya que esta se mantenga dentro de un rango óptimo para la preservación de la vida útil de la columna, la cual tiene un valor máximo de operación de 1.500 psi (Bio-Rad, n.d.). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Se puede observar en las figuras que al aumentar el caudal de la fase móvil se reduce el tiempo de retención significativamente y, por ende, el tiempo total del análisis también disminuye.

Por otro lado, el aumento de la temperatura disminuye la presión del sistema, alcanzando una presión de 1150 psi al operar a una temperatura de 50°C y un caudal de 0,6 ml/min, siendo esto beneficioso para disminuir la exigencia a la columna.

Con estas últimas condiciones se alcanza un menor tiempo de análisis y adicionalmente se elimina el problema de solapamiento entre picos, el pico de contaminante (5) no se solapa por lo que se puede ignorar, finalmente se logran unos picos bien definidos y con una buena separación entre ellos, lo que posteriormente permitirá una buena cuantificación de la concentración del analito en la mezcla.

A continuación, se presenta una tabla que resume los parámetros de operación optimizados, con la metodología presentada en la sección anterior, para la detección de ácidos orgánicos en cerveza:

*Tabla 12 Parámetros operativos optimizados para UV*

| Parámetro                 | Valor                              |
|---------------------------|------------------------------------|
| Fase móvil                | Ácido sulfúrico 0,005 M isocrático |
| Flujo fase móvil          | 0,6 ml/min                         |
| Volumen de inyección      | 20 µL                              |
| Temperatura de la columna | 50°C                               |
| Detección UV              | 210 nm                             |

En la Figura 31 se presenta el cromatograma obtenido a partir de la inyección de la mezcla de estándares de ácido tartárico (3), ácido málico (4), ácido láctico (5) y ácido acético (6) a una concentración conocida, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas que se detallan en la Tabla 10:

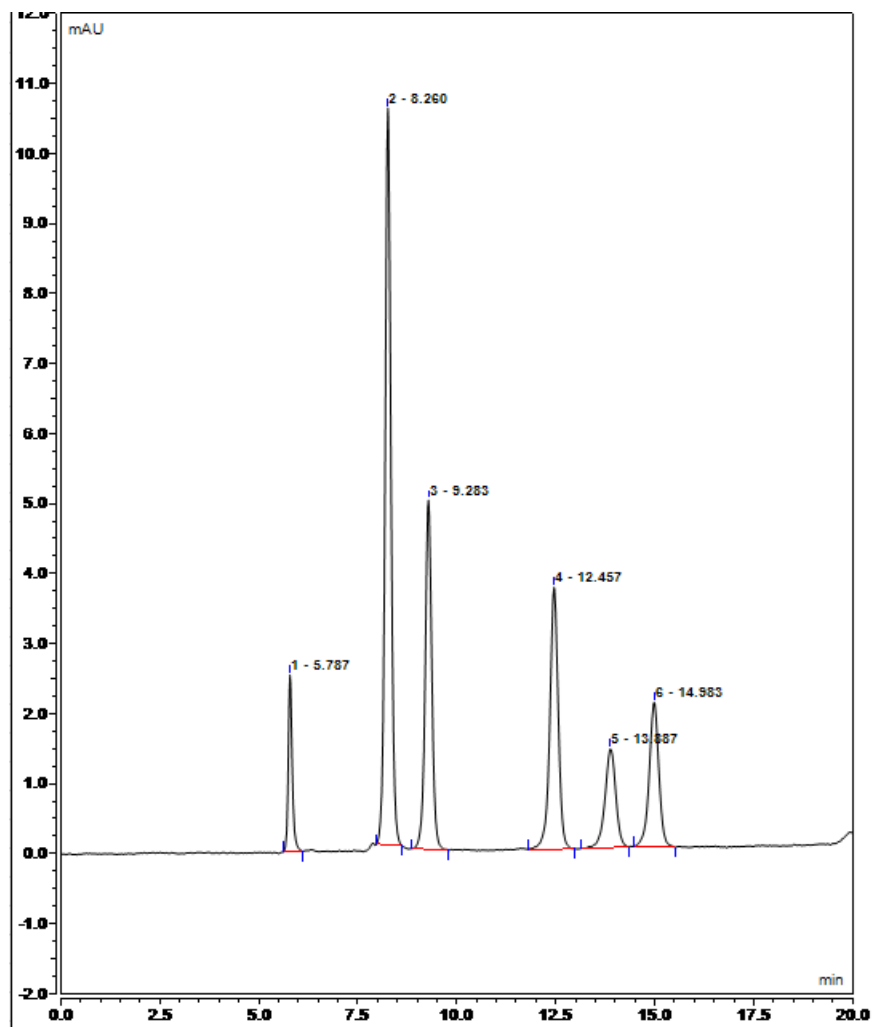


Figura 31 Cromatograma detección de ácidos Orgánicos por HPLC-UV con parámetros optimizados

## 4.2 Implementación y optimización de metodologías GC- FID y GC/MS

### 4.2.1 Determinación de Etanol

El proceso de optimización se dividió en dos partes: la optimización de los parámetros de Headspace y los parámetros operacionales de cromatógrafo de gases acoplado al detector FID.

#### Optimización Headspace:

Inicialmente se evalúa la posibilidad de trabajar con la muestra gasificada o desgasificada, sin embargo, al desgasificar la muestra se corre el riesgo de perder compuestos volátiles en el proceso, por este motivo se decide trabajar con la muestra gasificada. Cabe destacar que como la muestras son generadas en el laboratorio no se les inyecta CO<sub>2</sub> adicional al término del proceso productivo como se realiza en las industrias cerveceras, por este motivo la muestra no presenta alta concentración de gas.

Los parámetros optimizables en este caso son la temperatura del baño, el tiempo que el vial es sumergido en el baño y la adición de componentes a la solución que favorezcan la volatilización del alcohol pero que a su vez no sean reactivos con la muestra.

Se evalúa el efecto de la temperatura en el baño con temperaturas de 70°C, 80°C y 90°C con el vial sumergido en el baño a dichas temperaturas por 20 minutos, se evita llegar a 100°C ya que el agua ebulle.

Como era de esperarse el aumento de temperatura promueve la aparición de más compuestos volátiles y en mayor abundancia, sin embargo, con un baño a 90°C se evidencia en mayor medida condensación dentro del vial, por ende, con la finalidad de no colapsar los compuestos volátiles en el espacio de cabeza del vial y evitar la condensación, se opta por trabajar con el baño a 80°C.

Con respecto al tiempo del baño, se evalúan el efecto del tiempo con el vial sumergido durante 20 min, 30 min y 40 min. En los tres casos no se evidencio grandes diferencias en los resultados, por ende, para optimizar el tiempo de análisis se opta por trabajar con el baño a 80°C con agitación por 20 minutos.

Para favorecer la volatilización se prueba añadiendo a la solución cloruro de sodio, compuesto que actúa como un agente de separación elevando la volatilidad relativa de la mezcla. Al añadir NaCl a la muestra se evidencia un aumento en la abundancia de los componentes y la aparición de más picos que representan otros compuestos volátiles presentes en la muestra, lo que facilita la detección y cuantificación.

Cabe destacar que este proceso de optimización se realizó con una muestra de cerveza estilo Pale Ale comercial. En las figuras a continuación se puede observar el efecto de añadir cloruro de sodio a la cerveza. La muestra sin cloruro de sodio (Figura 32) y la muestra con cloruro de sodio (Figura 33), en ambos casos bajo las mismas condiciones y parámetros operacionales.

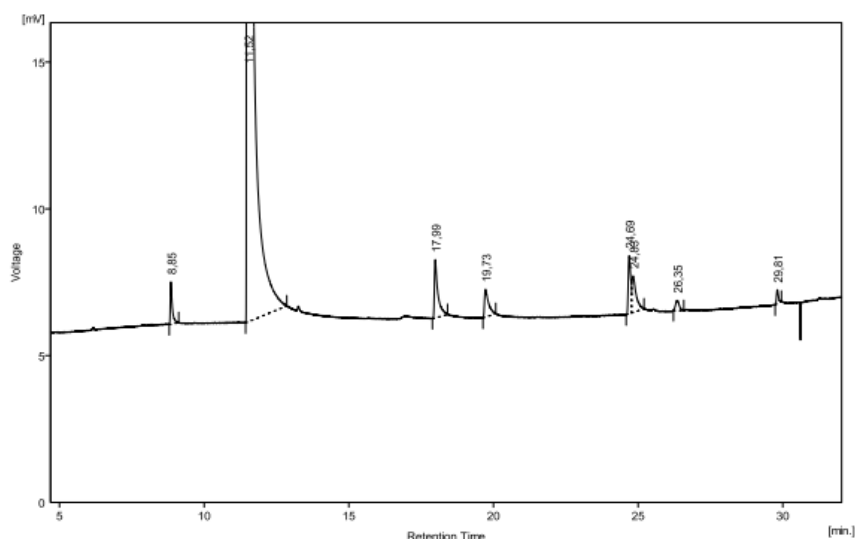


Figura 32 Pale Ale sin Cloruro de Sodio por GC-FID

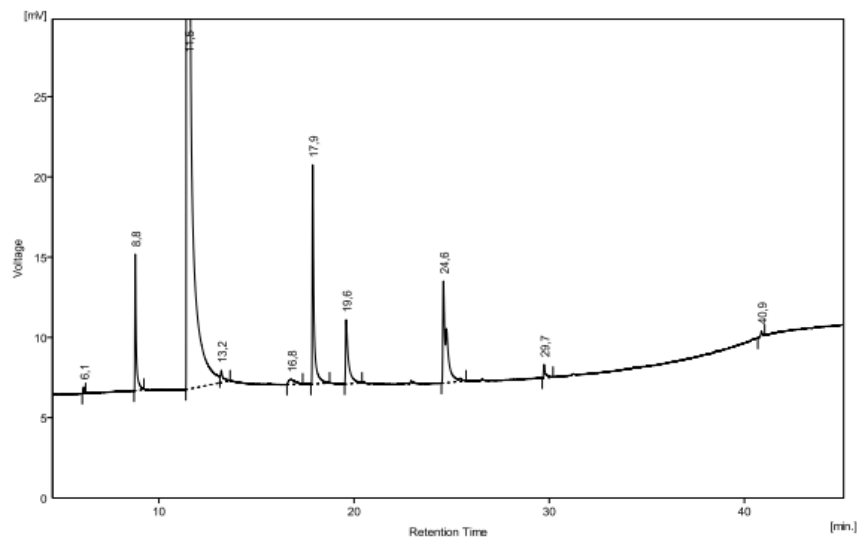


Figura 33 Pale Ale con Cloruro de Sodio por GC-FID

Con estos resultados obtenidos se evidencia que añadir cloruro de sodio a la muestra promueve la volatilización de los compuestos, por lo que se añadió a las soluciones estándar y a las muestras en el pretratamiento con *Headspace*.

En la tabla a continuación se detallan los parámetros operacionales del método *Headspace*:

Tabla 13 Parámetros *Headspace*

|             |        |
|-------------|--------|
| Tiempo      | 20 min |
| Temperatura | 80 °C  |

#### Optimización de la detección:

Los parámetros optimizados en este caso son la temperatura del horno donde va la columna, del inyector y el detector y el volumen de inyección.

Con respecto a estos, la temperatura del inyector debe ser suficiente como para volatilizar los componentes que ingresan al sistema, la temperatura del horno de la columna debe ser tal que permita la elución de todos compuesto de interés y la del detector debe ser igual a la mayor temperatura alcanzada en el horno, esto para que la muestra no sufra cambio de estado al ingresar al detector. En relación con el volumen de inyección, este va a depender de la concentración de la muestra para que se obtenga una magnitud de señal dentro del rango deseado y que a la vez no sature la columna para preservar su vida útil.

Teniendo en consideración los criterios antes mencionados, se opta iniciar el proceso de detección con las siguientes condiciones:

Tabla 14 Condiciones operacionales iniciales para FID

| Condiciones          | Valor                                     |
|----------------------|-------------------------------------------|
| Split/Splitless      | Splitless                                 |
| Horno                | 30°C por 5 min, luego 6°C/min hasta 250°C |
| Inyector             | 180°C                                     |
| Detector             | 250°C                                     |
| Volumen de inyección | 20 µL de gas                              |
| Presión Nitrógeno    | 15 psi                                    |

Se estudia el efecto de la variación de temperatura en el horno de la columna, se tiene que una variación en los valores de la rampa provoca que los picos se junten y eluyan antes, teniendo en consideración que la temperatura máxima permitida en la columna es de 260°C, se trabaja la rampa hasta 250°C para darle un margen de seguridad a la columna y alargar su vida útil además de aprovechar el máximo rango de temperatura que la temperatura ofrece.

El pico de etanol en el cromatograma a las condiciones señaladas en la Tabla 14 eluye aproximadamente a los 12 min.

Para acortar este tiempo se varía la temperatura inicial de horno y la razón de aumento de la temperatura del sistema, pero antes de hacer eso se determina el tiempo muerto de la columna. El tiempo muerto es el tiempo que tarda en recorrer toda la columna un analito sin ser retenido por la fase estacionaria, de esta manera, este tiempo es el mínimo de elución de cualquier compuesto en la muestra.

Para determinar esto se inyecta Metano, ya que la columna no es capaz de retener este gas. Al realizar esto, se obtuvo el pico a los 7 min, siendo este el tiempo muerto, lo que quiere decir que ningún elemento eluye antes de esto.

Con esto en mente se sabe que se puede disminuir el tiempo de elución del Etanol en máximo 5 min. Para conseguir esto se inicia la rampa a 40°C por 5 min, luego 10°C/min hasta 250°C, con lo que se logra un tiempo de elución igual a 9 min.

Con respecto al volumen de inyección, se trabaja en determinar la dilución ideal de la muestra para determinar el volumen de inyección a ocupar.

Se tiene un vial de 20 mL el cuál no debe ser llenado por completo para dejar el espacio de cabeza suficiente para los vapores generados por el calentamiento y agitación de la muestra, debido a esto se considera que un llenado de 10 mL del recipiente es óptimo para dejar espacio a la evaporación de la solución. Para optimizar la cantidad de muestra a utilizar se prueba diluyendo 5 mL de cerveza y aforando a 10 mL con agua ultrapura. Luego de someter a estas muestras al correspondiente calentamiento y agitación se realizan diversas inyecciones del vapor generado, con volúmenes inyección del orden de 10 µL y 100 µL, obteniendo un mejor resultado y mayor definición de los picos al realizar la inyección con un volumen de 200 µL.

Por otro lado, el hecho de trabajar con gas caliente provoca variaciones en los valores minutos, de cuantificación del cromatograma, además la inyección manual provoca variaciones adicionales que se reflejan en la variación del tamaño de los picos ilustrados en el cromatograma. Debido a esto se

hace necesario usar un estándar de corrección, como un compuesto que se incorpore a la mezcla siempre en la misma concentración de tal manera que la variación en el área de este pico en diferentes inyecciones evidencia la variabilidad en la señal del cromatograma y de con él se puede corregir el área del pico de analito de interés.

#### 4.2.2 Detección de compuestos volátiles

El método utilizado para la detección de alcohol en la muestra es el mismo implementado en la detección de compuestos volátiles, puesto que el proceso de optimización se realizó con una muestra de cerveza comercial estilo Pale Ale y se enfocó en generar condiciones para poder obtener la mayor cantidad de compuestos eluidos, por lo tanto, el método es apto para este análisis ya que se busca realizar un barrido a la muestra y detectar todos los compuestos volátiles presentes en ésta.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el proceso de optimización cromatográfica para la detección de etanol en la muestra son los mismos para la detección de compuestos volátiles.

### 4.3 Caracterización de fermentaciones: Perfil químico y perfil volátil

Las fermentaciones realizadas fueron monitoreadas para evaluar la evolución del proceso. A continuación, se presentan las gráficas de cinética de evolución de la densidad y pH de las muestras durante 9 días de fermentación.

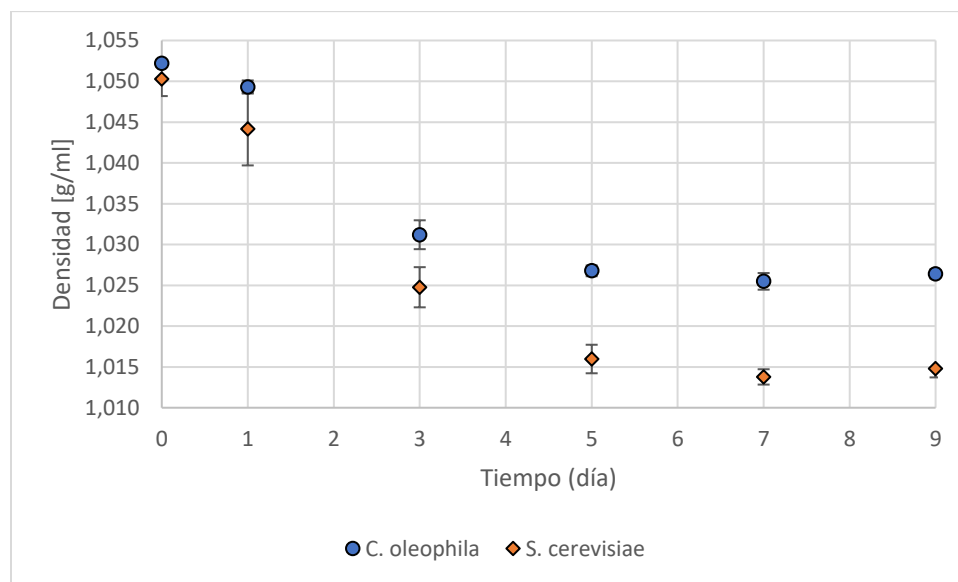


Figura 34 Cinética de fermentación - Densidad del mosto fermentado con *C. oleophila* y con *S. cerevisiae*.

