

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

EVALUACION DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN EL ANALISIS DE
NITROGENO COAGULABLE EN CERVEZA



Informe de Tesis

Presentado por

Vilma Maribel Calderón Castilla

Para optar el Título de

Químico Farmacéutico

Guatemala, febrero de 1997

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

D6
06
T(1718)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

- | | |
|------------|------------------------------------|
| DECANO | Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar |
| SECRETARIO | Lic. Oscar Federico Nave Herrera |
| VOCAL I | Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez |
| VOCAL II | Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán |
| VOCAL III | Lic. Rodrigo Herrera San José |
| VOCAL IV | Br. Ana María Rodas Cardona |
| VOCAL V | Br. Hayro Oswaldo García García |

AGRADECIMIENTO:

A todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo, en especial a

Cervecería Nacional S.A.

SERPROSA

INDICE

	Pag.
Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	5
Justificaciones	19
Objetivos	22
Hipótesis	23
Materiales y Métodos	24
Resultados	31
Discusión de resultados	33
Conclusiones	37
Recomendaciones	38
Referencias	39
Anexos	43

1. RESUMEN

La cerveza es una bebida de gran consumo a nivel mundial, razón por la cual debe llenar ciertos requerimientos para poder asegurar que es un producto de calidad y que puede ingerirse con seguridad. Para ello se somete a análisis químicos y microbiológicos; entre los análisis químicos se encuentra la cuantificación de nitrógeno coagulable, el objetivo de dicho análisis es establecer la cantidad de proteínas inestables presentes en la cerveza, las cuales pueden originar turbidez en la misma, afectar su estabilidad, uniformidad de sus características, su apariencia cristalina y dorada.

El método de análisis consiste en someter a la cerveza a altas temperaturas para provocar la desnaturalización de las proteínas inestables y luego cuantificarlas, como nitrógeno coagulable, por medio del método Kjeldahl. Este método es muy sensible y cualquier cambio en las condiciones en las cuales se lleva a cabo afecta negativamente dicho análisis.

Con el propósito de establecer si el método de análisis de nitrógeno coagulable es confiable, preciso y reproducible se realizó un estudio de las condiciones en las cuales debe llevarse a cabo.

Los factores que se consideraron fueron los siguientes: temperatura de la cerveza al filtrarla, tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra y tiempo de digestión después del aclaramiento de la

muestra. Los niveles de dichos factores fueron para la temperatura de la cerveza: cerveza fría (25 grados centígrados) y cerveza caliente (100 grados centígrados), para el tiempo de almacenamiento del papel filtro 3 y 8 días de almacenamiento y para el tiempo de digestión a los 25, 30 y 45 minutos después del aclaramiento de la muestra.

Para establecer si estos factores afectan el método de análisis se realizaron 72 determinaciones, en las cuales se modificaron y combinaron todos los niveles de los factores que se evaluaron en este estudio. A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de varianza para un diseño factorial $2 \times 2 \times 3$; estableciéndose que la temperatura de la cerveza al filtrarla, el tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra y el tiempo de digestión después del aclaramiento de la muestra sí influyen en el análisis de nitrógeno coagulable.

Se recomienda continuar con el estudio del método de análisis de nitrógeno coagulable, tanto pretratamiento como método Kjeldahl para poder obtener mejores resultados y aplicar el método Kjeldahl a todas las formas de nitrógeno, lo cual sería de utilidad sobre todo en la industria alimenticia.

2. INTRODUCCION

La cerveza es una bebida que se obtiene de la fermentación de mosto preparado con cebada que se ha dejado germinar, lúpulo y agua; el producto final contiene gas carbónico además de proteínas, vitaminas, carbohidratos y sales minerales.

Las proteínas que contiene la cerveza son una mezcla de moléculas proteicas, unas con pesos moleculares que oscilan entre 10.000-60.000, puntos isoeléctricos entre pH 3.0 y 5.5 y afectan la estabilidad de la cerveza ya que producen turbidez en la misma. Otras con pesos moleculares que van desde 10.000 hasta 15.000, puntos isoeléctricos situados entre pH 5.5 y 8.0 y están asociados a la formación de espuma. Ambas le proporcionan un alto valor nutritivo a la cerveza.

Para la determinación de las proteínas que causan turbidez, la cerveza se somete a altas temperaturas para provocar la desnaturalización y consecuente coagulación de proteínas y se cuantifica el nitrógeno coagulable presente por medio del método Kjeldahl. El nitrógeno se convierte en amoníaco libre por digestión con ácido sulfúrico concentrado, se destila, se colecta en una solución ácida y se cuantifica por titulación con HCl 0.1 N. Este método es complejo y

sensible a cualquier cambio en las condiciones en las que se lleva a cabo.

En el presente estudio se realizó una evaluación de los factores que influyen en la determinación de nitrógeno coagulable; los parámetros que se consideraron son: temperatura de la cerveza al filtrarla, tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra filtrada y tiempo de digestión. Los mismos se variaron y combinaron entre sí con el objeto de determinar cómo influyen en el análisis y establecer así las condiciones en las que debe llevarse a cabo el método para que el mismo sea confiable, preciso y reproducible.

3. ANTECEDENTES

La cerveza es una bebida débilmente alcohólica que contiene dióxido de carbono, se obtiene de la fermentación del mosto preparado total o parcialmente de malta de cebada u otros cereales con materias primas azucaradas, levaduras y agua potable. Es aromatizada con lúpulo y su elemento predominante es el agua, también contiene materias nitrogenadas, dextrinas y fosfatos (1-5).

La palabra cerveza viene originalmente del verbo latín Bibere, beber. En el siglo VIII tomó la forma Peor o Bior; hoy los alemanes la llaman Bier, los franceses Biere y hasta los japoneses tienen su propia cerveza, Biru. En España y América Latina tiene su origen en la raíz latina Cerevisia derivada de Ceres, diosa de la agricultura entre los romanos, ya que el líquido se hacía con trigo o cebada; otros opinan que se deriva de la combinación Ceres, bondad de grano y Vis, vigor (1,6).

3.1. Valor nutritivo de la cerveza

La cerveza es un alimento agradable, completo y de alto valor nutritivo (7,8). Contiene cantidades variables de alcohol, azúcares no fermentados, dextrinas (1,5), 2.9 g de proteínas por litro (1,5,7,9), 31 g de carbohidratos por litro (7,9), 85-90% de agua (2); es extraordinariamente rica

en vitaminas: riboflavina, niacina, piridoxina y folacina (5,7,9). Contiene metales traza y otros minerales: calcio, fósforo, magnesio, azufre, potasio, hierro, cobre, manganeso, cinc y bajas cantidades de sodio (5,7,9). Además contiene sales minerales, subproductos metabólicos de la levadura y materias extractivas vegetales menos conocidas (5).

Es baja en grasas, el alcohol le proporciona aproximadamente 7 cal/g pero puede contener más calorías de los ingredientes extras que no sean alcohol (9).

Las proteínas son sustancias nitrogenadas extremadamente complejas, que constituyen los elementos primordiales de las células vivas de los vegetales, animales y el organismo humano. El hombre no puede sintetizarlas y, como son los elementos más importantes en la alimentación, tiene que procurárselas mediante alimentos que las contengan (10).

Contiene 200-260 mg/ml de colina que tiene un efecto favorecedor en la motilidad intestinal; éste es un importante constituyente de fosfátidos como lecitina y su derivado acetilcolina es la sustancia fisiológica excitadora del nervio vago (8).

3.2. Virtudes medicinales atribuidas a la cerveza

Los médicos le atribuyen a la cerveza grandes virtudes medicinales (11) ya que **su uso moderado** puede reducir el riesgo de infarto al miocardio, mejorar la calidad de vida de

las personas de edad madura, para mujeres gestantes o lactantes, para el tratamiento de enfermedades renales, nerviosas y alérgicas y porque contribuye a la nutrición (9,11).

Existen estudios de casos controlados, bien diseñados y ejecutados que indican que el riesgo de enfermedades coronarias al corazón, especialmente el infarto al miocardio, es menor en personas que usan moderadamente cerveza que en los abstemios. Los estudios mostraron una correlación inversa de la arteroesclerosis coronaria y la ingestión de alcohol; y una correlación positiva de la ingestión de alcohol y los niveles elevados de suero de lipoproteínas de alta densidad (AD), que parecen ser un factor negativo de riesgo para el infarto al miocardio (9).

Estudios realizados determinaron que personas que bebían alcohol regularmente tienen tiempos de vida más largos, los abstemios tuvieron una tasa de mortalidad 60% más alta, las personas que tomaron diariamente un jarro de cerveza (aproximadamente un litro) durante todo el estudio presentaron el menor riesgo de muerte, las que consumieron más de un litro presentaron riesgo de muerte muy altos. De esta forma se estableció que el consumo recomendado está entre uno y tres vasos de cerveza diarios, esta cantidad se considera dentro de los límites moderados (11).

La cerveza es muy útil en la dieta geriátrica. Los médicos indican una reducción en las calorías consumidas por

los adultos que tienen edad cercana a los setenta años, esto se debe a la disminución de su metabolismo y de su actividad física. Ellos requieren de un suplemento de alimentos de fácil digestión y que no formen depósitos de grasa en el organismo ya que es desfavorable para el corazón y el sistema circulatorio en general. Los médicos incluyen a la cerveza junto con carne, pescado, leche y jugo de frutas en la dieta ideal que cumple con esos requerimientos. La cerveza y la levadura de cerveza son fuentes útiles de vitaminas y se dice que tiene influencia rejuvenecedora en los sistemas digestivo, nervioso y urinario. Además la cerveza tiene propiedades antisépticas y bacteriostáticas que disminuyen el conteo de microorganismo gram positivos (12).

En el Hospital de Milán se comprobó que la cerveza estimula la producción de leche en las madres lactantes. Después de dos días de tratamiento con un litro de cerveza diario, se alcanzó una producción diaria de 360 g de leche. Los médicos trataron de obtener los mismos resultados con un tratamiento a base de agua mineral descarbonatada, pero no se logró aumentar la producción de leche materna en absoluto (11,13).

Un estudio clínico de los efectos de la cerveza en pieles alérgicas fué hecho en un Hospital de Roma bajo los auspicios de Center Biological Research on Beer y se encontró que un litro de cerveza al día reduce las reacciones alérgicas que presentan ciertas personas. Esto se debe a que

los alergenicos producen ciertos cambios que no son normales en los capilares de la piel, la habilidad del cuerpo a resistir esos cambios es ayudada por ciertos constituyentes de la cerveza especialmente el Factor Preventivo de la Pelagra (vitamina PP o Ácido nicotínico), riboflavina (vitamina B₂) y algunos consideran que también la tiamina (vitamina B₁). La cerveza indirectamente también contribuye a la disminución de los síntomas alérgicos por un incremento del vigor de los procesos digestivos y también por llevar a cabo una separación más completa de la degradación de productos de proteína los cuales son responsables en gran medida de las alergias debidas a los alimentos (11,14).

La cerveza en cantidades moderadas posee una acción sedante, tomada a la hora de acostarse produce sueño tranquilo y profundo. Es agradable al paladar y otorga un sueño tranquilo sin molestias, contrariamente a los efectos adversos que producen los somníferos en comprimidos o en bebida (7,9,11).

La cerveza también posee efecto diurético debido a su bajo contenido de sodio y alto de potasio; se ha determinado científicamente que luego del consumo de un litro de agua el cuerpo elimina 385 ml de orina mientras que al ingerir un litro de cerveza elimina 1012 ml. Por ello la cerveza puede incluirse en dietas para pacientes con problemas de retención de líquidos tales como los que tienen enfermedades cardíacas y renales (9,11).

Los datos presentados no deben ser considerados como contratorios de la evidencia que **el beber en exceso es dañino para la salud** y que puede producir accidentes de tráfico, síndrome fetal del alcohol, adicción y que la cerveza al estimular el apetito automáticamente produce aumento de peso, hipertensión y eventualmente enfermedades circulatorias. Quien recomiende la cerveza como bebida ideal, debe estar plenamente consciente de los peligros que encierra el exceso de su consumo y que los alcohólicos como regla general deberán abstenerse del consumo de alcohol en cualquier nivel (9, 14).

3.3. Efectos de las proteínas en la Cerveza

Hay aproximadamente 5% de materiales nitrogenados en el total de sólidos de la cerveza, los cuales representan 4% del peso de una cerveza normal. Este grupo de materiales nitrogenados consisten en complejos altamente biopolimerizados tales como proteínas, peptidos y ácidos nucleicos (15, 16) así como moléculas relativamente pequeñas como aminoácidos, aminos, purinas y vitaminas (15).

Los compuestos nitrogenados se derivan primariamente de las proteínas de cebada y secundariamente de otros materiales usados en la fabricación de cerveza (15). Durante el proceso de malteo y fabricación, las proteínas sufren hidrólisis enzimática por las ribonucleasas (15,16), desnaturalización

termal, reacciones con otros constituyentes y eventualmente acción de las levaduras (15).