Con respecto a la evolución de la fermentación en término de densidad, se puede observar que tanto la cerveza fermentada con levadura nativa como con levadura control presentan una disminución de densidad con el paso del tiempo, alcanzando la estabilidad en un valor de densidad igual a 1,015 [g/ml] lo que representa el término de la fermentación, como indica la teoría.

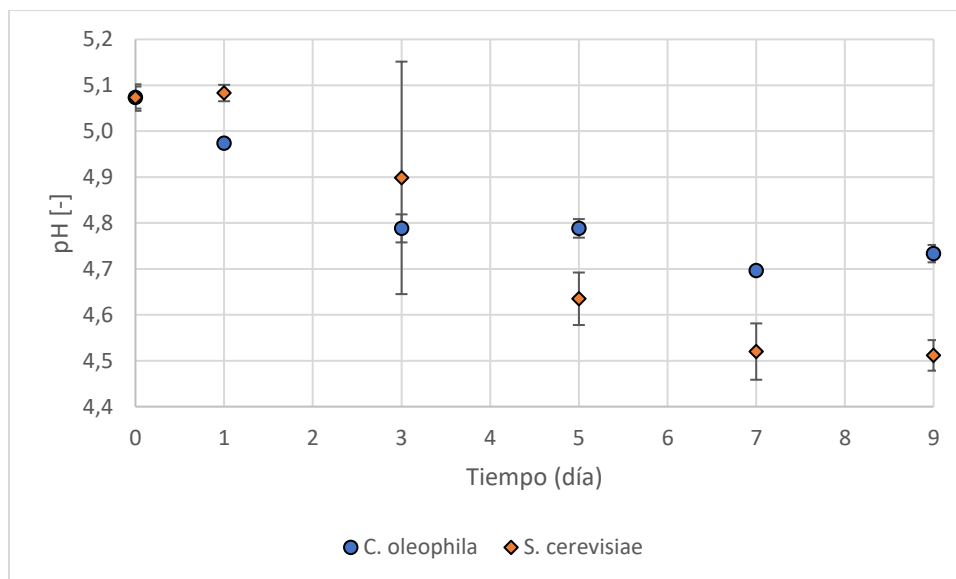


Figura 35 Cinética de fermentación – pH del mosto fermentado con *C. oleophila* y con *S. cerevisiae*.

Con respecto al pH, se puede observar que el mosto se va haciendo más ácido a lo largo que evoluciona la fermentación, lo que se relaciona con la generación de ácidos orgánicos durante el proceso de degradación de azúcares.

Ambas gráficas representan factores claves a medir en el proceso de fermentación y son utilizados para conocer el estado de avance de esta misma.

#### 4.3.1 Identificación y cuantificación de azúcares

La curva de calibración de los estándares de cada uno de los analitos se realiza bajo las condiciones cromatográficas detalladas en la Tabla 10. El rango de concentraciones en el que se realiza dicha curva va desde de 50 ppm a 800 ppm.

En esta oportunidad se trabaja con un amplio rango de concentraciones debido a que el azúcar es un metabolito abundante en el mosto previo a la fermentación, y a medida que ocurre el proceso fermentativo los carbohidratos se van consumiendo, encontrándose en menor medida en las muestras del final de la fermentación. Por este motivo se hace necesario trabajar con un amplio rango de curvas de calibración para poder cuantificar la abundancia de los analitos en la muestra a lo largo de todo el proceso fermentativo.

En el anexo 7.2 se detallan las curvas de calibración generadas para cada una de las azúcares estudiadas para todo el rango de concentraciones.

A continuación, se observa la separación cromatográfica con gradiente obtenida luego de la optimización de los parámetros del sistema, para las diferentes concentraciones de estándares realizadas para la curva de calibración del sistema. El orden de elusión de los picos observados en las figuras a continuación corresponde a (1) fructosa ( $t_R$  7,56 min), (2) glucosa ( $t_R$  8,66 min), (3) sacarosa ( $t_R$  12,53 min), (4) maltosa ( $t_R$  14,13 min) y (5) maltotriosa ( $t_R$  20,22 min).

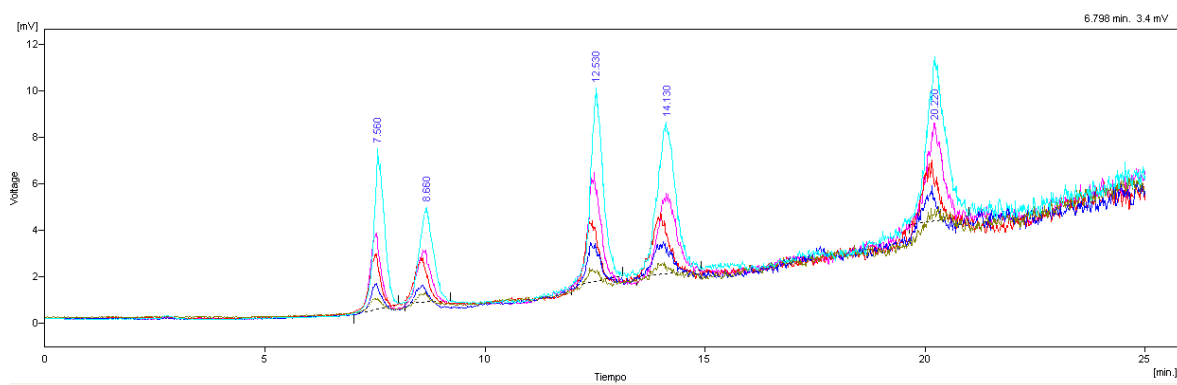


Figura 36 Curva de calibración Azúcares Rango de Concentraciones Bajas por HPLC-ELSD

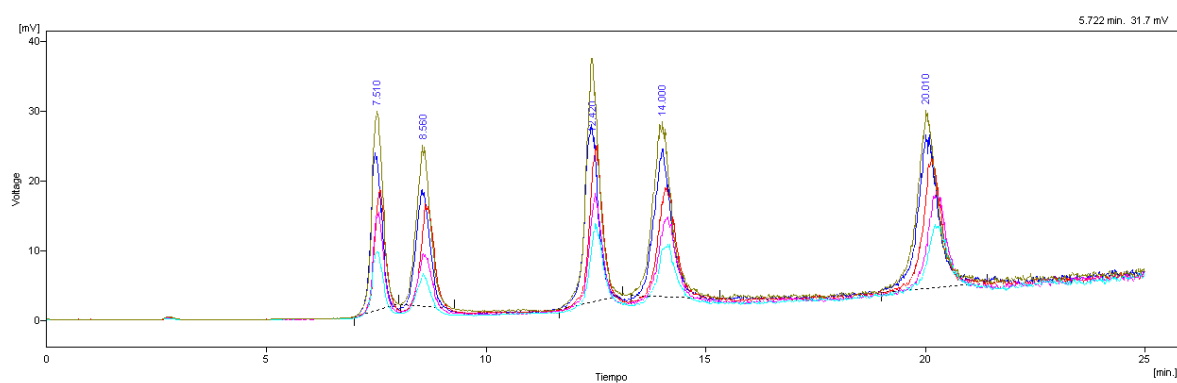


Figura 37 Curva de calibración Azúcares Rango de Concentraciones Altas por HPLC-ELSD

En la Tabla 15 se resumen los parámetros estadísticos obtenidos en el rango con mayor linealidad para cada azúcar, obteniendo la ecuación de la recta, coeficiente de correlación, límite de detección y límite de cuantificación, mediante la realización del análisis estadístico ANOVA.

Tabla 15 Rango lineal, Ecuación de la recta,  $R^2$ , Límite de detección y Límite de cuantificación de cada azúcar.

| Compuesto   | Rango lineal (ppm) | Ecuación de la recta | $R^2$  | LOD (g/L) | LOQ (g/L) |
|-------------|--------------------|----------------------|--------|-----------|-----------|
| Fructosa    | 400-800            | $y=0,0412x-9,2352$   | 0,9944 | 0,01      | 0,03      |
| Glucosa     | 150-500            | $y=0,0195x-1,5978$   | 0,9943 | 0,002     | 0,06      |
| Sacarosa    | 150-500            | $y=0,0338x-2x1582$   | 0,9994 | 0,002     | 0,06      |
| Maltosa     | 200-600            | $y=0,0282x-2,1729$   | 0,9962 | 0,003     | 0,11      |
| Maltotriosa | 200-600            | $y=0,0323x-2,1896$   | 0,9986 | 0,002     | 0,06      |

En las figuras a continuación se muestran los resultados de concentración de los analitos en la muestra, obtenidos al analizar las muestras de cerveza fermentada con ambas levaduras. Para cada una de ellas se analizó la muestra de tres matraces distintos de la misma fermentación en las mismas condiciones, es decir, un en análisis en triplicado, y para cada uno de éstos se realizó un duplicado de detección.

Los valores presentados corresponden al promedio obtenido de estas mediciones con su respectiva desviación estándar:

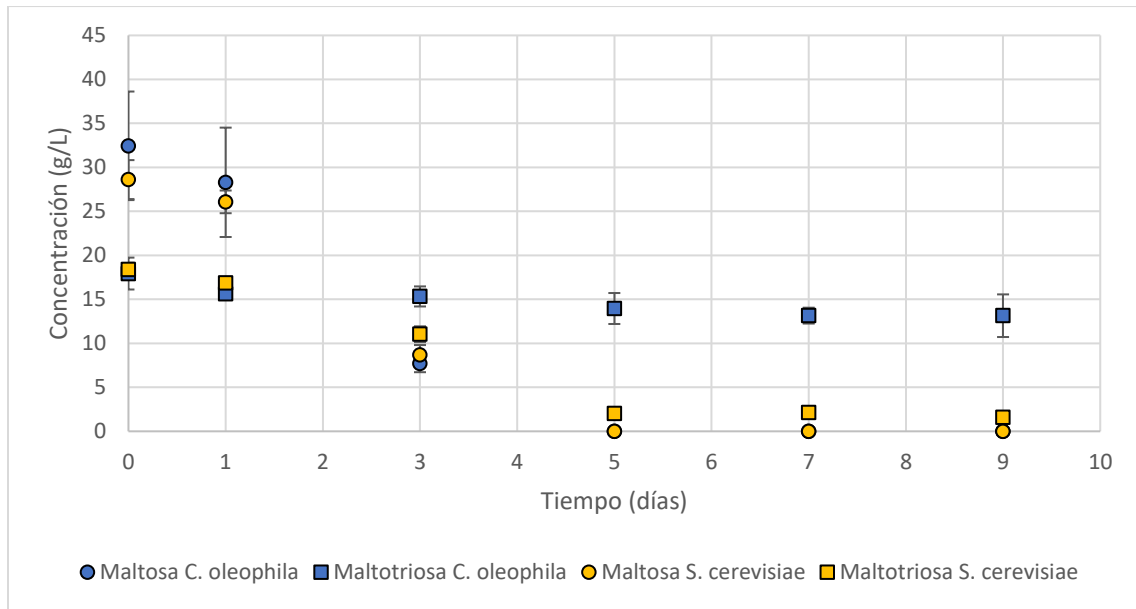


Figura 38 Evolución de Maltosa y Maltotriosa en el proceso de fermentación con levadura *C. oleophila* y *S. cerevisiae*

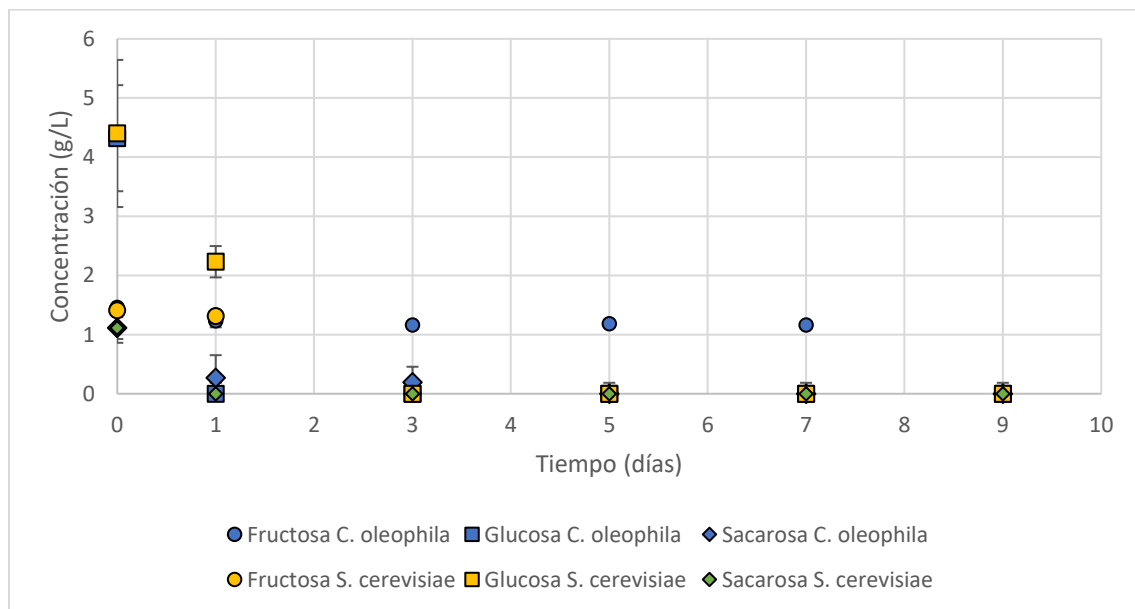


Figura 39 Evolución de Fructosa, Glucosa y Sacarosa en el proceso de fermentación con levadura *C. oleophila* y *S. cerevisiae*

Como se puede observar en las figuras , hubo una disminución general en el contenido de azúcares durante la fermentación alcohólica. Lo cuál corresponde a la transformación alcohólica que se produce en el proceso de fermentación.

Con los resultados obtenidos se puede observar que la evolución del consumo de azúcar a lo largo de la fermentación en las dos muestras de cervezas no son significativamente diferentes en las dos levaduras y que los microorganismos implicados en la fermentación usó azúcares aproximadamente a la misma velocidad.

La mayor diferencia se puede apreciar en el consumo de maltotriosa a lo largo de la fermentación, donde en el caso de la cerveza generada con levadura control (*S. cerevisiae*) el analito es consumido casi completamente al finalizar el proceso fermentativo, por otro lado, la concentración de maltotriosa en la bebida generada con levadura nativa (*C. oleophila*) mantiene un perfil más constante a lo largo de la fermentación, quedando el producto final con una concentración de 13,14 (g/L) de maltotriosa en la cerveza

El perfil de asimilación de azúcares para ambas levaduras estudiadas muestra como en ambos casos la glucosa y la fructosa son los carbohidratos que se consumen primero y a medida que la concentración de glucosa disminuye, comienza a ser más significativa la asimilación de maltosa y maltotriosa, esto ya que se sintetizan los sistemas enzimáticos necesarios para asimilar la maltosa y la levadura comienza a utilizar maltosa y maltotriosa. Adicionalmente, se comprueba como estos perfiles obtenidos se asemejan al perfil fermentativo teórico presentado en la Figura 2.

Con la información obtenida se puede observar como la levadura control consume por completo todas las azúcares presentes en el mosto, no así el caso de la levadura nativa, donde la maltotriosa esta presente en el producto final, lo que significa que ésta levadura no es capaz de sintetizar al carbohidrato más complejo del mosto (trisacárido).

La cerveza producida con la levadura nativa, al contener maltotriosa en el producto final, presenta una mayor densidad y es más dulce que la obtenida de la fermentación con *Saccharomyces* lo que se relaciona con las mediciones de control realizadas para evaluar la evolución de la fermentación, donde se obtuvo un valor igual a de densidad de 1,014 g/ml para la SC y de 1,025 g/L para la CO, ambas con una desviación estándar del orden de  $7 \times 10^{-4}$ .

Se determinó el término del proceso de fermentación debido a que se obtuvo el mismo valor en densidad durante 3 mediciones sucesivas, realizadas con dos días de diferencia cada medición. Esto se complementa con el hecho que la concentración de azúcares permanece constante en 2 mediciones realizadas a más de 24 horas de distancia.

Realizando una comparativa entre el desempeño de ambas levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica, se puede destacar un comportamiento muy similar en el consumo de azúcares simples (monosacáridos), consumiéndose por completo al llegar el día 3 de fermentación.

#### 4.3.2 Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos

La curva de calibración se realiza bajo las condiciones detalladas en la Tabla 20. El rango de concentraciones en el que se realiza la curva de calibración va desde de 5 ppm a 1000 ppm.

Se trabaja con un amplio rango de concentraciones para conocer el rango de linealidad de cada uno de los reactivos.

Las curvas de calibración generadas para cada uno de los ácidos orgánicos estudiados para todo el rango de concentraciones se detallan en el anexo 7.3.

En las curvas de calibración se puede observar que los reactivos presentan linealidad en la totalidad del rango de trabajo seleccionado, por ende, se considerara el rango completo para la obtención de los parámetros estadísticos de cada uno de los ácidos orgánicos.