Las sustancias nitrogenadas son absorbidas y utilizadas por las levaduras como nutrientes para su crecimiento y supervivencia así como para síntesis de componentes citoplasmáticos (15-17).

Durante el metabolismo de las levaduras algunos compuestos importantes del sabor; tales como alcoholes de alto peso molecular, ésteres, compuestos carbonilo y sustancias nucleotídicas son formados y liberados por la célula. Por lo tanto es razonable pensar que los constituyentes nitrogenados contribuyen significativamente a las características de la cerveza terminada como el sabor, la espuma y la opalescencia (15-18).

El total de nitrógeno contenido en el mosto varía considerablemente. La variación depende grandemente del cereal utilizado, del malteo y las condiciones de malteado. Enzimas en la malta, preparadas de variedades apropiadas de cebada, han sido usadas para incrementar el contenido de nitrógeno. La producción de compuestos nitrogenados solubles durante el malteo es dependiente de variables tales como la temperatura, el tiempo y el pH. Aproximadamente 6% de nitrógeno del mosto se debe al contenido de purina. El porcentaje de purina es afectado inversamente por la temperatura de malteo (15).

El contenido de ácidos nucleicos predominantes en el

mosto es uridina, citosina, citidina, guanosina, adenina, adenosina y uracilo. La adenocina monofosfato también está presente en cantidades sustanciales. En la mayoría de los casos, el total de ácidos nucleicos es más alta en el mosto que en la correspondiente cerveza terminada. Hay sin embargo, ácidos nucleicos presentes en la cerveza los cuales no pueden ser detectados en el mosto; por ejemplo inosina, xantina y metiluracilo. Estos son liberados probablemente después que los nucleótidos son hidrolizados por las nucleotidasas (15).

El problema del enturbiamiento de la cerveza por el frío o por oxidación es importante en la producción de la misma. El enturbiamiento por el frío es la turbidez reversible que se forma cuando la cerveza se enfría a temperaturas de cero a un grado centígrado y desaparece cuando la cerveza vuelve a la temperatura ambiente, la turbidez por oxidación o de pasteurización es la turbidez irreversible que podría desarrollarse en la cerveza embotellada, almacenada a temperatura ambiente, posiblemente por oxidación del material (19).

Se sabe que el material responsable del enturbiamiento por el frío es un compuesto complejo formado entre las proteínas fragmentadas de la cebada y el tanino del lúpulo (19).

Se han encontrado cuatro tipos de proteínas en la cebada: albúminas, globulinas, prolaminas (hordeínas) y

glutelinas. Cada tipo consiste en dos o más fracciones; la globulina, por ejemplo, se compone de alfa, beta, gama y delta globulina (19); la hordeína en alfa, beta, gama, delta y epsilon hordeína (20).

Algunas de estas fracciones sufren cambios considerables durante el malteado. Las hordeínas, las glutelinas y la gama globulina se hidrolizan parcialmente. Las albúminas y la alfa globulina permanecen inalteradas, mientras que la delta globulina desaparece completamente (19).

Nueve fracciones proteínicas aparecen en el mosto: albúmina, beta globulina, cinco fracciones de hordeína y dos fracciones de gluteína.

Durante la cocción del mosto con el lúpulo ocurre alguna desnaturalización o fragmentación de las proteínas. Esto cambia la solubilidad de éstas y además resulta en la formación de grupos sulfhidrúlicos. Una pequeña porción de las proteínas fragmentadas se combina con el tanino del lúpulo formando así el complejo del enturbiamiento por el frío. Se ha demostrado que este complejo se compone de 65% de proteína y 35% de tanino, aproximadamente. Se ha encontrado que la porción proteínica se compone de beta-globulina, así como de una fracción relacionada con la hordeína y una fracción relacionada con la glutelina (19).

La transformación del material responsable por el enturbiamiento por el frío al material insoluble que forma la turbidez de oxidación puede explicarse en parte al suponer la

oxidación de los grupos sulfhidrilo de la cisteína, un componente de la beta globulina, y de las fracciones glutelínicas desnaturalizadas. Esta oxidación forma las uniones disulfhidrúlicas que hacen a la proteína insoluble. Tal oxidación puede ser causada por el oxígeno que pudiera encontrarse en la cerveza embotellada y que es activado por ciertos metales (19).

Otro fenómeno de importancia en dicha transformación es la polimerización de las moléculas proteínicas desnaturalizadas que eventualmente resulta en la precipitación de los polímeros (19).

3.4. El método Kjeldahl para nitrógeno coagulable

El método Kjeldahl debe su nombre al bioquímico dinamarqués Johann Kjeldahl y su método de determinación de nitrógeno, logrado en 1883, es fundamental en la materia y aún conserva validez (4).

Kjeldahl trabajó corto tiempo en la industria cervecera, luego se convierte en asociado del Laboratorio Carlsberg donde continuó su trabajo en problemas relativos a la industria cervecera (20).

El problema de cambios de la cantidad de proteína en los granos condujo directamente a una investigación de un método que superara las insuficiencias de los existentes en la época. Kjeldahl dedicó tiempo completo a la solución de este

problema y cuando cada detalle y cada paso estuvo bien ensayado lo publicó en Zeitschrift für analytische chemie. El método fué inmediatamente un éxito porque era más simple, confiable y también porque podía ser mejorado. Kjeldahl supo de las limitaciones de su método y que no era aplicable a todas las formas de nitrógeno, con muchos compuestos él encontró que el nitrógeno era sólo parcialmente recuperado (21).

Kjeldahl probó primero el método de Wanklyn; una destilación con permanganato alcalino, pero dió bajos resultados. Se obtuvieron mejores resultados con permanganato y ácido sulfúrico diluido, primero se sometía a ebullición y luego se hacía alcalino con el alcali fijado, se destilaba dentro de un ácido estándar y se titulaba el exceso. Su método final consistió en calentar la sustancia en ácido sulfúrico concentrado, hasta ebullición, entonces se oxidaba con permanganato en polvo. El recomendó la adición de ácido sulfúrico fumante y anhídrido forfórico al ácido sulfúrico que contenía la muestra y se calentaba por dos horas. Después de la adición de permanganato, la solución fué subsecuentemente diluida, se agregaba cinc y se destilaba dentro de ácido estándar. Luego se agregaron ioduro de potasio y iodato al destilado y el ioduro liberado se titulaba con tiosulfato estándar (21).

Heffner, Hollrung y Morgen compararon el método Kjeldahl con el de Will-Varrentrapp en numerosos compuestos orgánicos.

En el 94% de los compuestos chequeados, el método de Kjeldahl dió resultados más altos (21).

Modificaciones y mejoras siguieron rápidamente a la publicación de su método. Se encontró que la velocidad de reacción con el ácido sulfúrico concentrado se aceleraba con el uso de catalizadores. Wilfarth estudió y reportó la adición de óxidos de hierro, mercurio, manganeso, bismuto, cinc, plomo y cobre a la mezcla de digestión y sus sales formaron complejos, afectando la recuperación en la digestión; pero ésto fué superado con el uso de sulfuro, tiosulfato de sodio, monofosfato de sodio o xantato de potasio previo a la digestión. El descubrimiento de Wilfarth de la acción catalítica de varios metales fué probablemente la contribución más importante al método Kjeldahl y pronto el uso de catalíticos fué universal (21).

Existe gran cantidad de trabajos publicados de catalíticos simples y combinados. El selenio, sugerido primero por Lauro, tuvo un mérito considerable como catalítico aunque ha sido objeto de mucha controversia. Este no es tan seguro como el mercurio, pero posee la ventaja de que no necesita un pretratamiento; Davis y Wise, pensaron que era adaptable a las condiciones generales del laboratorio como el mercurio (21).

Milbauer estudió el efecto de los catalizadores en la oxidación de sustancias tales como hidrógeno, monóxido de carbono, sulfuro de carbono y sucrosa con ácido sulfúrico;

encontró que la actividad catalizadora varió con la temperatura y el material que se oxida. Los resultados indicaron que el selenio es el más efectivo catalizador simple y SeO_2 - HgSO_4 (1:1) y SeO_2 - CuSO_4 (3:1) la mezcla más efectiva (21).

Una objeción para el método Kjeldahl fué el tiempo tan largo que se necesitaba y la desventaja obvia de tener que usar una muestra muy pequeña para no prolongar más el tiempo de digestión. Para incrementar la severidad de la reacción y con eso reducir el tiempo de digestión, Glunning en 1889, propuso la adición de sulfato de potasio como un medio de elevar el punto de ebullición de la mezcla de digestión (21).

Kjeldahl usó permanganato de potasio como agente oxidante pero la atribución de éste fué dudosa y se descartó su uso, por ello se usa el ácido sulfúrico, el peróxido de hidrógeno y el ácido perclórico pero deben ser manejados con cuidado porque reaccionan de forma más o menos violenta (21).

La recuperación de amonio ha sido aprovechada por varios ángulos. Kjeldahl, en su método original, después de agregar alcali, destilaba el amonio dentro de un volúmen conocido de ácido estándar, agregaba yoduro de potasio, iodato, titulaba el yoduro liberado con tiosulfato de sodio estándar. Este método más o menos incómodo ha sido reemplazado enteramente por una retrovaloración de un volúmen conocido de ácido estándar o por valoración directa con el uso de ácido bórico como propuso Winkler (21).

Actualmente, el método Kjeldahl representa una cantidad tremenda de investigación. Bredig y Brown determinaron que la conversión y la oxidación de anilina era una reacción de primer orden; Schwab y Agallidis confirmaron esto. Self y Carpiaux establecieron que una cantidad definida de ácido debe estar presente en el final de la digestión, Self estableció que un exceso de por lo menos 10 g de ácido era necesario, también reportó las cantidades aproximadas de ácido sulfúrico necesario para la descomposición de varios tipos de materiales orgánicos, por ejemplo, para las proteínas se necesitan 9 g de ácido (21).

4. JUSTIFICACION

La cerveza es una bebida de alto consumo a nivel mundial, los nutricionistas la consideran una fuente importante de nutrientes por lo cual es muy utilizada en la preparación de alimentos.

Se le atribuyen virtudes medicinales ya que tiene efectos terapéuticos en el tratamientos de enfermedades alérgicas, renales, cardíacas, nerviosas, del colesterol; se considera que mejora la calidad de vida de los ancianos y estimula la producción de leche en madres lactantes.

Constituye una fuente importante de trabajo para muchas personas y para los Gobiernos de muchos países constituye una de las mejores fuentes de ingresos por el pago de impuestos.

No sólo por ser considerado un producto de gran consumo sino que también por ser un alimento, debe someterse a evaluación de los requerimientos que debe cumplir con respecto a higiene, estabilidad y contenido para asegurar que es una bebida de calidad y que puede ingerirse con seguridad.

Para ello se somete a análisis físico, químico y microbiológico. Uno de los análisis químicos realizados es la determinación de nitrógeno coagulable que forma parte de las

proteínas que se encuentran en la cerveza. Dichas proteínas al encontrarse en grandes cantidades pueden originar turbidez lo cual constituye un factor determinante que afecta no solo la apariencia cristalina y dorada de la cerveza sino que también su estabilidad y la uniformidad de sus características.

El análisis cuantitativo del nitrógeno coagulable se lleva a cabo por medio de un pretratamiento que consiste en someter a la cerveza a alta temperatura (107 C) durante cinco horas con el objeto de desnaturalizar las proteínas. Las proteínas desnaturalizadas son cuantificadas por medio del método Kjeldahl como nitrógeno coagulable. Este procedimiento es muy sensible y cualquier cambio en las condiciones en las cuales se lleva a cabo puede alterar significativamente los resultados del análisis. Por lo anterior se considera de mucha utilidad establecer qué factores pueden alterar negativamente dicho método, así como también es importante poder comprobar si la técnica utilizada es confiable, válida y reproducible para la cuantificación de proteínas inestables como nitrógeno coagulable.

El método Kjeldahl desde su publicación ha sido objeto de muchas investigaciones, modificaciones y mejoras para hacerlo aplicable a todas las formas de análisis de nitrógeno.

Todas las investigaciones que se realicen sobre el método Kjeldahl son, por tanto, importantes y de mucha utilidad ya que éste es un método ampliamente utilizado, sobre todo en la industria alimenticia.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Estandarizar el método de cuantificación de nitrógeno coagulable para la determinación de proteínas inestables en cerveza.

5.2. Específicos

5.2.1. Establecer qué factores influyen en la estabilidad del método de cuantificación de nitrógeno coagulable en cerveza.

5.2.2. Determinar las condiciones en que debe llevarse a cabo el método de análisis de nitrógeno coagulable para que tenga validez, confiabilidad y reproducibilidad.