En la Tabla 16 se resumen los parámetros estadísticos obtenidos en el rango con mayor linealidad para cada ácido orgánico, obteniendo la ecuación de la recta, coeficiente de correlación, límite de detección y límite de cuantificación, mediante la realización del análisis estadístico ANOVA.

*Tabla 16 Rango lineal, Ecuación de la recta,  $R^2$ , Límite de detección y Límite de cuantificación de cada ácido Orgánico.*

| Compuesto | Rango lineal (ppm) | Ecuación de la recta | $R^2$ | LOD (g/L)            | LOQ (g/L)            |
|-----------|--------------------|----------------------|-------|----------------------|----------------------|
| Tartárico | 5-1000             | $y=0,2093x-0,0407$   | 1     | $8,6 \times 10^{-4}$ | $2,9 \times 10^{-3}$ |
| Málico    | 5-1000             | $y=0,1004x-0,1035$   | 1     | $5,6 \times 10^{-4}$ | $1,9 \times 10^{-3}$ |
| Láctico   | 5-1000             | $y=0,0724x+0,1343$   | 0,99  | $1,1 \times 10^{-3}$ | $3,6 \times 10^{-3}$ |
| Acético   | 5-1000             | $y=0,0402x+0,024$    | 1     | $2,9 \times 10^{-4}$ | $9,6 \times 10^{-4}$ |

A continuación, se presentan los perfiles abundancia de ácidos orgánicos obtenidos al analizar las muestras de cerveza fermentada con ambas levaduras. Los resultados obtenidos del análisis se reflejan en las gráficas donde se presenta el promedio el promedio obtenido las mediciones con su respectiva desviación estándar.

Las figuras presentadas se muestra el perfil característico de la evolución de los ácidos durante el proceso de fermentación, los cuales fueron separados en tres gráficas para facilitar su análisis debido a los diferentes rangos de concentración.

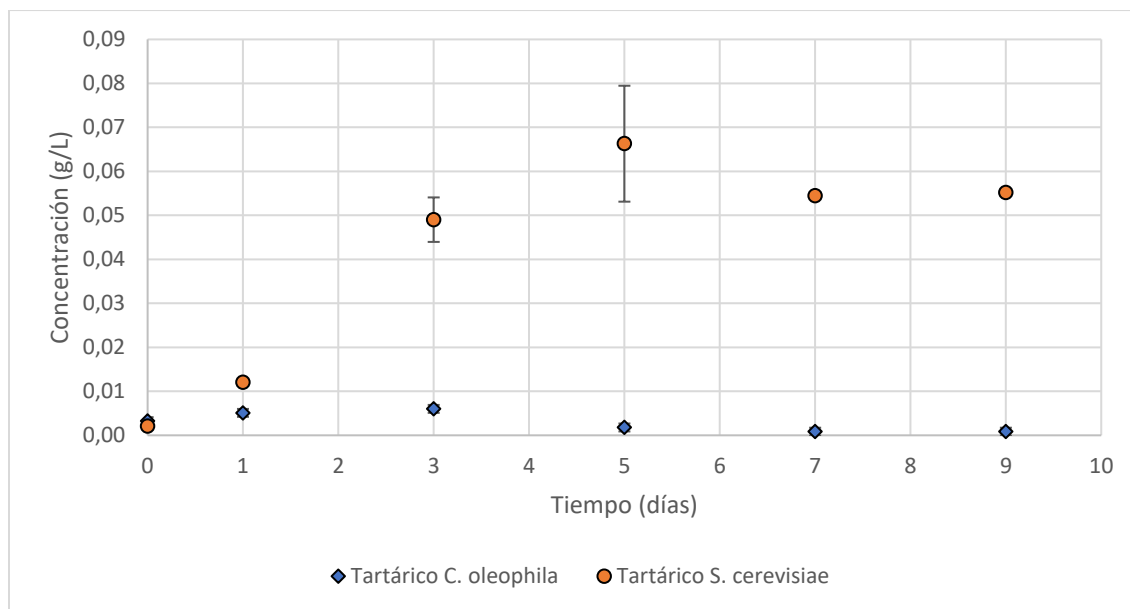


Figura 40 Evolución de ácido Tartárico en el proceso de fermentación con levadura *C. oleophila* y *S. cerevisiae*

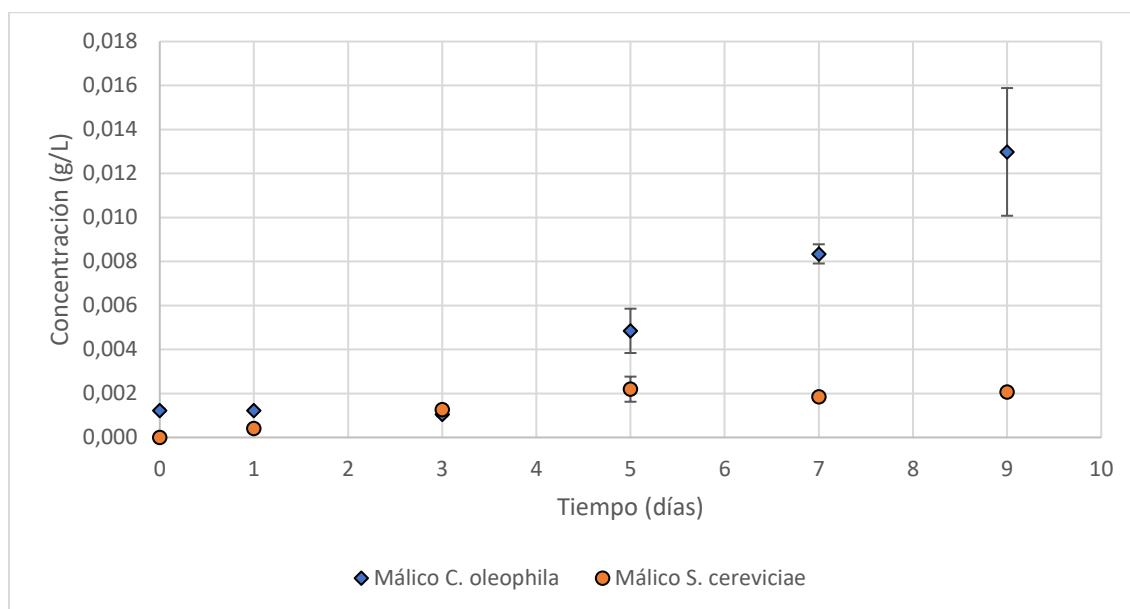


Figura 41 Evolución de ácido Málico en el proceso de fermentación con levadura *C. oleophila* y *S. cerevisiae*

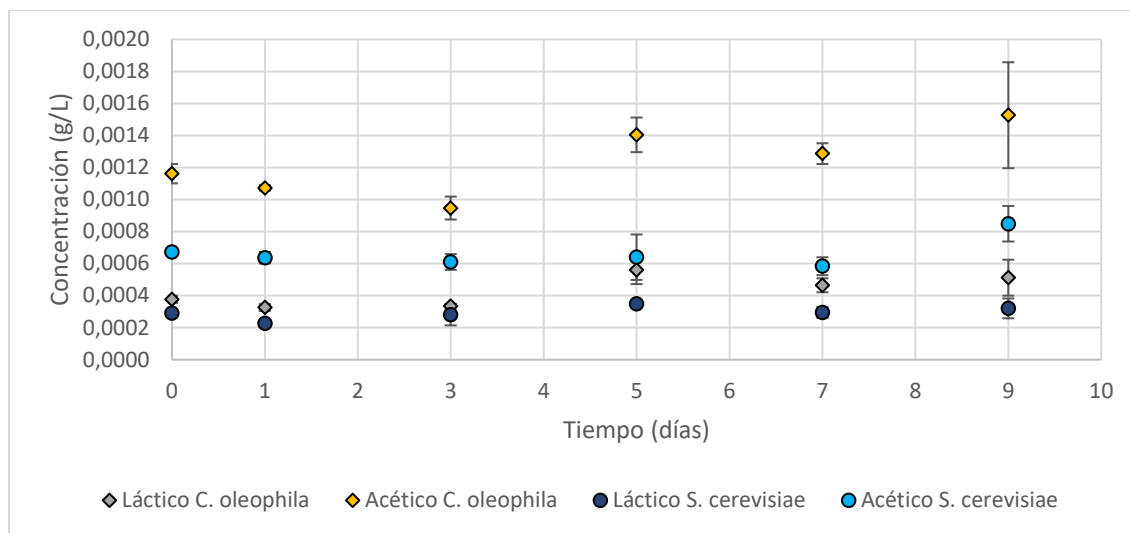


Figura 42 Evolución de ácidos orgánicos en el proceso de fermentación con levadura *C. oleophila* y *S. cerevisiae*

En las gráficas se puede observar que los valores obtenidos no son significativamente diferentes en las dos levaduras y que los microorganismos implicados en la fermentación generaron ácidos orgánicos aproximadamente a la misma velocidad, sin embargo, la mayor diferencia se puede apreciar en el comportamiento del ácido Tartárico a lo largo de la fermentación, donde en el caso de la bebida generada con levadura control (*S. cerevisiae*) el analito se produce en altas cantidades comparado con los demás ácidos presentes en la cerveza, presentando un crecimiento exponencial hasta el día 5 de la fermentación y posterior a eso una pequeña caída alcanzando una concentración de 55,22 ppm que equivale a 0,05 g/L. Por otro lado, la concentración de ácido Tartárico en la cerveza generada con levadura nativa (*C. oleophila*) presenta un aumento hasta el día 3 de la fermentación y posterior a esto una caída significativa alcanzando una concentración de 0,83 ppm equivalente a 0,00083 g/L. Este decrecimiento podría adjudicarse al uso de este analito como una sustancia en una reacción secundaria del proceso fermentativo al implementar la levadura nativa. Por otro lado, esta diferencia en la evolución de la fermentación con ambas levaduras se genera como resultado del metabolismo de la levadura.

La cerveza producida con la levadura *Saccharomyces*, al contener mayor concentración de ácido tartárico en el producto final, presenta un pH más ácido y un sabor más cítrico que la obtenida de la fermentación con nativa, lo que se relaciona con las mediciones de control realizadas para evaluar la evolución de la fermentación, donde se obtuvo un valor igual a de pH de 4,48 para la SC y de 4,70 para la CO, ambas con una desviación estándar del orden de  $6 \times 10^{-3}$ , siendo el pH inicial de 5,2 aproximadamente.

El comportamiento de los demás ácidos a lo largo de la fermentación es muy similar para el caso de ambas levaduras, exceptuando el ácido Málico donde se ve más abundante en la cerveza producida con la levadura nativa, lo que se puede evidenciar en la Figura 41. Teniendo en consideración que la diferencia en concentraciones del ácido Málico entre ambas levaduras no es tan significativa como

en el caso del ácido Tartárico, la mayor presencia del primer ácido en el caso de la cerveza producida con la levadura nativa intensificaría los tonos frutales en el producto final.

La evolución de las concentraciones de los ácidos orgánicos estudiados de las muestras se relaciona con el comportamiento de consumo de azúcares durante el proceso de fermentación, es decir, a medida que se van consumiendo las azúcares fermentables, se van generando ácidos orgánicos. Los ácidos predominantes en las muestras como lo son el ácido málico en la cerveza fermentada con levadura nativa y ácido tartárico en la fermentada con *S. cerevisiae* se encuentran dentro de los rangos típicos como se puede observar en la Tabla 1 por lo que son comparables con la bibliografía, el resto de los ácidos orgánicos medidos se encuentran en muy bajas concentraciones y no son de gran incidencia en la muestra.

La presencia de ácido acético y láctico en la muestra son reflejo de una contaminación, debido a una operación incorrecta o una mala gestión higiénica durante el proceso de elaboración de la cerveza, situación que es muy dañina y como se puede ver en los resultados obtenidos en ninguno de los casos se presentan concentraciones significativas de estos ácidos.

#### 4.3.3 Identificación y cuantificación de etanol

A continuación, se presenta una tabla que resume los parámetros de operación optimizados, con la metodología presentada en la sección anterior, para la detección de Etanol en cerveza:

*Tabla 17 Condiciones operacionales optimizados para FID*

| Parámetro            | Valor                             |
|----------------------|-----------------------------------|
| Split/Splitless      | Split 50 ml/min, purga 1 ml/min   |
| Horno                | 40 °C, luego 10°C/min hasta 250°C |
| Inyector             | 180 °C                            |
| Detector             | 250 °C                            |
| Volumen de inyección | 200 µL                            |
| Presión Nitrógeno    | 15 psi                            |

La curva de calibración se realiza bajo las condiciones detalladas en la Tabla 21. El rango de concentraciones en el que se realiza la curva de calibración va desde de 0,3125% v/v a 5% v/v.

Como se mencionó anteriormente, se trabaja con este rango de concentraciones ya que para una cerveza artesanal se espera que el valor máximo de alcohol por volumen sea aproximadamente 5% y considerando que dentro de las muestras por analizar hay puntos desde el día cero de la producción de cerveza hasta el final de la fermentación, en las muestras de los primeros días se estima que su concentración de alcohol sea de 0% v/v y que vaya aumentando a medida van pasando los días de fermentación.

En el anexo 7.4 se detalla la curva de calibración generada para el Etanol estudiadas para todo el rango de concentraciones.

Para generar esta curva de calibración con las diferentes concentraciones de estándares se implementa el Metanol como estándar de corrección ya que al inyectar el mismo estándar de determinada concentración en diferentes oportunidades se observaba una evidente variabilidad en el área y la altura del pico en el cromatograma, esta variación se puede aludir al trabajar con gases calientes y al ser una inyección manual. Para corregir esto se trabaja con el Metanol de la siguiente manera:

Tabla 18 Obtención de valores de Área corregidos mediante el uso de Metanol como estándar de corrección

|          |         | Área REAL<br>Metanol | Área REAL<br>Etanol | Área<br>PROMEDIO<br>Metanol | Área [mV.S]<br>CORREGIDA<br>Etanol |
|----------|---------|----------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Promedio | 5%      | 146,4                | 879,8               | 287,3                       | 1726,0                             |
|          | 2,5%    | 119,5                | 369,9               | 287,3                       | 889,5                              |
|          | 1,25%   | 91,8                 | 135,4               | 287,3                       | 423,7                              |
|          | 0,625%  | 927,9                | 542,6               | 287,3                       | 168,0                              |
|          | 0,3125% | 150,8                | 37,1                | 287,3                       | 70,7                               |

A todos los estándares de diferentes concentraciones se les añadió 200 uL de Metanol en la solución de Etanol, esto con la finalidad de tener un parámetro fijo entre los diferentes estándares y que debiese entregar un pico de igual altura y área en todos los casos.

Como se mencionó anteriormente y como se observa en la Tabla 18, este no fue el caso, ya que se ve como varía el área real de Metanol en los diferentes estándares, siendo que cada uno de ellos tiene 200 uL de Metanol. Con esto se infiere que el área de Etanol que entrega el cromatograma está sujeta a alteraciones debido a la sensibilidad de trabajar con gas caliente de forma manual.

Para poder obtener un área correcta y que refleje de mejor manera la concentración de Etanol en la solución se realiza el promedio de los valores de Metanol obtenidos en las lecturas y se realiza la siguiente operación para obtener un área de Etanol corregida:

$$\text{Área de Etanol corregida} = \frac{\text{Área promedio Metanol}}{\text{Área real Metanol}} * \text{Área real Etanol}$$

Luego de realizar esta operación para cada uno de los estándares se puede observar que los resultados de las áreas corregidas de Etanol tienen una mayor coherencia respecto a la concentración del estándar, es decir, el estándar de mayor concentración tiene una mayor área de pico.

En la Tabla 19 se resumen los parámetros estadísticos obtenidos en el rango lineal del Etanol, obteniendo la ecuación de la recta, coeficiente de correlación, límite de detección y límite de cuantificación, mediante la realización del análisis estadístico ANOVA.

Tabla 19 Rango lineal, Ecuación de la recta, R<sup>2</sup>, Límite de detección y Límite de cuantificación del Etanol

| Alcohol | Rango lineal (%v/v) | Ecuación de la recta | R <sup>2</sup> | LOD (%v/v) | LOQ (%v/v) |
|---------|---------------------|----------------------|----------------|------------|------------|
| Etanol  | 0,3125 - 5          | y = 35506x - 32,35   | 0,9988         | 0,004      | 0,012      |

En las tablas a continuación se detallan los resultados de concentración del analito en la muestra, obtenido al analizar las muestras de cerveza realizada con ambas levaduras. Para cada una de ellas se analizó la muestra de tres matraces distintos de la misma fermentación en las mismas

condiciones, es decir, un en análisis en triplicado, y para cada uno de éstos se realizó un duplicado de detección.

En las tablas a continuación se presenta el promedio obtenido de estas mediciones con su respectiva desviación estándar:

*Tabla 20 Resultados de detección de etanol - C. oleophila*

| <i>Candida oleophila</i> |                                     |                        |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| DÍA                      | Promedio<br>Concentración<br>(%v/v) | Desviación<br>estándar |
| 0                        | 0,18                                | 3,3993E-17             |
| 1                        | 0,37                                | 0,03                   |
| 3                        | 1,60                                | 0,02                   |
| 5                        | 3,18                                | 0,17                   |
| 7                        | 2,48                                | 0,24                   |
| 9                        | 2,70                                | 0,29                   |

*Tabla 21 Resultados de detección de etanol - S. cerevisiae*

| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |                                     |                        |
|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| DÍA                             | Promedio<br>Concentración<br>(%v/v) | Desviación<br>estándar |
| 0                               | 0,18                                | 3,399E-17              |
| 1                               | 0,74                                | 0,06                   |
| 3                               | 3,03                                | 0,19                   |
| 5                               | 3,95                                | 0,33                   |
| 7                               | 3,74                                | 0,18                   |
| 9                               | 3,90                                | 0,37                   |

En el proceso de fermentación alcohólica las azúcares fueron transformadas en alcohol y dióxido de carbono, y el grado alcohólico alcanzado en las muestras analizadas está directamente relacionado con la concentración de azúcares fermentables presentes en el mosto de cerveza. Se alcanza un valor de 2,7 %v/v y 3,9%v/v, para la cerveza producida con levadura *C.oleophila* y *S.cerevisiae* respectivamente.