5.2.3. Determinar a través del análisis de nitrógeno coagulable la estabilidad y uniformidad de las características de la cerveza.

6. HIPOTESIS

El análisis de nitrógeno coagulable en cerveza es afectado por la temperatura de la cerveza al filtrarla, por el tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra y por el tiempo de digestión.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. UNIVERSO DE TRABAJO

Lo constituye cervezas pasteurizadas y embotelladas en envases de doce onzas.

7.2. MEDIOS

7.2.1. Recursos Humanos

Autora: Br. Vilma Maribel Calderón Castilla

Asesor: Ing. Jorge Luis Domínguez Monterroso

7.2.2. Recursos Materiales

7.2.2.1. Materiales

Baño maría de acero inoxidable

Mangueras

Probetas de vidrio de 25 y 200 ml

Balones de fondo redondo

Condensadores

Tubos de digestión Büchi

Erlenmeyer de vidrio de 250 ml

Pipetas de 1 y 25 ml

Bureta 25 ml

Papel filtro especial para nitrógeno coagulable

7.2.2.2. Reactivos

Acido sulfúrico concentrado

Tabletas Kjeldahl de selenio

Acido bórico 2%

Hidróxido de sodio 45%

Glicerina

Indicador para titulación: verde bromocresol-rojo
de metilo (10:4)

7.2.2.3. Equipo

Estufa de digestión

Destilador

7.3. PROCEDIMIENTO

Para poder evaluar cómo afecta la temperatura de la cerveza que se ha sometido a un pretratamiento al ser filtrada, el tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra y el tiempo de digestión en la determinación de nitrógeno coagulable se utilizaron cervezas embotelladas en envases de doce onzas de un mismo lote y se almacenaron en un lugar fresco y oscuro. Periódicamente se determinó la estabilidad de la cerveza (apariencia, olor, sabor).

7.3.1. Preparación de la muestra

Remover el dióxido de carbono; transferir la muestra a un erlenmeyer, agitar suavemente primero y después vigorosamente, guardar a una temperatura entre 20 y 25 grados centígrados, si es necesario, remover el material suspendido por medio de filtración (22).

7.3.2. Nitrógeno coagulable

Medir 100 ml de cerveza descarbonatada y transferir a un balón de fondo redondo de 300 ml. Llevar a ebullición en baño maría de acero inoxidable, usar una solución tal que alcance una temperatura de 107 grados centígrados, ebullición durante cinco horas (23).

Filtrar el contenido del balón con papel filtro especial y lavar el balón con 100 ml de agua destilada caliente, fraccionada en tres porciones (23).

Colocar el papel filtro en el tubo de digestión Büchi y agregar una tableta Kjeldahl, dos perlas de ebullición y 25 ml de ácido sulfúrico concentrado (23).

Colocar los tubos en la estufa de digestión y calentar suavemente hasta que se produzca espuma. Cuando la producción de espuma decrezca aumentar la temperatura gradualmente, continuar el calentamiento hasta que el color café desaparezca y la solución mantenga una claridad definida,

prolongar el calentamiento treinta minutos más (23).

Enfriar los tubos de digestión y diluir la muestra con 100 ml de agua destilada y 70 ml de hidróxido de sodio 45%, destilar hasta obtener un volúmen de destilado de 180 ml, recibir el estilado en un erlenmeyer de 250 ml que contenga 25 ml de ácido bórico 2.5% y 0.5 ml de la solución indicadora para titular (23).

Al concluir la destilación, titular la solución de amoníaco en ácido bórico con ácido clorhídrico 0.1 N (23).

Realizar como mínimo 48 determinaciones; los factores a tomar en cuenta son: la temperatura de la cerveza al filtrarla, el tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra filtrada y el tiempo de digestión. Los niveles de dichos factores son para la temperatura de filtración: cerveza fría y cerveza caliente, para el tiempo de almacenamiento de la muestra: tres y ocho días de almacenamiento del papel filtro en refrigeración y para el tiempo de digestión a los 25, 30 y 45 minutos después que la muestra se aclara. Combinar todos los niveles entre sí para poder establecer cuáles son los factores que influyen en la determinación de nitrógeno coagulable.

El porcentaje de nitrógeno cuagulable se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$(ml \text{ de HCl } 0.1 \text{ N gastados} - \text{BLK})(F \times 5 \times 12)$$

$$\text{NC} = \frac{\text{-----}}{\text{-----}}$$

P

En donde:

NC = porcentaje de nitrógeno coagulable

BLK = blanco corrido

F = normalidad de la solución tituladora/ 0.0715

P = Extracto original

5.12 = factores de conversión (23)

7.3.3. Extracto original

Pesar 200 g de cerveza descarbonatada en un balón de fondo plano de 500 ml previamente tarado y agregar 100 ml de agua destilada. Conectar una trampa y enseguida un condensador, asegurar que la salida del condensador esté dentro de un balón aforado de 100 ml tarado que contiene 10 ml de agua destilada, destilar hasta obtener 170 a 180 ml de destilado, tomar en cuenta el agua agregada con anterioridad (24).

Pesar el destilado y llevar a un peso de 200 g más o menos 0.1 g con agua destilada y mezclar, luego medir la gravedad específica a veinte grados centígrados, con cinco decimales, con picnómetro (24).

Pesar el residuo del balón y llevar a 200 g más o menos 0.1 g con agua destilada y mezclar, luego medir la gravedad específica a veinte grados centígrados, con cinco decimales (24).

Los valores de gravedad específica obtenidos del destilado se convierten en porcentaje de contenido alcohólico en peso con la tabla 2 de extractos publicada por Methods of Analysis of the American Society Brewing Chemist (ASBC) y los valores de gravedad específica del residuo de la destilación en grado plato (g de extracto/100 g de solución) por medio de la tabla 1 de extractos publicada por ASBC (24).

El valor del extracto original se calcula de la siguiente forma:

$$P = 100 \times \frac{2.0665(A) + E_r}{100 + 1.0665(A)}$$

Donde

P = Extracto original

A = Porcentaje de contenido alcohólico en peso

E_r = Extracto real (grado plato) (24)

7.4. Análisis Estadístico

Llevar a cabo un análisis de varianza para un diseño factorial 2 x 2 x 3, si existen diferencias entre los factores individualmente aplicar la Prueba de Fisher de la mínima diferencia, si las diferencias son entre dos o más factores usar gráficos de interacción.