Esta diferencia en grado alcohólico de las muestras se debe a la presencia de azúcares residuales en la bebida producida por la fermentación con levadura nativa. La cerveza producida a partir de la fermentación de levadura control fue capaz de consumir todas las azúcares fermentables presentes en el mosto y transformarlas en Etanol. Por otro lado, la levadura nativa no fue capaz de consumir por completo la maltotriosa dejando esta azúcar residual en la cerveza, significando que menos cantidad de azúcar fermentable fue transformada en Etanol, generando que el producto final tenga un menor grado alcohólico.

En la Figura 43 se puede observar el perfil de evolución de la concentración de etanol en la muestra tanto para la cerveza producida con levadura *Candida Oleophila* como para la levadura *Saccharomyces Cereviciae*. En esta figura se puede observar como en el caso de la levadura control hay una mayor velocidad en la producción del alcohol por lo que se obtiene un producto final con más alcohol por volumen de cerveza. Por otro lado, en el caso de la levadura nativa se observa como los primeros días de fermentación se produce un crecimiento exponencial en la concentración de alcohol en la muestra, pero al llegar al día 5 de la fermentación hay una caída y posterior a esto vuelve a aumentar un poco los grados de alcohol por volumen, alcanzando una concentración menor de alcohol en la muestra en comparación a la otra levadura.

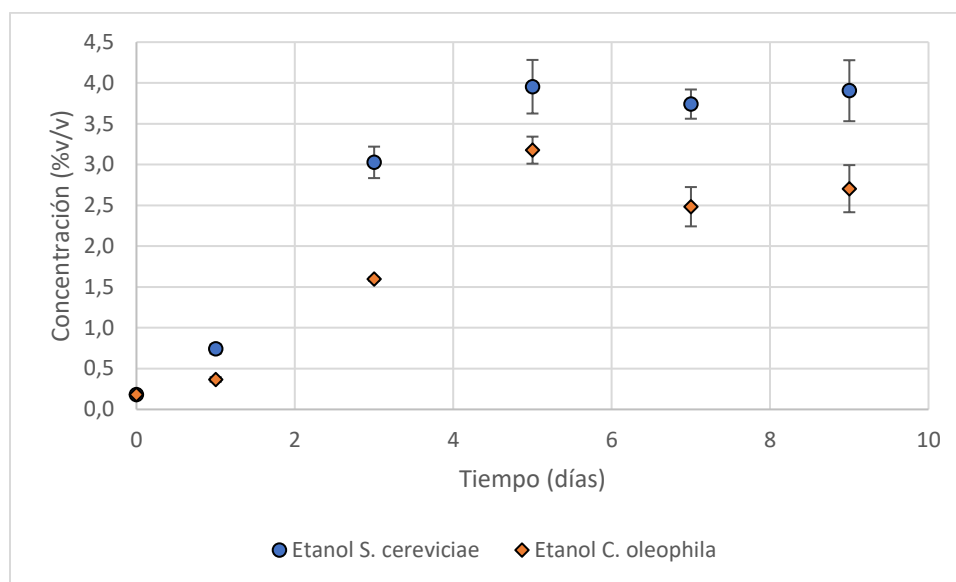


Figura 43 Evolución de ácidos orgánicos en el proceso de fermentación con levadura *S.cerevisiae* y *C.oleophila*

Esta información obtenida concuerda con los datos adquiridos en las mediciones de monitoreo de fermentación. En la Tabla 22 se resumen los datos de densidad obtenidos en estas mediciones de ambos productos, tanto del día inicial y como el final de la cerveza. Con estos datos se puede calcular un estimado de la concentración de alcohol por volumen en la muestra, mediante la implementación de una fórmula basada en atenuación y relación de la densidad con el consumo de azúcares y producción de alcohol.

Tabla 22 Estimación del grado alcohólico del producto final mediante la densidad día 0 y día 9 con levadura *S.cerevisiae* y *C.oleophila*

|                                       | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Candida oleophila</i> |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| DI: Densidad mosto inicial (g/L)      | 1,052                           | 1,052                    |
| DF: Densidad cerveza final (g/L)      | 1,014                           | 1,025                    |
| Estimación de %v/v: $(DI-DF)*0,13125$ | 4,6                             | 3,2                      |

En la estimación de grados alcohólicos obtenida mediante el cálculo con las densidades iniciales y finales medidas en el proceso de fermentación se puede observar que se encuentran en el rango típico de grado alcohólico en cerveza el cuál fluctúa entre 3 %v/v a 5% v/v.

Se puede observar que el valor estimado de grado alcohólico para ambos casos se acerca mucho a los valores obtenidos experimentalmente, adicionalmente se respalda la tendencia de que el producto fermentado con *S.cereviciae* presenta mayor grado alcohólico que la producida con *C.oleophila*, esto debido a la presencia de azúcares residuales en la cerveza fermentada con levadura nativa como se comenta anteriormente.

#### 4.3.4 Identificación de compuestos volátiles

A continuación, se presenta una tabla que resume los parámetros de operación optimizados, con la metodología presentada en la sección anterior, para la detección de compuestos volátiles en cerveza:

Tabla 23 Parámetros operacionales optimizados para GC MS

| Parámetro            | Valor                             |
|----------------------|-----------------------------------|
| Split/Splitless      | Splitless                         |
| Horno                | 40 °C, luego 10°C/min hasta 250°C |
| Inyector             | 180 °C                            |
| Detector             | 250 °C                            |
| Volumen de inyección | 200 µL                            |
| Presión Nitrógeno    | 15 psi                            |

Al estudiar la muestra inicial, el compuesto volátil que se pudo detectar es el dióxido de carbono. Con esto como base se estudian las muestras de los días finales tanto para la cerveza fermentada con levadura nativa como con la levadura control.

En el anexo 7.5 se muestra un ejemplo del resultado que entrega el reporte entregado por el programa al realizar el análisis. Este reporte muestra el espectro de masas del analito y todas las posibles coincidencias que se obtienen con la base de datos del programa. En base a estas comparaciones uno puede determinar, con el porcentaje de similitud de espectros entregado en el reporte, cuál es el compuesto que se detectó en el análisis.

Para el caso de la cerveza producida a partir de levadura *Sacharomyces cereviciae* se detectó la presencia de los siguientes compuestos que se presentan en la Figura 44:

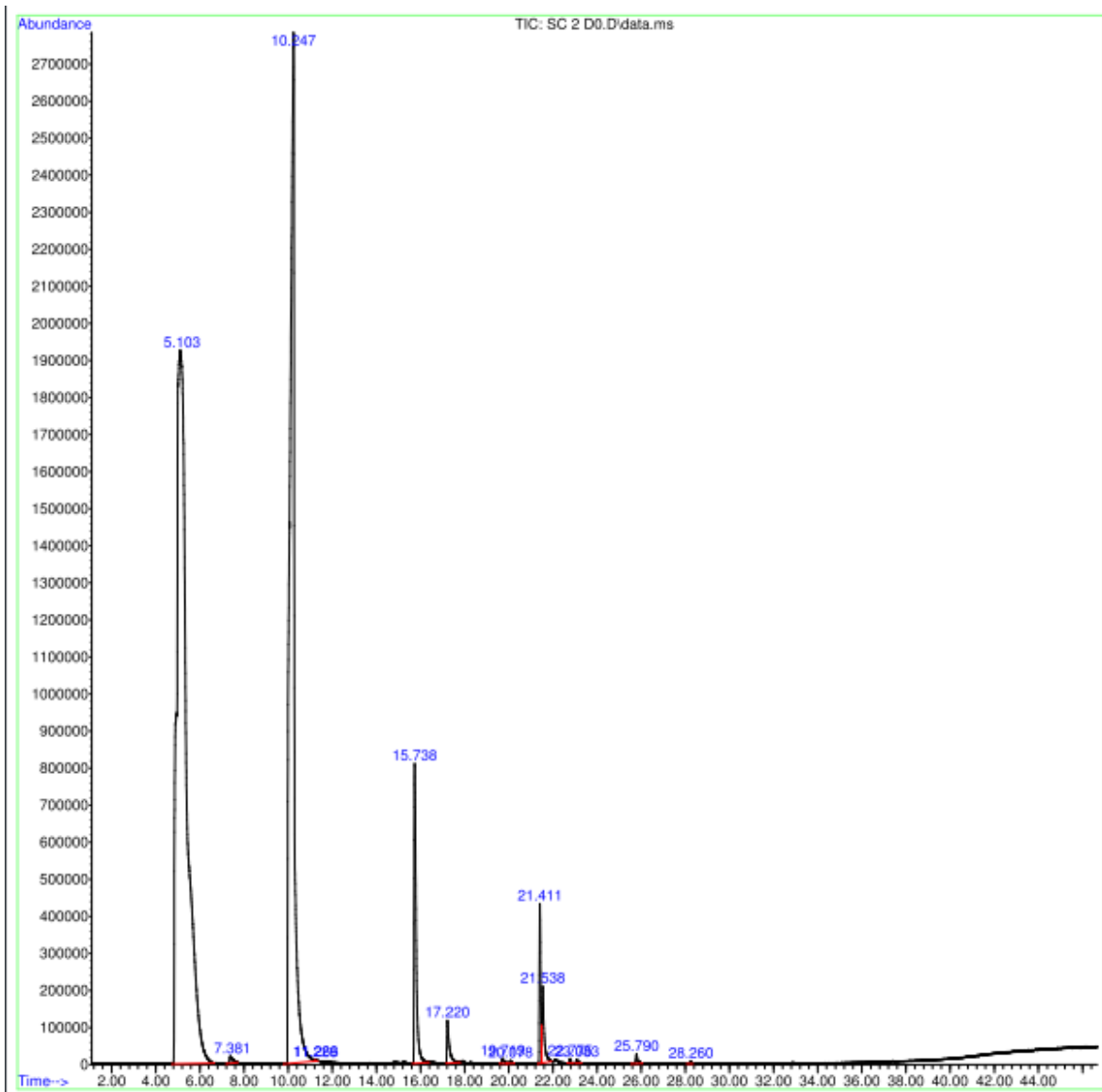


Figura 44 Cromatograma compuestos volátiles en muestra fermentada con *Levadura S.cerevisiae* por GC MS

- Acetaldehído (**t=7,381 min**)
- Etanol (**t=10,247 min**)
- Ácido Acético (**t=15,738 min**)
- Isobutanol (1-Propanol, 2- metil-) (**t=17,220 min**)
- Alcohol Isoamílico (1-Butanol, 3-metil-) (**t=21,411 min**)
- 1-Heptanol (**t=21,538 min**)
- Ciclotrisiloxano, hexametil (**t=22,776 min**)
- Ácido butírico (Ácido butanoico, éster etílico) (**t=23,062 min**)
- Ciclotetrasiloxano, octametil- (**t=28,260 min**)

Para el caso de la cerveza producida a partir de levadura *Candida oleophila* se detectó la presencia de los siguientes compuestos que se presentan en la Figura 45:

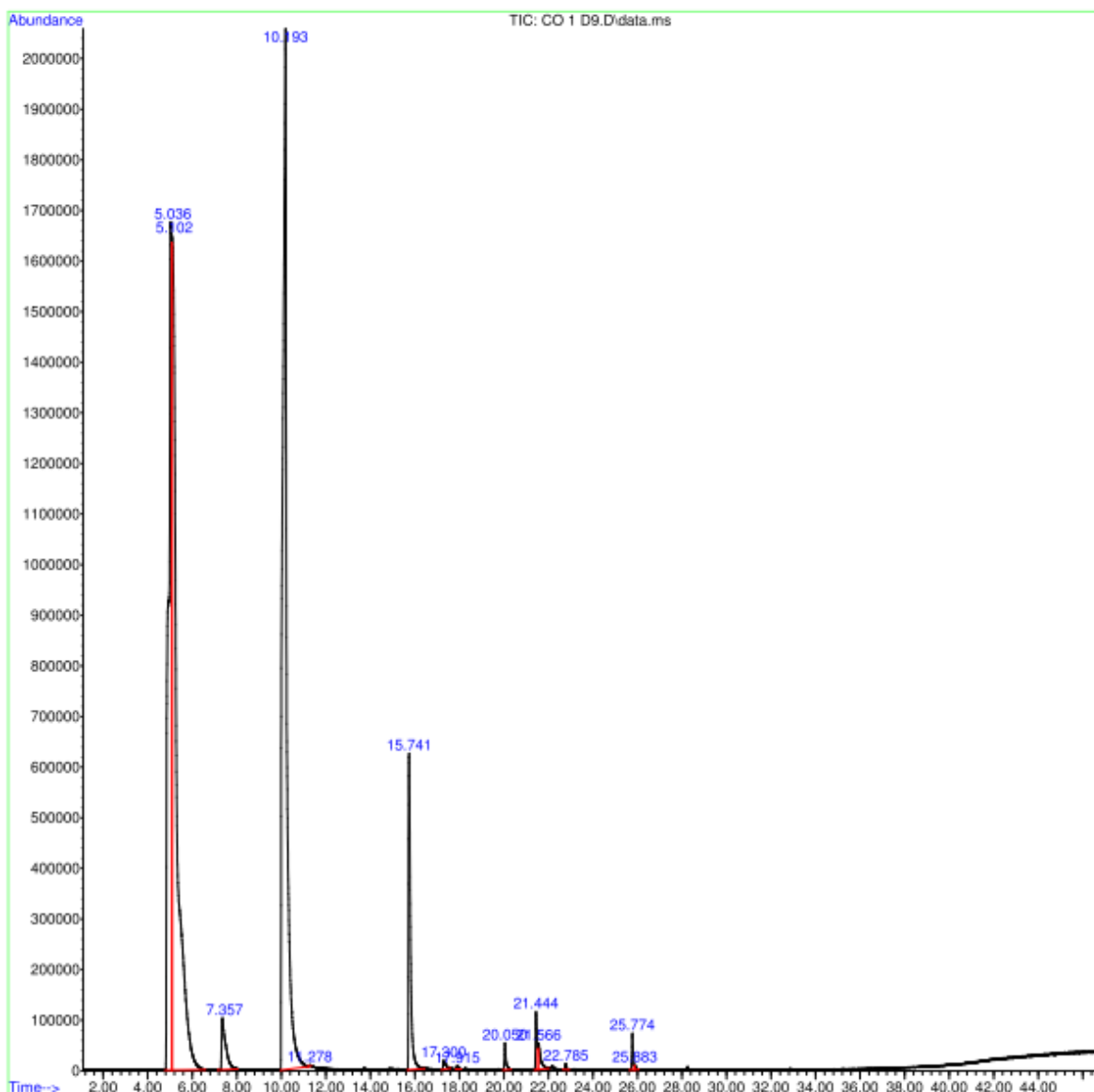


Figura 45 Cromatograma compuestos volátiles en muestra fermentada con Levadura *C.oleophila* por GC MS

- Acetaldehído (*Ethane, 1,1 – dietoxy*) (**t= 7,359 min**)
- Etanol (**t= 10,195 min**)
- 1-Propanol (**t= 14,520 min**)
- Ácido Acético (**t= 15,741 min**)
- Isobutanol (1-Propanol, 2- metil) (**t=17,289 min**)
- Isovaleraldehído (1-Butanal, 3-metil) (**t=17,913 min**)
- Alcohol isoamílico (1-Butanol, 2-metil-) (**t=21,444 min**)
- Ciclotrisiloxano, hexametil- (**t=22,787 min**)
- Alcohol Isoamílico (1-Butanol, 3-metil, acetato) (**t=25,774 min**)

A continuación, se presenta una tabla resumen con los principales compuestos volátiles detectados en ambas muestras con sus respectivas abundancias calculadas en base a los datos de área de cada compuesto obtenida del reporte antes mencionado:

Tabla 24 Compuestos volátiles presentes en las muestras de cerveza fermentadas con levadura *S.cerevisiae* y *C. oleophila*

|    |                               | S. Cerevisiae | C. Oleophila |
|----|-------------------------------|---------------|--------------|
| 1  | <b>Acetadehido</b>            | 0,16%         | 2,03%        |
| 2  | <b>Etanol</b>                 | 35,86%        | 34,76%       |
| 3  | <b>Acetato de Etilo</b>       | 4,48%         | 5,21%        |
| 4  | <b>Isobutanol</b>             | 0,78%         | 0,19%        |
| 5  | <b>Alcohol isopentílico</b>   | 1,70%         | 1,06%        |
| 6  | <b>Alcohol amílico</b>        | 1,19%         | 0,56%        |
| 7  | Ciclotrisiloxano, hexametil   | 0,04%         | 0,06%        |
| 8  | Ácido propiónico              | 0,09%         | -            |
| 9  | Butanoato de etilo            | 0,05%         | -            |
| 10 | Ciclotetrasiloxano, octametil | 0,02%         | -            |
| 11 | 1-Propanol                    | -             | 0,12%        |
| 12 | Isovaleraldehido              | -             | 0,05%        |