Los factores a evaluar son: la temperatura de la cerveza

al filtrarla, el tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra y el tiempo de digestión. Los niveles para dichos factores son para la temperatura de filtración: cerveza fría y cerveza caliente, para el tiempo de almacenamiento de la muestra: tres y ocho días de almacenamiento del papel filtro en refrigeración y para el tiempo de digestión a los 25, 30 y 45 minutos después del aclaramiento de la muestra.

Realizar 48 determinaciones, como mínimo, y combinar cada uno de los niveles mencionados, para poder establecer cuáles son los factores que afectan el análisis de nitrógeno coagulable.

Llevar a cabo la determinación del porcentaje de nitrógeno coagulable con 48 cervezas pasteurizadas y embotelladas en envases de doce onzas, que pertenezcan a un mismo lote y seleccionadas al azar.

Mantener la cerveza en baño maría a 107 grados centígrados, durante cinco horas, filtrar con papel filtro especial y posteriormente determinar la cantidad de nitrógeno coagulable, en porcentaje, por medio del método Kjeldahl.

8. RESULTADOS

	Tiempo de almacenamiento 3 días	Tiempo de almacenamiento 8 días	Tiempo de almacenamiento 3 días	Tiempo de almacenamiento 8 días
t digestión (min)	Filtrado en frío %NC	Filtrado en frío %NC	Filtrado en caliente %NC	Filtrado en caliente %NC
25	13.378	12.383	3.033	8.517
30	9.237	35.017	10.095	2.312
45	17.267	8.753	10.712	13.245

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Se realizaron 72 determinaciones, a los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza para un diseño factorial $2 \times 2 \times 3$, encontrándose diferencias significativas entre los factores que se evaluaron por lo que se aplicaron gráficos de interacción (ver anexos).

Por medio del análisis de varianza se estableció que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la temperatura de la cerveza al filtrarla: cerveza fría y cerveza caliente, al combinar los factores temperatura de la cerveza al filtrarla-digestión y al combinar los tres factores temperatura de la cerveza al filtrarla-digestión-tiempo de almacenamiento del papel filtro.

No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en el tiempo de almacenamiento del papel filtro: 3 y 8 días, en la combinación almacenamiento del papel filtro-digestión, ni en la combinación almacenamiento del papel filtro-filtración de la cerveza.

La diferencia en la temperatura de la cerveza al filtrarla se debe a la solubilidad de las proteínas a diferente temperatura, en la cerveza caliente las proteínas son más solubles que en la cerveza fría, por lo que al estar fría la cerveza precipitan las proteínas que han sido desnaturalizadas durante el pretratamiento y al filtrar la cerveza quedan retenidas en el papel filtro. En cambio al

estar caliente la cerveza, las proteínas están en solución y no pueden recuperarse por medio de filtración. Por ello la cerveza debe enfriarse después del pretratamiento ya que la temperatura de la misma influye en el análisis.

Las combinaciones filtración en frío, tres días de almacenamiento del papel filtro y 30 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra; filtración en frío, 8 días de almacenamiento del papel filtro y 45 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra; filtración en caliente, tres días de almacenamiento del papel filtro y 30 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra; filtración en caliente, ocho días de almacenamiento del papel filtro y 45 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra fueron las únicas combinaciones en las cuales se obtuvieron valores de porcentaje de nitrógeno coagulable más altos al filtrar la cerveza caliente, esto se debió a que la digestión antes del aclaramiento de la muestra se hizo muy rápida y a una temperatura muy alta y la digestión debe hacerse lenta, la temperatura debe aumentarse poco a poco hasta llegar a la máxima temperatura (máxima capacidad de la estufa Buchi) cuando la muestra se aclara y no antes como se hizo con esas muestras.

En la combinación temperatura de la cerveza al filtrarla-tiempo de digestión después del aclaramiento de la muestra (gráfica No. 1, ver anexos), se observa que existe diferencia significativa a los 25 y 30 minutos de digestión

después del aclaramiento de la muestra mientras que a los 45 minutos tiende a desaparecer dicha diferencia, ya que los valores de porcentaje de nitrógeno coagulable son casi iguales en ese tiempo de digestión. Por lo que el tiempo de digestión de la muestra después del aclaramiento de la misma es un factor importante en el análisis de nitrógeno coagulable.

Al combinar los tres factores que se tomaron en cuenta en este estudio se obtuvo que las combinaciones filtración de cerveza fría, 8 días de almacenamiento del papel filtro y 30 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra y la combinación filtración de cerveza fría, 3 días de almacenamiento del papel filtro y 45 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra son significativamente diferentes ($p < 0.05$) a las otras combinaciones, mientras que las demás combinaciones no son diferentes entre sí ($p > 0.05$) (gráfica No. 2, ver anexos).

Las combinaciones de los factores donde existe diferencia significativa entre ellas son las adecuadas para realizar el análisis de nitrógeno coagulable, sin embargo, en la gráfica No. 3 (ver anexos) se observa claramente que la combinación filtración de cerveza fría, 3 días de almacenamiento del papel filtro y 45 minutos de digestión después del aclaramiento de la muestra es la adecuada para realizar el análisis de nitrógeno coagulable ya que por medio de ésta se obtiene un porcentaje de nitrógeno coagulable más

cercano al valor esperado, 16.1 % , según análisis realizado por el Instituto de Investigación de Cerveza y Malta VLB de Berlin.

El papel filtro que contiene la muestra debe secarse y luego almacenarlo en refrigeración ya que la cerveza es un medio ideal para el crecimiento de hongos y levaduras por lo que debe manejarse con mucho cuidado para evitar el crecimiento de estos microorganismos ya que pueden afectar los resultados del análisis.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. La temperatura de la cerveza al filtrarla, el tiempo de almacenamiento del papel filtro que contiene la muestra y el tiempo de digestión después del aclaramiento de la muestra afectan significativamente el análisis de nitrógeno coagulable.
- 10.2. Las condiciones adecuadas para realizar el análisis de nitrógeno coagulable son las siguientes: la cerveza debe filtrarse fría (25 grados centígrados), el papel filtro que contiene la muestra puede almacenarse durante un máximo de tres días y el tiempo que se prolonga la digestión después del aclaramiento de la muestra es de 45 minutos.
- 10.3. El papel filtro que contiene la muestra debe secarse después de la filtración y debe almacenarse en refrigeración.
- 10.4. La digestión de la muestra debe ser lenta, aumentando la temperatura paulatinamente. La máxima temperatura de la estufa Buchi debe obtenerse hasta que la muestra se aclara.
- 10.5. Un menor % de nitrógeno coagulable indica mayor estabilidad y uniformidad en la cerveza debido a una menor cantidad de proteínas inestables.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Continuar con estudios referentes al método de análisis de nitrógeno coagulable, tanto pretratamiento como método Kjeldahl, para poder obtener mejores resultados en un método específico.