En la siguiente figura se esquematiza la abundancia de los compuestos volátiles más presentes tanto para la cerveza fermentada con levadura nativa como con levadura control:

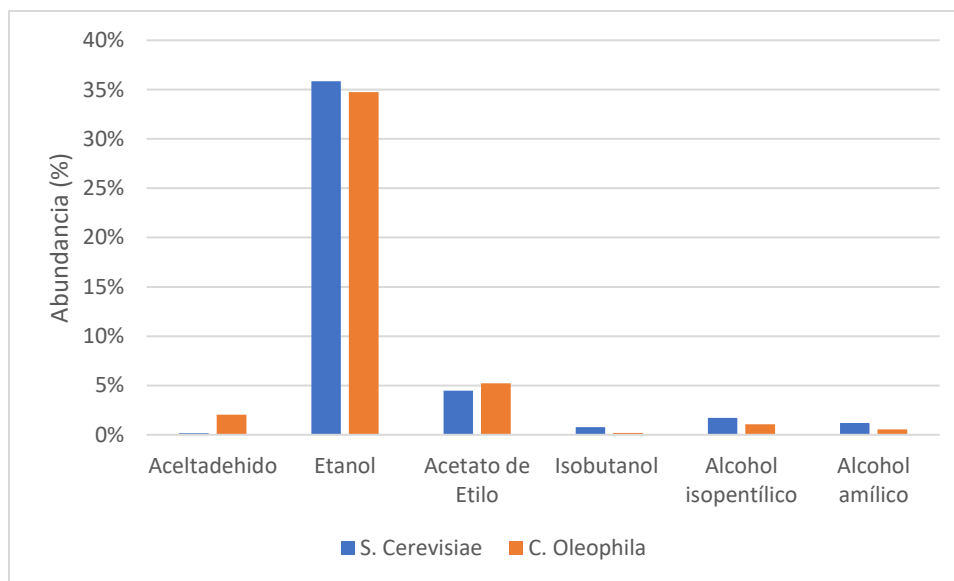


Figura 46 Abundancia de compuestos volátiles presentes en las muestras de cerveza fermentadas con levadura *S.cerevisiae* y *C. oleophila*

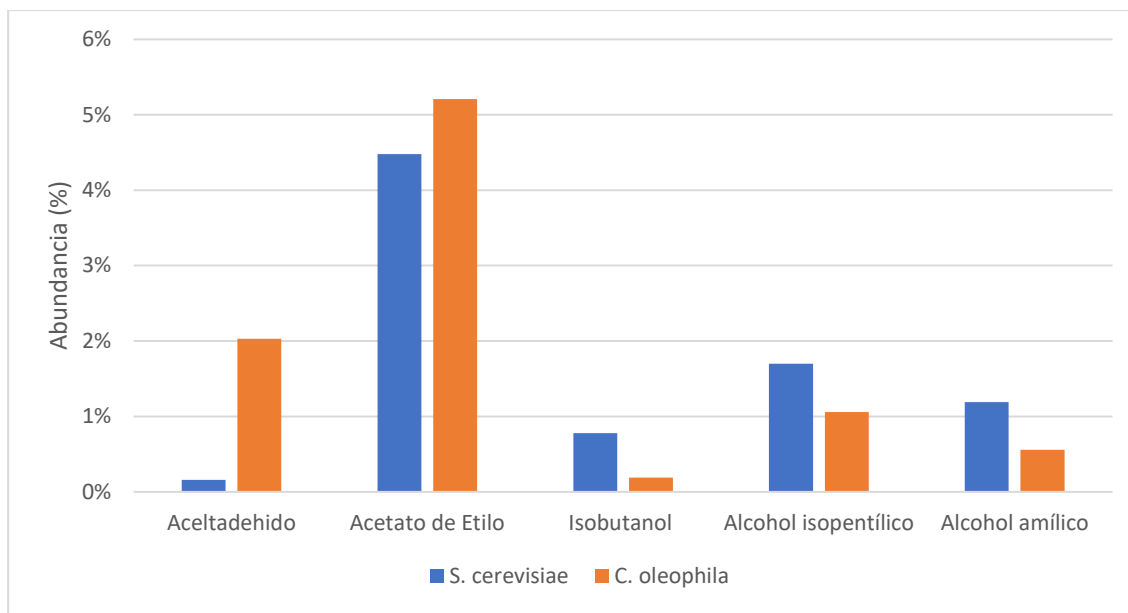


Figura 47 Abundancia de compuestos volátiles presentes en las muestras de cerveza fermentadas con levadura *S.cerevisiae* y *C. oleophila* sin Etanol

De los anteriores, algunos de los alcoholes superiores más relevantes para el sabor de la cerveza y presentes en mayor abundancia en las muestras son los siguientes, con su respectiva descripción aromática:

- Acetaldehído: Aromas afrutados y frescos, pero en exceso puede dar notas desagradables y astringentes.
- Acetato de Etilo: Contribuye a los aromas frutales y florales, a menudo asociado con la calidad de la fruta fresca.
- Propanol: Solvente, dulce, alcohol. En concentraciones altas, puede tener un impacto negativo en el sabor, percibiéndose como solvente o medicinal.
- Isobutanol: Solvente, alcohol. Puede contribuir a características más rústicas o ásperas si está presente en concentraciones elevadas.
- Alcohol isoamílico: Frutado, banana, alcohol. Aporta sabores frutales característicos y es deseado en ciertos estilos de cerveza, como las cervezas de trigo.
- Alcohol amílico: Alcohol, solvente. En pequeñas cantidades puede añadir complejidad.
- Alcohol isopentílico: Frutal, a menudo con notas de manzana verde.
- Feniletanol: Floral, rosas. Agrega aromas florales, a menudo se encuentra en ciertos estilos de cerveza como las ales belgas o cervezas especiales.

Por otro lado, se tiene las características indeseables en la cerveza, como por ejemplo el ácido acético, el cual se encuentra presente en ambas muestras, en concentraciones altas aportaría sabor a vinagre o sidra, lo que en este caso no aplica ya que como se vio en el estudio de los ácidos orgánicos la concentración de este compuesto volátil en la muestra final es bastante baja, lo que es el contenido normal del analito en una cerveza. Entre otros componentes indeseables se encuentran

el diacetilo (mantequilla), acetaldehído (manzana verde), fenoles (clavo de olor), oxidación (cartón/áspero/rancio), entre otros, de los cuales el acetaldehído está presente en ambas cervezas.

En el barrido realizado a la cerveza fermentada con levadura control ilustrado en la Figura 44 se puede observar que los picos más abundantes corresponden a etanol, ácido acético y alcohol isoamílico.

En cuanto a el caso de la cerveza fermentada con levadura nativa ilustrado en la Figura 45 se puede observar que los picos más abundantes corresponden a acetaldehído, ácido acético, alcohol isoamílico y etanol, los dos primeros correspondientes a componentes indeseables en la cerveza como se informa anteriormente y los dos últimos a características típicas y agradables en la bebida.

Cabe mencionar que el pico más abundante en ambos casos se encuentra en el minuto 5 aproximadamente y corresponde a dióxido de carbono.

En general se puede observar que ambas cervezas no presentan muchos componentes desfavorables para el sabor, siendo el más abundante de estos el ácido acético en ambos casos. Por otro lado, en ambas hay presencia de alcohol isoamílico en el producto final, aportando características propias de una cerveza tipo ale, la cual se caracteriza por sus cualidades aromáticas afrutadas.

Contrastando con la información bibliográfica, en ambas muestras se logró identificar compuestos volátiles característicos en cervezas tales como Acetaldehído, Etanol, 1-Propanol, Ácido Acético, Isobutanol, Isovaleraldehído y alcohol isoamílico.

Por otro lado, en la cerveza fermentada con levadura control se detectaron compuestos volátiles tales como Ciclotrisiloxano, hexametil-, 1-Heptanol, Ácido Butírico (Ácido butanoico, éster etílico) y Ciclotetrasiloxano, octametil-, los cuales no se observaron en la medición realizada a la muestra fermentada con levadura nativa y estos pueden ser indeseables a ciertas concentraciones.

## 5 Conclusión y Recomendaciones

### 5.1 Conclusión

Con los resultados obtenidos en el estudio realizado se confirma que la optimización de métodos para la determinación de compuestos para cada grupo de metabolitos clave es capaz de entregar resultados claros, cuantificables y detallados con el menor tiempo de análisis posible en cada caso.

Con este análisis se logró identificar la evolución de cada uno de estos analitos durante el proceso de fermentación y ver como estos incidieron en las características organolépticas del producto final.

El perfil de evolución de azúcares obtenido se relaciona con la información teórica para ambas levaduras, donde las azúcares más simples como fructosa, glucosa y sacarosa con las primeras en ser consumidas, y posteriormente se asimilan las azúcares más complejas como la maltosa y la maltotriosa. Se obtuvo una pequeña diferencia en el caso de la levadura nativa donde la concentración de maltotriosa se mantiene durante el proceso de fermentación, esto refleja que la levadura *Candida oleophila* no es capaz de asimilar a esta azúcar como lo hace la *Saccharomyces cerevisiae* la cual fue capaz de consumir la totalidad de las azúcares fermentables presentes en el mosto.

Con respecto a los ácidos orgánicos se cumple la progresiva generación de estos a medida que transcurre la fermentación en ambos casos, donde en la cerveza producida con *Candida oleophila* la disminución de pH se relaciona con el aumento de ácido málico en el proceso de fermentación, y por otro lado, en la cerveza fermentada con *Saccharomyces cerevisiae* se debe a la generación de ácido tartárico.

Con respecto al etanol, el perfil obtenido muestra un aumento exponencial del contenido alcohólico en la muestra. Se obtuvo un grado alcohólico dentro del rango típico para ambas cervezas, obteniendo un valor de 2,7 %v/v en la cerveza fermentada con levadura nativa y de 3,9 %v/v para la fermentada con la levadura control. Estas diferencias se pueden adjudicar a que la levadura control al consumir la totalidad de las azúcares fermentables en el mosto produce mayor cantidad de Etanol en la fermentación alcohólica.

Los compuestos volátiles obtenidos dieron señales de que el producto seguía las cualidades organolépticas características de una cerveza *Ale*, al presentar tonos frutales y una baja presencia de compuestos indeseables lo que hace a la cerveza producida con levadura nativa un producto innovador y con cualidades a la altura del mercado cervecero actual.

Finalmente se obtuvo que el comportamiento de ambas cervezas durante el proceso de fermentación arroja resultados con algunas diferencias. Principalmente, se observó que la levadura nativa no es tan eficiente en la fermentación de azúcares como la levadura control. Además, el perfil de sabor aportado por esta última levadura presenta notas frutales y especiadas, mientras que la levadura nativa presenta un perfil con notas más ácidas, afrutadas o complejas. Por último, la cerveza fermentada con levadura nativa presenta una menor graduación alcohólica.

En general ambos perfiles son muy similares, lo que refleja que la utilización de cualquiera de estas dos levaduras para la producción de cerveza entregaría productos similares en cuanto a apariencia y sabor/aroma, incluso una combinación de estas en el proceso de producción de una cerveza podría resultar en la obtención de un producto más aromático.

Con base en lo anterior, se puede concluir que la implementación de la levadura *Candida oleophila* en la fermentación alcohólica de la industria cervecera tiene un potencial interesante para la innovación. Esta levadura puede aportar características de sabor únicas a la cerveza, lo que permite a los cerveceros crear bebidas con perfiles de sabor distintivos y diferenciados. Además, esta implementación abre la puerta a la exploración y creación de nuevos estilos de cerveza, lo cual resulta atractivo para los consumidores que buscan nuevas experiencias sensoriales. Asimismo, la implementación de esta levadura en la fermentación cervecera contribuye a la diversificación del mercado cervecero al ofrecer una variedad más amplia de productos.

## 6 Bibliografía

- Ahmed, N. (2013). Gas Chromatography-Mass Spectrometry ( GC-MS ): Working Principle and Applications Gas Chromatography ( GC ). *Indian Institute of Technology*, 87–99.
- Allagash Brewing Company. (2022). BEER FUNDAMENTALS – BEER HAS YEAST IN IT? *Allagash Brewing Co*, 21.
- Anderson, H. E., Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*, 1085, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>
- Bamforth, C. (2003). Beer: Tap into the Art and Science of Brewing. In *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*.
- Bio-Rad. (n.d.). *Guidelines for Use and Care of Aminex<sup>®</sup> Resin-Based Columns Instruction Manual*.
- Bio-Rad. (2012). Aminex HPLC Columns<sup>®</sup>. *Bulletin 6333 Rev A US/EG*, 7–10.
- Bio Rad Laboratories. (1994). *Guide to Aminex HPLC Columns: For Food and Beverage, Biotechnology, and Bio-Organic Analysis*. 77. [http://www.hplc.sk/pdf/Biorad/Guide\\_to\\_Aminex\\_HPLC\\_columns.pdf](http://www.hplc.sk/pdf/Biorad/Guide_to_Aminex_HPLC_columns.pdf)
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). Brewing Science and Practice. In *CRC Press*. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(95\)00148-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(95)00148-4)

- Budroni, M., Zara, G., Ciani, M., & Comitini, F. (2017). Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts. *Brewing Technology*, *i*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68792>
- Buiatti, S. (2008). Beer composition: An overview. *Beer in Health and Disease Prevention*, *iii*, 213–225. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00020-1>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología*, *53*(4), 359–377. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Cajka, T., Riddellova, K., Tomaniova, M., & Hajslova, J. (2010). Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint. *Journal of Chromatography A*, *1217*(25), 4195–4203. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.049>
- Chavez-Parga, M. D. C., Pérez Hernández, E., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *18*(1). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Das, A. J., Khawas, P., Miyaji, T., & Deka, S. C. (2014). HPLC and GC-MS analyses of organic acids, carbohydrates, amino acids and volatile aromatic compounds in some varieties of rice beer from northeast India. *Journal of the Institute of Brewing*, *120*(3), 244–252. <https://doi.org/10.1002/jib.134>
- Dressler, M. (1987). Selective gas chromatographic detectors. In *Microchemical Journal* (Vol. 36, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/0026-265x\(87\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0026-265x(87)90188-3)
- Dreux, M., & Lafosse, M. (1995). *Carbohydrate analysis: high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis: Chapter 13: Evaporative Light Scattering Detection of carbohydrates in HPLC*. 515–540.
- Falqué López, E., & Fernández Gómez, E. (1996). Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol, and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *Journal of Chromatographic Science*, *34*(5), 254–257. <https://doi.org/10.1093/chromsci/34.5.254>
- Floridi, S., Miniati, E., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2001). Carbohydrate determination in wort and beer by HPLC-ELSD. *Monatsschrift Fur Brauwissenschaft*, *54*(9–10), 209–215.
- García, A., & Yusá, D. (2016). HPLC Instrumental. In *Universida Politecnica de Valencia* (Vol. 5). [www.lalibreria.upv.es](http://www.lalibreria.upv.es)
- Gomis Yagües, V. (2006). Cromatografía: Principios generales. *Repositorio Institucional de La Universidad de Alicante*, 1–16. <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>
- Han, Y., Du, J., Li, J., & Li, M. (2019). Quantification of the organic acids in hawthorn wine: A comparison of two HPLC methods. *Molecules*, *24*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112150>
- Harris, D. C. (2012). *Análisis químico cuantitativo* (3rd ed.). Reverté.
- Hasib, A., Jaouad, A., Mahrouz, M., & Khouili, M. (2002). Hplc Determination of Organic Acids in Moroccan Apricot Determinación Por Hplc De Ácidos Orgánicos En Albaricoque Marroquí Determinación Por Hplc De Ácidos Orgánicos En Albaricoque Marroquí. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, *3*(4), 207–211. <https://doi.org/10.1080/11358120209487729>

- Hill, A. E. (2015). *Managing Microbes , Ensuring Quality*.
- Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., & Young, T. W. (1982). *Chemical and physical properties of Beer. Malting and Brewing Science*. 776–838.
- Hsu, B. H., Orton, E., Tang, S. Y., & Carlton, R. A. (1999). Application of evaporative light scattering detection to the characterization of combinatorial and parallel synthesis libraries for pharmaceutical drug discovery. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 725(1), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00529-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00529-5)
- LaCourse, W. R. (2017). HPLC Instrumentation. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11123-0>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- M.McNair, H., & M.Miller, J. (1998). *Basic Gas Chromatography*.
- Martínez, A. (2015). *Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial*. 54. <https://repositori.udl.cat/handle/10459.1/48689%0Ahttps://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/48689/amartinezm.pdf?sequence=1%0Ahttp://repositori.udl.cat/handle/10459.1/48689>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175–1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>
- Metrohm. (2020). Determinación de ácidos alfa en productos de lúpulo. *Metrohm*, 4–7.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. In *Prentice Hall* (p. 296).
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013). Basic Information about HPLC. In *Essentials in Modern HPLC Separations*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385013-3.00001-x>
- Morotta, L., & Thomas, R. (2016). *The Benefits of GC / MS Coupled with a Headspace Trap to Monitor Volatile Organic Compounds in the Production of Beer*. June, 24–28.
- Nešpor, J., Karabín, M., Hanko, V., & Dostálek, P. (2018). Application of response surface design to optimise the chromatographic analysis of volatile compounds in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(3), 244–253. <https://doi.org/10.1002/jib.493>
- Nogueira, L. C., Silva, F., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Trugo, L. C. (2005). Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.074>
- Park, J. M., Shin, J. A., Lee, J. H., & Lee, K. T. (2017). Development of a quantitative method for organic acid in wine and beer using high performance liquid chromatography. *Food Science and Biotechnology*, 26(2), 349–355. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0047-9>

- Perpète, P., & Collin, S. (2000). Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. *Food Chemistry*, 71(3), 379–385. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00179-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00179-5)
- Priest, F. G., & Stewart, G. G. (2006). *Handbook of Brewing*.
- Robards, K., Haddad, P. R., & Jackson, P. E. (2004). High-performance Liquid Chromatography—Instrumentation and Techniques. *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, 227–303. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-057178-2.50008-x>
- Roberts, T. R. (2016). Hops. In *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799954-8.00003-4>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol . Revisión bibliográfica. *Icidca*, 50(1), 20–28. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Suarez, D., & Morales, Y. (2018). Basic principles of high performance liquid chromatography for the separation and analysis of mixtures. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4(1), 1–14.
- The Beer Connoisseur. (2016). Beer 101: The Fundamental Steps of Brewing. *The Beer Connoisseur*, 6, 30. <https://beerconnoisseur.com/articles/beer-101-fundamental-steps-brewing>
- The Beer Times. (2022). Cerveza sin alcohol , diferencias de elaboración y beneficios para la salud. *The Beer Times*, 3–4.
- Turner, D. (2020). Gas Chromatography – How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC | Technology Networks. *Technology Networks*. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxgc-335168>
- Turner, D. (2022). GC-MS Principle , Instrument and Analyses and GC-MS / MS. *Technology Networks*.
- Waters Corporation. (2009). 2424 Evaporative Light Scattering Detector: Operator’S Guide. *Operator’s Manual 2006-2009*, 18. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500121802rb.pdf>
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast*. Brewers Publications.
- Young, T. W. (2022). Types of beer. *Britannica*.

## 7 Anexos

### 7.1 Técnicas cromatográficas y detectores utilizados

#### 7.1.1 Cromatografía Líquida

En la cromatografía líquida (LC) la mezcla de interés se disuelve en un líquido que actúa como fase móvil que pasa a través de una fase estacionaria sólida. La fase móvil recorre por la fase estacionaria trayendo consigo los componentes de la muestra separados durante la cromatografía. En LC, la interacción entre las moléculas de la muestra y el medio cromatográfico puede basarse en varios factores, como el tamaño, la carga, la unión por afinidad o la hidrofobicidad. Existen variedades de cromatografía líquida, según las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria (fase normal versus fase inversa) y si la fase móvil está presurizada (alto rendimiento).

Opera generalmente a temperatura ambiente y no necesita considerar la influencia de la volatilidad de la muestra y la estabilidad térmica durante la separación de sustancias. Por lo tanto, la cromatografía líquida se puede utilizar para separar y analizar sustancias de alta sensibilidad térmica, vaporización difícil y no volátiles. Se utiliza principalmente para separar compuestos orgánicos de diferentes polaridades de alto peso molecular y alto punto de ebullición.

Los términos fase normal y fase reversa en cromatografía tienen que ver con las polaridades relativas de las fases móviles y estacionarias implementadas en el análisis (Moldoveanu & David, 2013)

La cromatografía de fase normal es una técnica de separación que se basa en la interacción de los analitos con grupos funcionales polares de la superficie de la fase estacionaria (Waters Corporation, 2009). En esta técnica se utiliza una fase estacionaria de elevada polaridad, por lo que los solutos más polares que se separan se adherirán más a la fase adsorbente estacionaria. Los componentes de una mezcla eluirán a diferentes velocidades dependiendo de la polaridad de cada uno en relación con el siguiente. Cuando el solvente o gradiente de solventes pasa a través de la columna, los componentes menos polares eluyen más rápido que los más polares.

Por otro lado, en la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es relativamente polar, es decir, en lugar de elegir un disolvente de fase móvil no polar, se elegirá un

disolvente polar. Con este método los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución. (Turner, 2020)

La cromatografía líquida de alto rendimiento o alta resolución (HPLC) la fase estacionaria suele tener la forma de una columna llena de partículas porosas muy pequeñas (1-5  $\mu$  m de diámetro) y la fase móvil líquida (o eluyente) se mueve a través de la columna impulsada por una bomba (a presión elevada). Los solutos se inyectan en la fase móvil como un pequeño volumen en la cabeza de la columna cromatográfica. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Moldoveanu & David, 2013). Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Al pasar el efluente de la columna a través del detector, alguna propiedad química o física del analito se transduce a una señal eléctrica y los solutos se controlan a medida que se eluyen de la columna. La señal eléctrica, que puede ser amplificada y manipulada por dispositivos electrónicos adecuados, es proporcional al nivel de alguna propiedad de la fase móvil o de los solutos.

Los detectores de HPLC se clasifican como detectores de propiedades universal, que responden a cambios de una propiedad física común a todas las especies analizadas, sean analitos, disolventes o contaminante, como índice de refracción (RI) o conductividad, o detectores de propiedades específicas del soluto o selectivos, que solo detectan aquellos compuestos que presentan una determinada propiedad del analito, como la absorbancia UV (García & Yusá, 2016). La respuesta del detector está modulada por la presencia y cantidad del analito (LaCourse, 2017). Las características destacables de un detector de HPLC son alta sensibilidad, buena estabilidad, linealidad, tiempo de respuesta corto, confiabilidad, no destructividad, facilidad de uso y poco volumen muerto. (Robards et al., 2004)

El sistema cromatográfico consta del solvente o fase móvil, posteriormente pasa por un degasificador o *degasser* para evitar daños en el equipo que puedan generarse por una fase móvil gasificada, posteriormente se encuentra una bomba que cumple la función de inyectar con presión la fase móvil dentro de una columna. También el sistema cuenta con un inyector que es donde se inyecta la muestra donde se encuentra el analito y esta muestra se incorpora a la corriente de fase móvil. Posteriormente se encuentra la columna, la cual varía y depende del analito que se quiera identificar y es específica a las necesidades éste. A continuación, se encuentra el detector, el cuál recibe y transforma la información de los compuestos, las señales que detecta y entrega el detector se reflejan en un cromatograma que corresponde a un gráfico compuestos de diversos picos de variados tamaños y alturas dependiendo de las concentraciones de los compuestos que se encuentren en la muestra analizada.

En la Figura 48 se esquematiza el sistema cromatográfico típico de la cromatografía líquida de alta resolución.

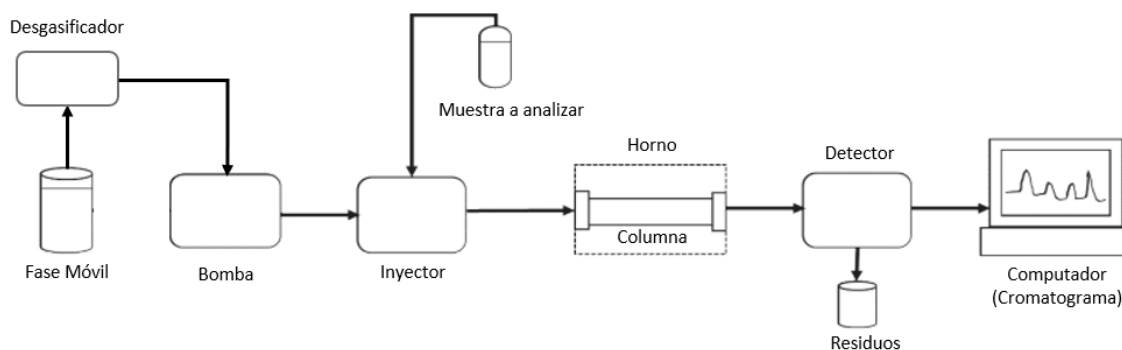


Figura 48 Sistema cromatografía líquida de alta resolución. (Suarez & Morales, 2018)

#### 7.1.1.1 HPLC ELSD

El detector ELS o *evaporative light scattering detector* por sus siglas en inglés, es un detector de dispersión de luz evaporativa empleado para la detección de componentes de muestras no volátiles en un eluyente volátil. El fundamento de este equipo se basa en que miden la luz dispersada generada por micropartículas del soluto en la muestra, transportadas por un flujo de gas y dirigidas a través de un haz de luz para dispersar la luz.

El principio de operación de este detector se basa en la nebulización del flujo del solvente proveniente de la columna de HPLC convirtiéndolo en pequeñas gotas que posteriormente son arrastradas por la corriente de gas. Las gotas son transportadas a un tubo de deriva calentado donde la fase móvil es evaporada. La tasa de flujo del gas portador y la temperatura del tubo de deriva deben ajustarse dependiendo de la fase móvil que se utilice.

Cuando un analito es menos volátil que la fase móvil, permanece en la corriente de gas en forma de partícula soluto seca que fluye hacia el detector. Una vez en el detector las partículas dispersan el haz de luz. La luz es dispersada por estas partículas residuales de material no volátil y medida por un fotomultiplicador o un fotodiodo en un ángulo de 90° o 120° con respecto a la dirección de la fuente del haz de luz (Dreux & Lafosse, 1995). La intensidad de la señal está relacionada con la concentración de soluto en el eluyente y permite la determinación del compuesto presente en la mezcla, esto teniendo como referencia el tiempo de retención de los estándares de los compuestos de interés, lo que en química analítica se define como una preparación que contiene una concentración conocida de un elemento específico o sustancia.

A diferencia de otros detectores, la respuesta entregada por el detector es independiente del solvente, por lo que puede usarse con gradientes y no es sensible a las fluctuaciones de temperatura o caudal.

Como se menciona anteriormente, en el detector intervienen tres operaciones principales: primero la nebulización (o atomización) de la fase móvil transformándose en una nube de gotas pequeñas,

posteriormente la vaporización de la nube de gotas, y finalmente la dispersión de la luz incidente por la nube de partículas residuales.

Este tipo de detección actúa como una visualización cualitativa o cuantitativa de cada soluto separado sólo si se encuentra en estado líquido o sólido después del proceso de vaporización. Este proceso de detección se limita a analitos de baja volatilidad, es decir, difíciles de analizar mediante GC.

La presión del gas y el caudal, la concentración de la muestra y el solvente utilizado como eluyente son factores clave que afectan el tamaño de partícula logrado por el proceso de nebulización y evaporación. Al optimizar estos parámetros, debería ser posible generar gotas de un tamaño lo más uniforme posible para mejorar los resultados. La pureza del gas (generalmente nitrógeno) utilizado también es clave, ya que debe estar limpio (sin aceite), seco e inerte, para evitar un fondo alto/línea de base ruidosa a fin de optimizar la detección, y debe estar disponible a velocidades de flujo de 0,5-5,0 litros por minuto.

Un análisis clave que utiliza las fortalezas de ELSD es el análisis de azúcar. Una ventaja que ofrece ELSD sobre otras técnicas de detección como IR para este análisis es que permite la elución de azúcares en gradiente. La elución en gradiente utiliza una gama de disolventes con diferentes polaridades que cambian de composición o relación para optimizar la elución de los compuestos. Los monosacáridos que incluyen fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa se han estudiado en una variedad de bebidas y muestras de frutas, generalmente mediante el uso de una combinación de fase móvil de agua y acetonitrilo con detección ELSD.

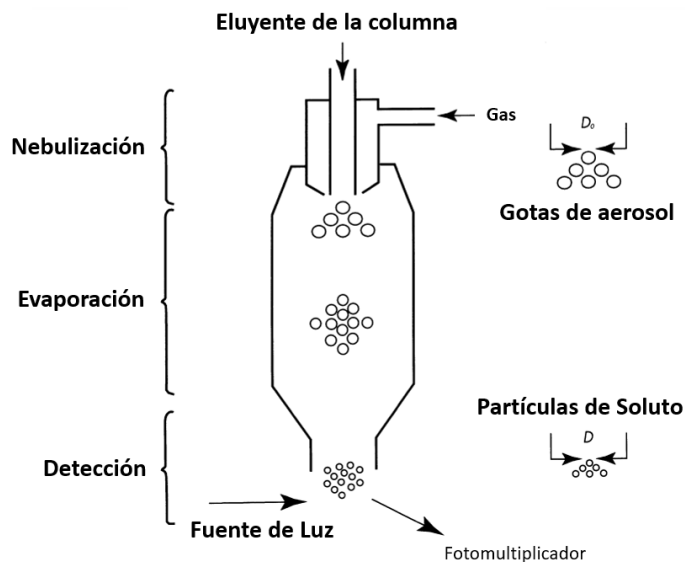


Figura 49 Detector de dispersión de luz evaporativa. (Hsu et al., 1999)

Uno de los métodos más comunes para la separación y la cuantificación de carbohidratos en la cerveza es HPLC con detector ELSD, esto ya que se ha demostrado que tiene una precisión, repetibilidad y límite de cuantificación (LOQ) aceptables para la producción y garantizar la calidad.(Anderson et al., 2019). El análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), puede

proporcionar no solo el análisis cualitativo sino también la determinación cuantitativa (Nogueira et al., 2005).

Entre los detectores posibles a utilizar acoplados a HPLC para la detección de carbohidratos en cerveza se encuentra la detección UV, pero como éste involucra el uso de bajos rangos de longitud de onda (210 nm) lo hace no selectivo para azúcares. Por otro lado, el detector de índice de refracción es aparentemente el más ampliamente utilizado para detección de azúcares, sin embargo, presenta baja sensibilidad y selectividad, sumado a que no se puede trabajar en elución de gradiente.

El detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) presenta una mayor sensibilidad en la detección, buena reproducibilidad y baja presencia de ruido en comparación a la señal. Junto con esto, permite el uso de elución por gradiente, que es esencial cuando un amplio rango de carbohidratos poliméricos debe ser separada (Floridi et al., 2001), como es el caso de éste estudio. La detección por dispersión de luz evaporativa (ELSD) se basa en la detección de moléculas de soluto por dispersión de luz después de la nebulización y evaporación de la fase móvil, por lo que es adecuado para detectar compuestos no volátiles como lípidos y carbohidratos (Nogueira et al., 2005).

La detección por dispersión de luz evaporativa (ELS) funciona nebulizando el flujo de solvente del sistema de cromatografía líquida (LC) y arrastrando las gotas resultantes en una corriente de gas. A continuación, la fase móvil en gotitas es evaporada. Cuando un analito es menos volátil que la fase móvil, permanece en la corriente de gas como una partícula de soluto "seca" y fluye hacia el detector ELS. La evaporación ocurre en función del tiempo, la temperatura y la presión del gas portador. Por lo tanto, es importante utilizar fases móviles de HPLC que se evaporen y desolvaten fácil y rápidamente.

Generalmente los carbohidratos son separados mediante HPLC usando columnas de intercambio iónico polimérico o de enlaces amino, con eluyentes acuosos isocráticos u orgánicos en gradiente (Floridi et al., 2001).

Los disolventes de punto de ebullición relativamente bajo y baja viscosidad son los mejores. Incluyen las fases móviles más utilizadas en HPLC: agua, acetonitrilo, metanol, etanol y THF. Es posible que los disolventes viscosos y de alto punto de ebullición no se separen por completo de las moléculas o especies del analito antes del paso de detección. Esto se suma al ruido de fondo y disminuye la respuesta de la señal del analito, lo que provoca una baja sensibilidad (pendiente del gráfico de calibración) y altos límites de detección (LOD). Los solventes de HPLC evaporados se condensan y capturan en la trampa de solventes recomendada y en la ruta de escape. No obstante, pueden persistir pequeñas cantidades de residuos, y estos deben expulsarse en una campana extractora para evitar que se escapen al laboratorio (Waters Corporation, 2009).

#### 7.1.1.2 HPLC UV

Un detector UV es un dispositivo en línea que mide la absorbancia UV del eluyente de HPLC y proporciona una señal continua que se puede utilizar para cuantificar la cantidad de compuestos que emergen de la columna de HPLC. Hay tres tipos de detectores UV: detectores de longitud de onda fija, longitud de onda variable y matriz de fotodiodos.

El sistema cromatográfico básico consta de una fuente de radiación, un selector de longitud de onda y un detector para medir la absorbancia del eluyente que pasa a través de una celda de flujo.

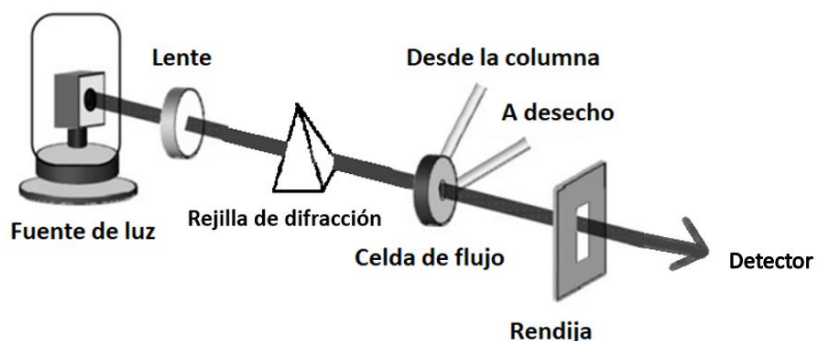


Figura 50 Sistema cromatográfico Detector UV. Fuente: Elaboración propia.