- 11.2. Continuar con la investigación del método Kjeldahl para hacerlo aplicable a todas las formas de nitrógeno y así poder utilizarlo en el análisis de proteínas de alimentos específicos y de otros productos.

12. REFERENCIAS

- 12.1 Enciclopedia Cultural. 2da. ed. México: Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana. Vols. 15, vol. 4 y 7, 1971. (p. 278-282,140,141).
- 12.2 Lacorte C. Química Industrial; Industrias Orgánicas. 3ra. ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial El Ateneo, 1951. 625 p. (p. 256-258,276,277).
- 12.3 Egan H, Kirk R, Sawyer R. Análisis químico de Alimentos de Pearson. 2da. ed. México: CECSA, 1987. 586 p.
- 12.4 Diccionario Hispánico Universal; Enciclopedia de Lengua Española. Panamá: Editorial Volcán, S.A.. Vols. 2, vol. 1 y 2, 1964. 1463 p. (p. 322,1013,290).
- 12.5. Raymond K, Othmer D. Enciclopedia de Tecnología Química. México: Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana. Vols. X, vol. IV, 1962. XVIII + 1038 p. (365,366).
- 12.6 Weeks M. Beer and Brewing in America. New York, USA: Brewers Foundation, 1949. 75 p. (p.1-29).
- 12.7 Valor Nutritivo de la Cerveza. ALAFACE 1988; 12:37,67,68.
- 12.8 Tropp C. Cerveza y la Dieta Clínica. Wallerstein Laboratories Communications 1963; XXVI: 198.
- 12.9 Turner T, Lee Bennett V, Hernández H. El Lado Benéfico del Consumo Moderado de Alcohol. ALAFACE 1990;20:75-89.
- 12.10 El Tesoro de la Juventud; Enciclopedia de Conocimiento.

7ma. ed. México: WM Jackson, Inc.. Vols. 20, vol. 12,18 y 8, 1967. 367 p. (p. 144,70,71,30,31).

- 12.11 Von Seitz G. Por supuesto! La Cerveza es muy Saludable. ALAFACE 1989; 18:61-64.
- 12.12 Maggio M, Traina U. Cerveza como Alimento para la Edad. Wallerstein Laboratories Communications 1963; XXVI:198.
- 12.13 Bignani P. Valor Nutritivo de Cerveza para Madres. Wallerstein Laboratories Communications 1963; XXVI:199.
- 12.14 Granelli U, et al . La Influencia de la Cerveza en Pielles Alérgicas. Wallerstein Laboratories Communications 1963; XXVI:199.
- 12.15 Chen E, Van Gheluwe G, Buday A. Effect of Mashing Temperature on the Nitrogenous Constituents of wort and Beer. ASBC 1973; 6:6-10.
- 12.16 Morten M. Wort Composition: With Special Reference to the Use of Adjunts. MBAA 1976; 13:78-90.
- 12.17 Owades J, Jakovac J. Nitrogen Metabolism during Fermentation; fate of ammonia. ASBC 1959; 18.
- 12.18 Piendl A. American and European Barleys: A Comparison in the Carbohidrates, Amino Acids, Organic Acid and Mineral Content of Malts. The Brewers Digest 1977; 40:40-44.
- 12.19 Causas del Enturbiamiento de la Cerveza. Wallerstein Laboratories Communications 1956; XIX: 127-141.
- 12.20 Proteínas de la Cebada y de la Malta. Wallerstein Laboratories Communications 1963; XXVI:127.

- 12.21 Bradstreet RB. The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. United States: Academic Press, Inc., 1965. Viii + 239 p. (p.1-7,9-12,15,16,19-21,39,41,68-79,89,90,97-100,147-153).
- 12.22 Williams S. Official Methods of Analysis. United States: Association of Official Analytical Chemists, Inc., 1984. XXVI + 1141 p. (p.16,192,196).
- 12.23 Kruger E, Bielig H. Betriebs und Qualitätskontrolle. (p.118,119,210,211).
- 12.24 European Brewery Convention. Analytica-EBC. 4ta. ed., Zwitterland, 1987. (p. E-149,E-150).
- 12.25 La Cerveza en la Historia. Wallerstein Laboratories Communications 1963; XXVI: 31-36.
- 12.26 Hough JS. Biotecnología de la Cerveza y de la Malta. Burgos J., trad. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A., 1990. XIV + 194 p. (p. 3-47, 65-131).
- 12.27 Lehninger AL. Bioquímica; Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 2da. ed. Calvet F, Bozal J, trad. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A., 1982. XXiii + 1117 p. (p. 59,60,64,65).
- 12.28 Ligth A. Protein, Structure and Function. New Jersey, USA: Prentice-Hall, Inc., 1974. V + 165 p.
- 12.29 Feeney RE, Whitaker JR. Protein Tailoring for Food and Medicinal Uses. United States: Marcel Dekker, Inc., 1986. Xii + 392 p. (p. 92-95,155-159).

- 12.30 Schearaga HA. Protein Structure. 2da. ed. New York, USA: Academic Press, Inc., 1964. XIV + 305 p. (p. 81-83).
- 12.31 Lawrie RA. Proteins as Human Food. Great Britain: White Friars Press Ltd., 1970. XVii + 525 p. (p. 280-297).
- 12.32 Moeller J, Thoms H. Enciclopedia Completa de Farmacia. Tirado E, García E, trad. Madrid, España: Editorial Saturnino Calleja, S.A.. Vols. XX, vol. XI. 981 p. (p. 147,148).

13. ANEXOS

13.1. Historia

La cerveza es tan antigua como la agricultura; cuando el hombre prehistórico cultivó la tierra, la materia prima para fabricar cerveza fué preparada por sus manos (6). Este "descubrimiento" de la cerveza por los primitivos labradóres del suelo a mediados de la Edad de Piedra fué el resultado de observaciones casuales. La mujer tenía que ablandar sus hogazas de centeno y preparar la harina de cebada o trigo remojándola en agua después que se había endurecido, al olvidarse de ellos por unos días produjo un líquido agrídulce que al beberlo hacía que la gente estuviera feliz y elevara su valor en la batalla. Este líquido fué una forma primitiva de cerveza y tuvo un rápido desarrollo. El pan se horneaba con una pasta hecha dejando que los granos germinaran y se secaran. El pan se partía, se maceraba con agua y se dejaba por un día entonces comenzaba a fermentar, el líquido obtenido era cerveza y estaba asociado con la fabricación de pan (25).