Los detectores espectrofotométricos se basan en la absorción de la luz monocromática. El grado de absorción depende de la molécula de la muestra, su concentración, la longitud de la trayectoria de la luz en la muestra y la longitud de onda de la medición. La absorbancia se encuentra regida por la conocida ley de Lambert-Beer, cuyo enunciado establece que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromático es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria. (García & Yusá, 2016)

$$A = \varepsilon c l$$

Donde  $A$  corresponde a absorbancia,  $\varepsilon$  es el coeficiente de absorción molar ( $\text{dm}^3/\text{mol cm}$ ),  $l$  la longitud de la trayectoria de la celda de flujo (cm) y  $c$  es la concentración de la solución ( $\text{mol}/\text{dm}^3$ ).

Muchas moléculas orgánicas absorben la radiación ultravioleta (UV) en un rango de longitudes de onda, desde alrededor de 100 nm hasta alrededor de 400 nm. Cuando se utiliza luz monocromática (luz de una sola longitud de onda o un pequeño rango de longitudes de onda) irradiada sobre una solución diluida de analito, se puede aplicar la ley de Beer-Lambert (ecuación 1). Los detectores de longitud de onda fija utilizan una fuente de tungsteno.

Por otro lado, el detector de onda variable, o detector de onda visible (UV-vis) utiliza una fuente de deuterio y un monocromador, que consiste en una rejilla de difracción móvil (o prisma) para la dispersión de la luz que se puede girar para seleccionar una longitud de onda específica a través de una rendija de salida, para permitir la selección de una longitud de onda particular en la región UV-vis para la detección selectiva, y de allí a una celda a través de la cual fluye la fase móvil. La cantidad de luz transmitida se mide utilizando un fotodetector adecuado o, en algunos casos, una matriz de fotodetectores (Robards et al., 2004).

Finalmente, el detector de matriz de fotodiodos o detector de arreglo de diodos (DAD) es un detector UV común que monitorea todo el espectro UV-vis del material que pasa a través de la celda de flujo utilizando un sensor de imágenes de fotodiodo, que generalmente consta de 512 o 1024 píxeles o elementos. El detector proporciona datos espectrales y de absorbancia que se pueden utilizar para cuantificación, identificación y evaluaciones de pureza máxima.

Los principales métodos reportados para evaluar ácidos orgánicos en frutas, jugos y bebidas alcohólicas fermentadas son los siguientes:

- Métodos enzimáticos: Este método es altamente específico y muchos kits comerciales están disponibles para determinar ciertos ácidos orgánicos, como ácido cítrico, ácido succínico, ácido l-málico, ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico y ácido fumárico. Sin embargo, estos kits son costosos, consumen mucho tiempo y no se puede utilizar para cuantificar todos los ácidos orgánicos en las muestras simultáneamente.
- Electroforesis capilar: Este método presenta ventajas como alta resolución, simplicidad y tiempos de análisis cortos, pero también desventajas, como una menor reproducibilidad.
- Técnicas cromatográficas: Una mejor separación se puede obtener con cromatografía iónica y cromatografía de gases, pero eran difíciles de usar ampliamente debido al alto consumo, las duras condiciones de operación, así como el tedioso pretratamiento.

Las técnicas cromatográficas son las más prometedoras y utilizadas, por su simpleza, rapidez y reproducibilidad. Dentro de estas la más utilizada es la cromatografía líquida de alta eficiencia, que requiere un mínimo de preparación de la muestra y emplea diversidad de fases estacionarias y de sistemas de detección, lo cual permite obtener resultados rápidos y precisos (Mato et al., 2005). La mayoría de los procedimientos desarrollados hasta ahora para el análisis de alimentos y bebidas utiliza fase inversa, cromatografía de partición o cromatografía de intercambio iónico con índice de refracción (RI), espectrofotometría UV, conductimétrica o detección electroquímica (Hasib et al., 2002).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es el método más popular para analizar ácidos orgánicos debido a la sencillez, rapidez y estabilidad. La columna de intercambio iónico como HPX-87H se ha utilizado para separar ácidos orgánicos porque puede separar azúcares y ácidos simultáneamente. (Han et al., 2019). Las resinas de intercambio iónico de ácidos fuertes, en combinación con detectores de índice de refracción (IR) o ultravioleta (UV), se pueden utilizar para la determinación simultánea de ácidos, azúcares y algunos alcoholes. (Falqué López & Fernández Gómez, 1996).

Los ácidos orgánicos separados por HPLC suelen ser detectado con detector ultravioleta (UV) a longitudes de onda por debajo de 220 nm donde los grupos carboxilo tienen una banda de absorción (Han et al., 2019).

#### 7.1.2 Cromatografía de Gases

En cromatografía de gases la fase móvil de este sistema cromatográfico es un gas y la fase estacionaria es comúnmente un líquido, pero también existe como sólido. Este líquido se encuentra en forma de una capa microscópica sobre un soporte sólido inerte dentro de un pequeño tubo de vidrio, por ende, la cromatografía de gases funciona como una técnica de cromatografía en columna. La muestra fluye a través del sistema de gas y se gasifica antes de ingresar finalmente a la columna cromatográfica para lograr una separación efectiva. La cromatografía de gases tiene las ventajas de alta sensibilidad, uso de muestras pequeñas, fuerte capacidad de separación, buena selectividad, amplia aplicación y análisis rápido.

La cromatografía de gases usa un gas inerte, generalmente nitrógeno o helio, también llamado *carrier* como fase móvil para transportar la muestra de interés a través del sistema. La muestra, que

puede ser líquida o gaseosa, ingresa al cromatógrafo de gases mediante la implementación de una jeringa al inyector. Conectada al inyector se encuentra la entrada de la columna, esta se encuentra localizada dentro de un horno el cual es calentado durante el proceso de análisis para eluir a los componentes, por ende, en esta sección del sistema es donde ocurre la separación de analitos. La salida de la columna se encuentra conectada al detector, quién genera una señal eléctrica en respuesta a los componentes químicos eluidos previamente. Esta señal generada es procesada por un *software* en un computador acoplado al sistema GC generando un cromatograma. (Turner, 2020)

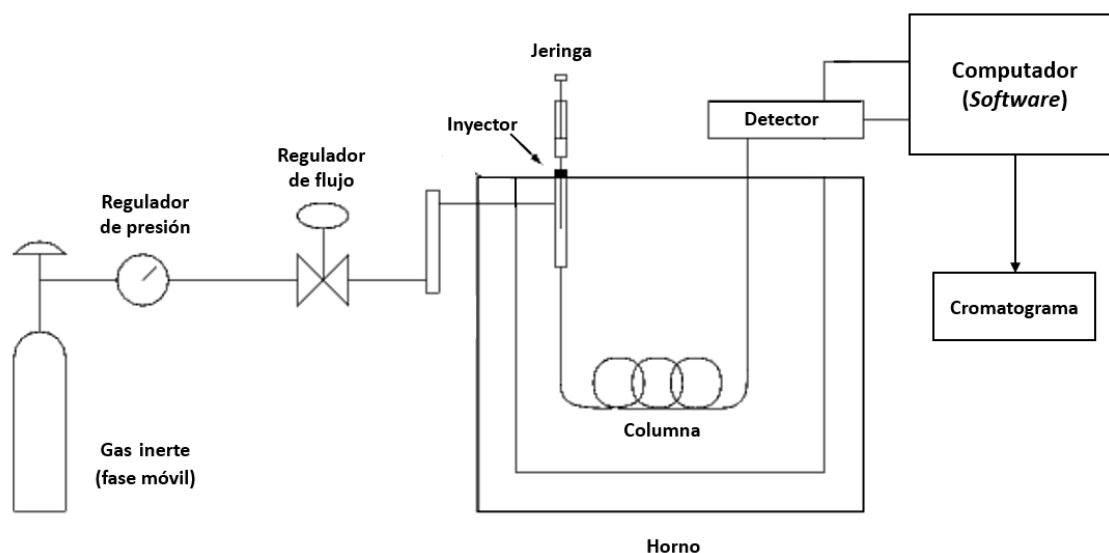


Figura 51 Sistema Cromatografía de Gases (GC). (M.McNair & M.Miller, 1998)

Posterior a la inyección la muestra es vaporizada, en caso de no estar ya en estado gaseoso. Dependiendo de la concentración de la muestra el sistema se trabaja en modo *split* o *splitless*. El modo *split* es utilizado para muestras con altas concentraciones y solo una parte de esta hace ingreso a la columna para su análisis. Por otro lado, la modalidad *splitless* es utilizada para muestras con bajas concentraciones y toda la muestra es transferida a la columna analítica.

Las moléculas más grandes de la mezcla tardan más en atravesar la columna y llegar al detector en el otro extremo. Su separación de compuestos depende del equilibrio de reparto de componentes entre la fase móvil y la estacionaria, la separación de los diferentes componentes se logra en base a su presión de vapor relativa y afinidades por la fase estacionaria. La afinidad de una sustancia hacia la fase estacionaria se puede describir en términos químicos como una constante de equilibrio llamada constante de distribución, también conocida como coeficiente de partición o reparto, que se define como la razón entre la concentración de soluto en la fase estacionaria entre la concentración de soluto en la fase móvil (Gomis Yagües, 2006). Para la elección del tipo de columna a utilizar se debe tener en consideración la volatilidad y los grupos funcionales de los analitos, habiendo columnas a base de compuestos polares y no polares

El uso de altas temperaturas en la cromatografía de gases la hace inadecuada para separar polímeros de alto peso molecular, debido a la incapacidad de estos polímeros para convertirse en vapor, por esto este método de análisis es más utilizado para separar mezclas orgánicas complejas y sistemas

bioquímicos. Para que la detección en cromatografía de gases se pueda realizar correctamente, los componentes a analizar deben ser volátiles y térmicamente estables para que no se degraden en el sistema. (Turner, 2020)

El último paso es la detección de las moléculas de analito una vez eluyen de la columna. Hay muchos tipos de detectores de GC, por ejemplo: aquellos que responden a enlaces C-H como el detector de ionización de llama (FID); las que responden a elementos específicos por ejemplo azufre, nitrógeno o fósforo; y las que responden a propiedades específicas de la molécula, como la capacidad de capturar un electrón, como se utiliza con el detector de captura de electrones (ECD). Junto con esto, durante los últimos 10 años ha habido un uso creciente de GC en combinación con espectrometría de masas (MS).

La cromatografía de gases es la técnica más utilizada para el análisis de compuestos volátiles en cerveza a nivel de laboratorio. Implementando detectores como FID o MS y complementándolo técnicas de extracción tales como Microextracción en Fase Sólida (SPME) o espacio de cabeza (Headspace) es posible obtener resultados con exactitud de manera sencilla, rápida y selectiva.

La técnica de extracción Headspace o “espacio de cabeza”, se utiliza para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en muestras líquidas y sólidas. Las muestras se introducen en un vial cerrado con aire, posterior a esto se realiza un equilibrio térmico entre la muestra y la fase gaseosa. Una vez que se llega al equilibrio termodinámico, con una jeringa o sistema de dosificación se retira una parte de la muestra que está en fase de vapor y se introduce directamente al inyector del GC.

#### 7.1.2.1 GC-MS

La cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (GC-MS) es una técnica compuesta por dos procedimientos analíticos acoplados en serie: una cromatografía de gases (GC) para la separación de compuestos volátiles y una espectrometría de masas (MS) para la identificación y determinación de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de la molécula. El GC ayuda en la separación de la mezcla de múltiples componentes para que puedan alcanzar la espectrometría de masas uno a la vez. (Ahmed, 2013)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que se puede acoplar a un GC y usarse en lugar de un detector convencional. Las moléculas neutras eluyen de la columna analítica y se incorporan al detector mediante el sistema de vacío. Una vez en el detector la muestra se ioniza en la fuente de iones para producir iones moleculares que pueden degradarse en iones fragmentados. Esta ionización ocurre mediante el uso de electrones (EI, ionización electrónica) o un reactivo químico (CI, ionización química). En esta etapa, un electrón, producido por un filamento, se acelera con 70 electronvoltios (eV) y elimina un electrón de la molécula para producir un ion molecular que es un catión radical.

A continuación, el fragmento y los iones moleculares se separan en el analizador de masas por su relación masa/carga ( $m/z$ ), típicamente un analizador de masas cuadripolar, y se detectan.

Después de que el analizador de masas haya separado los iones, estos llegan al detector donde la señal es amplificada por un multiplicador de electrones o una placa multicanal. El software de adquisición registra la señal en una computadora para producir un cromatograma y un espectro de masas para cada punto de datos los fragmentos con diferentes proporciones de masa a carga generarán señales diferentes, por lo que se detectará cualquier compuesto que produzca iones

dentro del rango de masa del analizador de masa (Turner, 2022). Los datos de un GC-MS son tridimensionales y proporcionan espectros de masas que se pueden usar para confirmar la identidad, identificar analitos desconocidos y determinar las propiedades estructurales y químicas de las moléculas, así como el cromatograma que se puede usar para el análisis cualitativo y cuantitativo.

En GC, el tiempo de retención se usa para la identificación de los analitos objetivo y, por lo general, el área se usa para la cuantificación. Para una cuantificación precisa, los picos deben tener una buena separación cromatográfica con resolución de referencia. Con GC-MS, el espectro de masas proporciona un método adicional para la confirmación del analito objetivo usando el espectro de masas completo o usando la presencia y las proporciones relativas de algunos de los iones. La cuantificación con datos de GC-MS suele ser del área de un solo ion único, ya que es menos probable que haya interferencias de los picos co-eluyentes que si se usa el área debajo del pico. Como tal, la resolución de la línea base cromatográfica no es necesaria para una cuantificación precisa, siempre que se pueda seleccionar un ion único que no esté presente en los picos co-eluyentes y, por lo tanto, los picos se resuelvan espectralmente y se pueda lograr la integración de línea base a línea base.

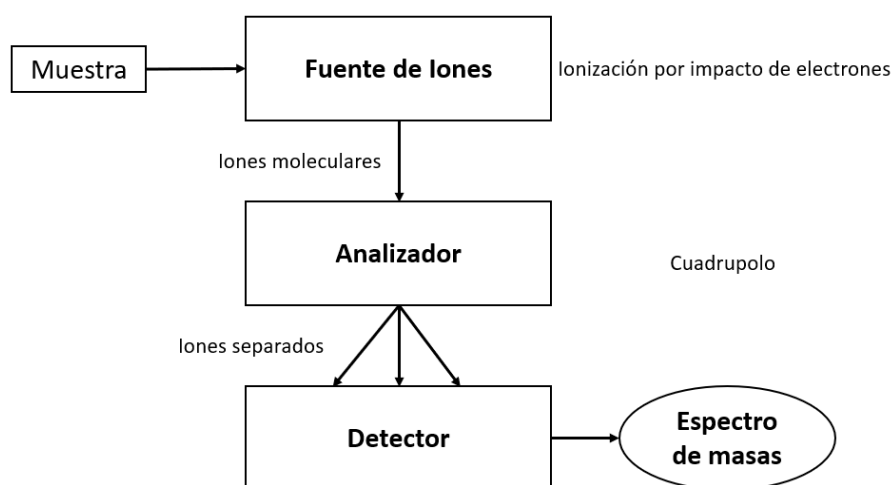


Figura 52 Esquema del espectrómetro de masas. Fuente: Elaboración propia

#### 7.1.2.2 GC-FID

El detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores más usados en la cromatografía de gases debido a su precisión y versatilidad. El principio de operación del detecto FID se basa en la detección de iones formados durante la combustión de compuestos orgánicos en una llama de hidrógeno y aire. La generación de estos iones es proporcional a la concentración de la especie organiza en la muestra por analizar. Este tipo de detector responde a analitos cuyos compuestos contienen carbono, la presencia de oxígeno y nitrógeno en la muestra disminuye la señal producida por el detector.

El gas portador con la muestra proveniente de la columna entra al detector por la parte inferior y se mezcla con gas de combustión de hidrógeno más aire (oxígeno) en el área debajo de la llama y se quema justo por encima de la punta de la llama. Se aplica un voltaje de polarización negativa entre la punta de la llama y un electrodo colector, a medida que se forman los electrones, el campo eléctrico los acelera a través del espacio entre la punta del chorro y el colector y los envía a un electrómetro. Los gases de escape de aire, dióxido de carbono y agua se ventilan desde la parte superior del cuerpo del detector (Henshaw, 2005).

A medida que se forman iones dentro del detector, estos son impulsados por un potencial eléctrico hacia un electrodo colector, produciendo una corriente diminuta del orden de picoamperios ( $10^{-12}$  A).

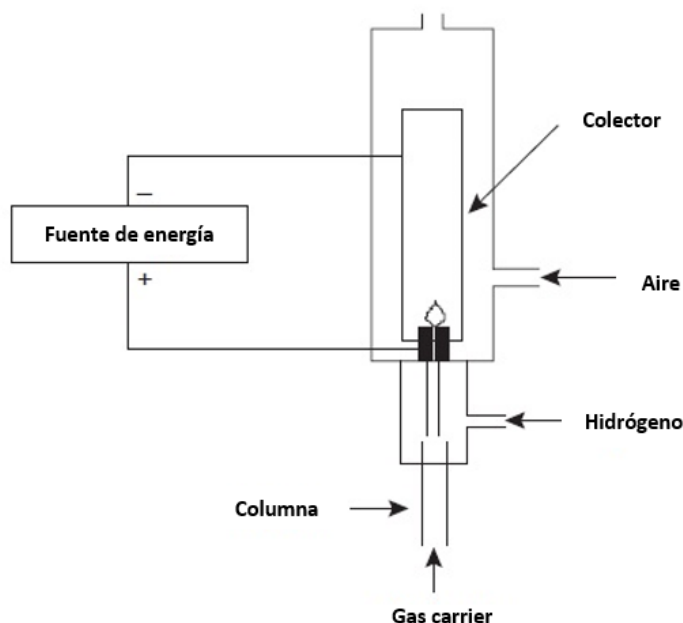


*Figura 53 Detector de ionización de llama (FID) (Dressler, 1987)*

Con respecto a la temperatura del detector, debe ser lo suficientemente alta para que los componentes que eluyen de la columna no precipiten o condensen en el detector, por lo que esta se mantiene usualmente a temperaturas sobre los 250°C y como mínimo 125°C, dependiendo de la temperatura en la que se encuentre el horno de columna. (Henshaw, 2005).

El flujo del gas transportador es un factor importante para la sensibilidad del detector y la estabilidad de la llama, usualmente rondado entre 8 mL/min y 10 mL/min, las variaciones de esta pueden ser compensadas con la modificación del flujo de hidrógeno suministrado al detector.

## 7.2 Curvas de calibración azúcares

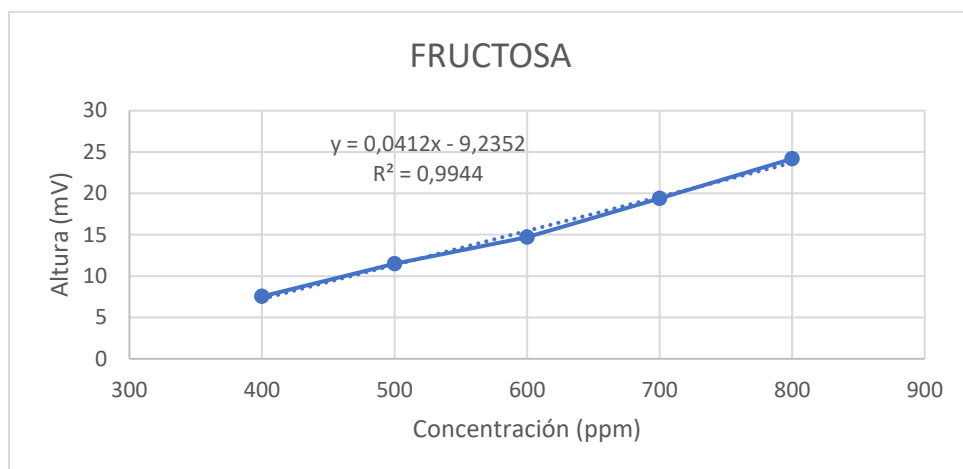


Figura 54 Curva de Concentraciones Fructosa

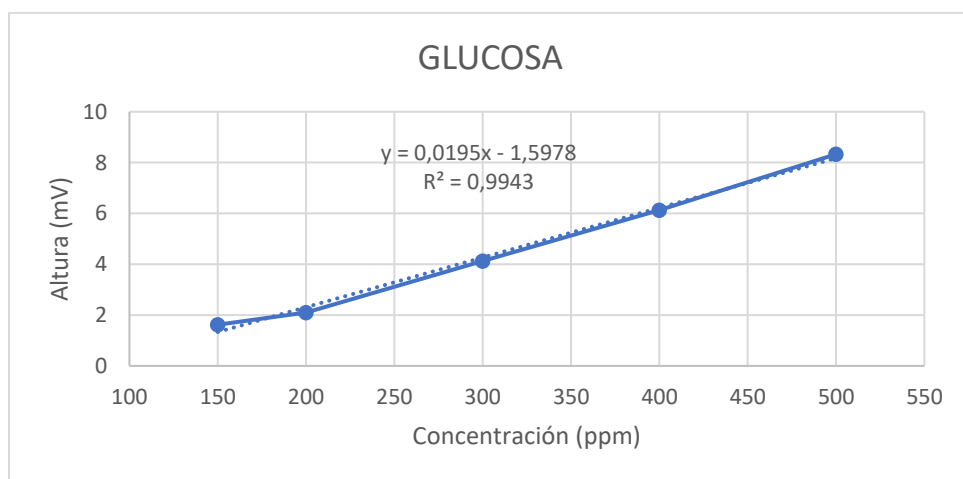


Figura 55 Curva de Concentraciones Glucosa

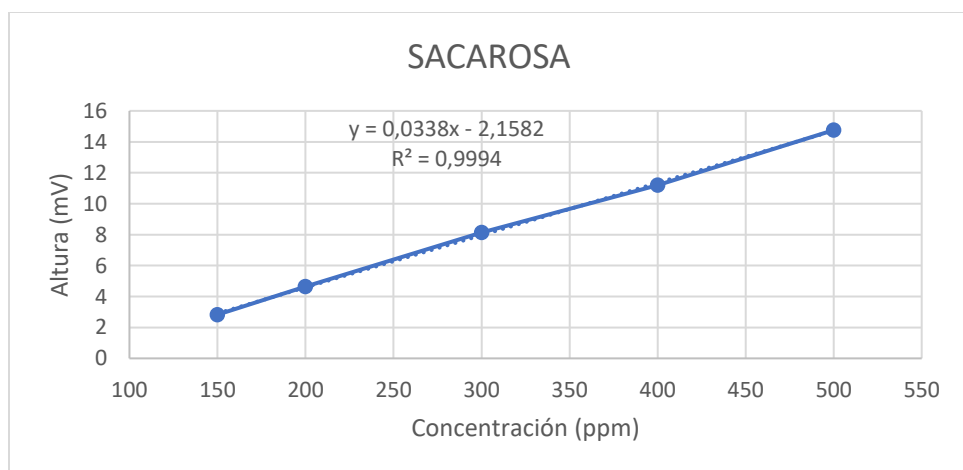


Figura 56 Curva de Concentraciones Sacarosa

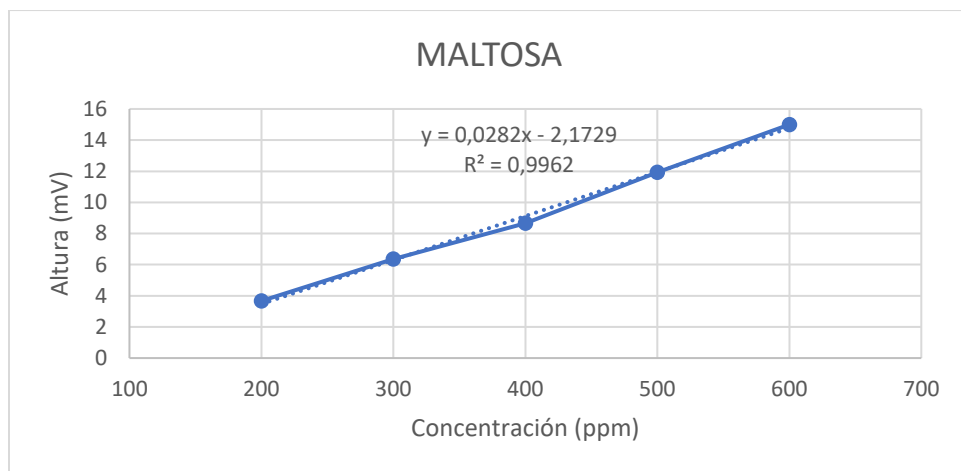


Figura 57 Curva de Concentraciones Maltosa

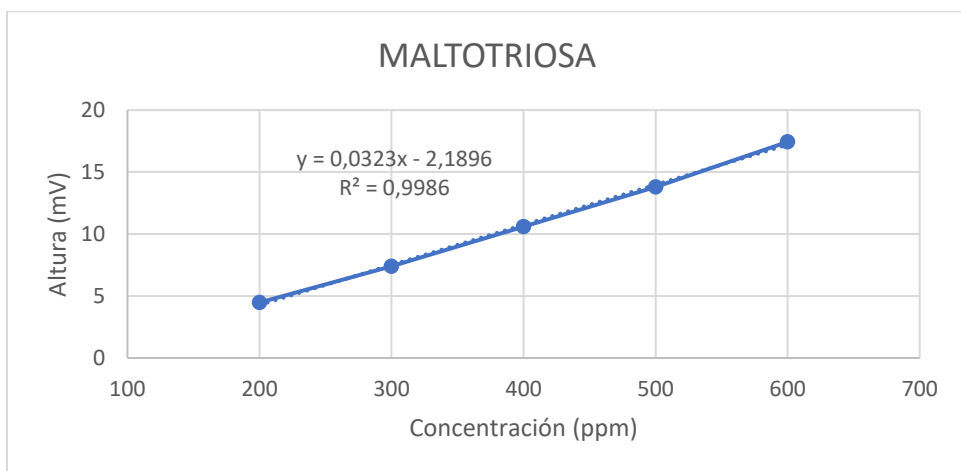


Figura 58 Curva de Concentraciones Maltotriosa

### 7.3 Curvas de calibración ácidos orgánicos

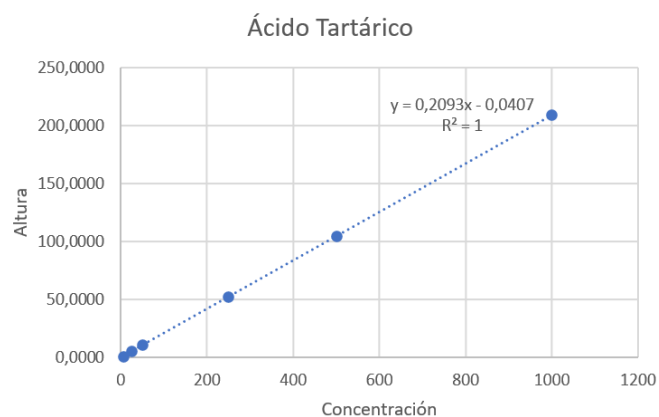


Figura 59 Curva de concentraciones ácido Tartárico

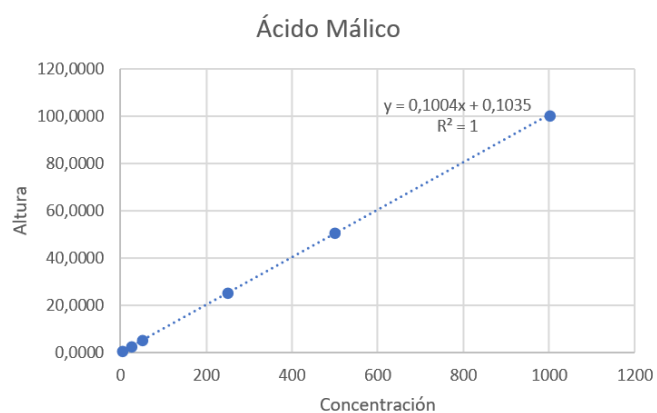


Figura 60 Curva de concentraciones ácido Málico

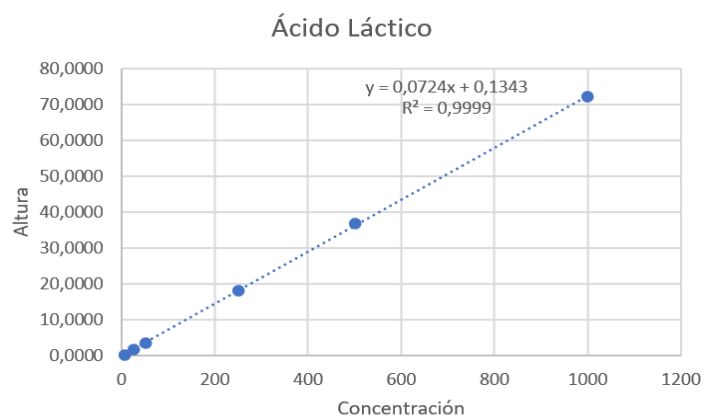


Figura 61 Curva de concentraciones ácido Láctico

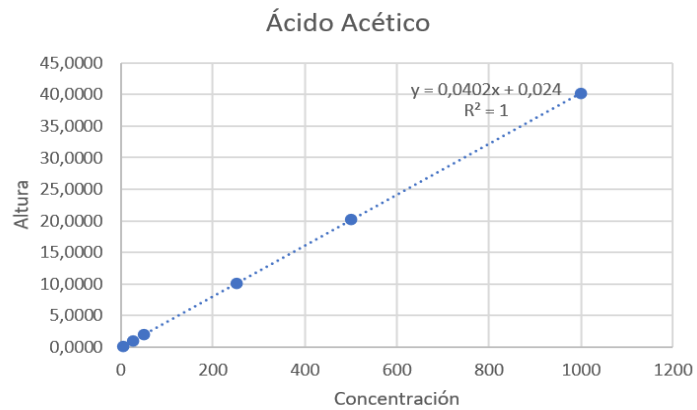


*Figura 62 Curva de concentraciones ácido Acético*

#### 7.4 Curvas de calibración Etanol

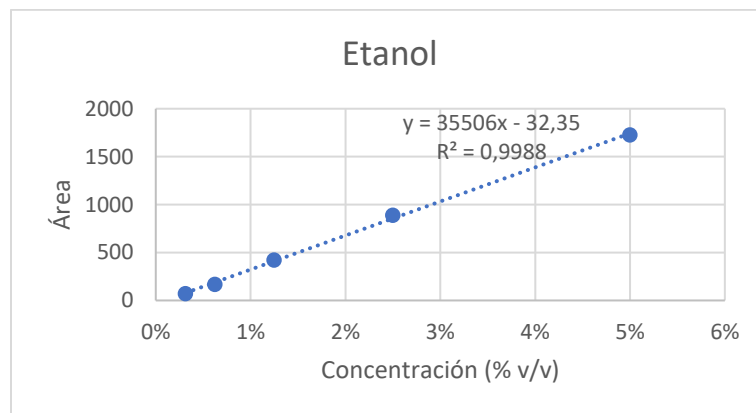


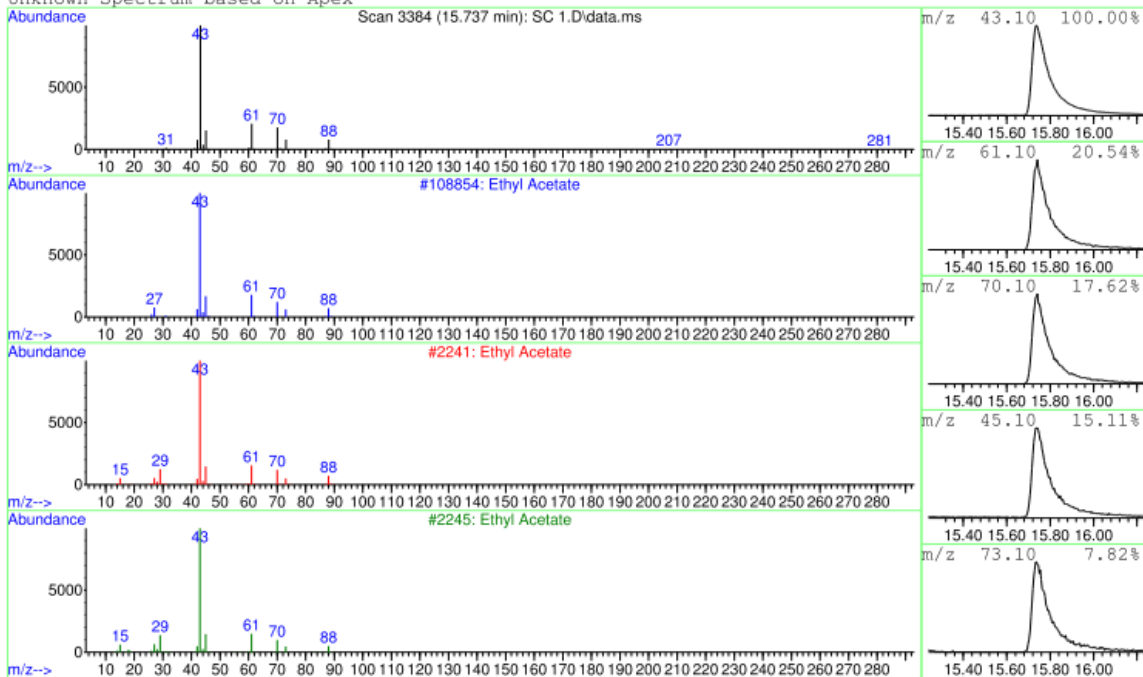
*Figura 63 Curva de concentraciones Etanol*

#### 7.5 Ejemplo de reporte entregado por cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas

## Library Search Report - Chemstation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex

Scan 3384 (15.737 min): SC 1.D\data.ms



Data File: C:\msdchem\1\DATA\Servicios\2022\Karla Rodriguez\VOLATILES (2).D\CERVEZA.M\SC 1.D  
Sample :

Peak Number: 6 at 15.737 min Area: 14084915 Area % 2.55

| The 3 best hits from each library. | Ref\#  | CAS\#       | Qual |
|------------------------------------|--------|-------------|------|
| C:\Database\NIST129K.L             |        |             |      |
| 1 Ethyl Acetate                    | 108854 | 000141-78-6 | 91   |
| 2 Ethyl Acetate                    | 108853 | 000141-78-6 | 83   |
| 3 Ethyl Acetate                    | 108855 | 000141-78-6 | 83   |
| C:\Database\NIST17.L               |        |             |      |
| 1 Ethyl Acetate                    | 2241   | 000141-78-6 | 90   |
| 2 Ethyl Acetate                    | 2245   | 000141-78-6 | 90   |
| 3 Ethyl Acetate                    | 2243   | 000141-78-6 | 83   |