La prueba actual de la fabricación de cerveza es un sello mesopotamio que data de 6200 años aproximadamente y muestra de trabajos en un tanque de cervecería (6).

Los primeros productores de cerveza fueron los sumerios en el milenio IV A.C.. La fabricación y distribución de la

cerveza fué supervisada y controlada por el rey y los sacerdotes. La cerveza fué un constituyente importante de la dieta y cada sumerio tenía derecho a una ración diaria; dos litros para los trabajadores, tres para las clases medias y cinco para los sacerdotes (25).

Entre los babilonios, que aprendieron la agricultura y cervecería de los sumerios, el líquido estimulante y aliviador de preocupaciones fué también un alimento importante. Parte del salario de un hombre era pagado con cerveza o "pan líquido" como se le llamaba (25).

En Egipto se atribuía su invención a Osiris (1), su fabricación y distribución estaba dominada por los sacerdotes y funcionarios. La cerveza junto con el pan se guardaban con otros productos agrícolas en grandes almacenes públicos. Los soldados y funcionarios recibían veinte hogazas de pan y dos jarras de cerveza por día para él y su familia, los esclavos que trabajaban en la construcción de pirámides podían saciar su sed con toda la cerveza que necesitaran. Aún en la muerte, cualquiera que fuera la clase social, había jarras de cerveza junto con otros artículos de uso diario para su largo viaje al más allá (25).

Pronto la conocieron los hebreos y los griegos (1). Para los griegos la cerveza era como medicina y fué una bebida para las clases pobres (25).

También los romanos miraban la cerveza como una bebida bárbara y un pobre sustituto del vino. Pero para los galos y

germanos la cerveza fué una bebida diaria y los intentos de los conquistadores romanos de prohibir las cervecerías estuvieron todos destinados al fracaso (25).

Referencias escritas, lo mismo que pinturas, muestran que los antiguos arianos, chinos, babilonios, egipcios, griegos y romanos fabricaban cerveza. En 1911, en Alemania, se encontró un jarro herméticamente cerrado que contenía cerveza triturada hecha en los días de la ocupación romana XVI siglos antes (6).

La fabricación de cerveza llegó a las Islas Británicas antes de la legión del César, los antiguos sajones celebraban bodas, coronaciones y ceremonias religiosas con Alu, cerveza inglesa, (6).

En la Edad Media la fabricación de cerveza, como muchas otras artes fué concentrada en las manos de hombres de iglesia pero pronto los laicos también se convirtieron en fabricantes de cerveza, profesión que llegó a ser muy próspera y respetada. La cerveza se convirtió en una bebida estándar en todas partes de Europa (6).

La cerveza también acompañó a Cristóbal Colón en cada uno sus viajes, quien encontró a los nativos de América Central que fabricaban y utilizaban una clase de vino hecho de maíz, parecido a la cerveza inglesa (6).

A lo largo de la historia, la cerveza, se desarrolló junto con la ciencia; así la fabricación de la misma recibió un gran impulso con la refrigeración artificial, su

descubrimiento hizo posible que las cervecerías operaran independientemente del estado del tiempo. La primera planta comercial de aire acondicionado fué instalada en Alejandría en una cervecería en 1890 (6).

En 1876 el científico francés Louis Pasteur, publicó su artículo "Estudios en Cerveza", él descubrió que la fermentación era causada por una célula simple llamada levadura y demostró que las levaduras eran organismos que podían ser controlados (6).

Poco después el científico danés, Emil Christian Hansen, descubrió levaduras "salvajes" mezcladas con levaduras ordinarias en gran cantidad y que causan problemas en la fermentación. Hansen enseñó a los productores de cerveza a producir cultivos puros de levaduras y también el control en la fermentación (6).

Los científicos en muchos campos unieron sus fuerzas para estudiar cada aspecto de la fabricación de cerveza, los químicos encontraron procesos mejorados para la malta de cebada y la trituración de la misma, los agrónomos mostraron a los granjeros cómo seleccionar y mejorar el cultivo de cebada, así como otros granos y lúpulo; los bacteriólogos enseñaron la necesidad de saturación absoluta, mucho después otras industrias de alimentos aplicaron la pasteurización y esterilización en sus productos (6).

Durante la primera y segunda Guerra Mundial la producción de cerveza disminuyó notablemente debido a que la



materia prima y combustible utilizada en la fabricación se reservó para uso posterior, en la producción de alimentos. Después de las guerras continuaron las restricciones para la conservación de granos y los productores de cerveza colaboraron en la siembra y cosecha de granos (6).

Foco a poco, las cervecerías establecieron su producción normal. Actualmente la cerveza es una bebida consumida ampliamente en todo el mundo y su producción alcanza niveles altos (6). Durante el presente siglo el progreso científico mejoró la técnica de fabricación (5).

13.2. Fabricación de la cerveza

Las principales etapas de la fabricación de la cerveza son la preparación de un extracto fermentable (mosto) de cebada malteada y granos de otros cereales, ebullición del mosto con lúpulo para introducir sabor, fermentación del mosto enriquecido con lúpulo y levadura, separación de las células de la levadura de la cerveza y finalmente maduración y acondicionamiento. La cerveza madura es filtrada, luego embotellada o envasada en latas para proceder posteriormente a su pasteurización, además puede ser distribuida en barriles (2,3).

La malta de cebada es la principal materia prima usada para preparar cerveza y suministra la mayor parte de enzimas y el almidón (5). Después de la limpia mecánica de la cebada,

ésta se pone en remojo o maceración, se quitan los granos que flotan o sea que son defectuosos y se renueva el agua varias veces, para evitar putrefacción. Durante el tiempo de maceración la cebada absorbe de 40 a 45 % de agua. Se deja escurrir la cebada remojada y se lleva a salas de germinación, sótanos oscuros que deben estar bien ventilados, porque la planta naciente respira oxígeno y desprende bióxido de carbono, que debe eliminarse (1).

La cebada germinada y del embrión, nacen las raicillas y el tallo o plúmula. Se forman las diastasas y parte del almidón se convierte en maltosa. Este azúcar y las peptonas procedentes de la desintegración de las proteínas alimentan la planta embionaria. Cuando las raicillas han alcanzado otro tanto de la longitud del grano, éste contiene el máximo de diastasas. Entonces, se interrumpe la germinación, pues si se prolonga, disminuyen las diastasas. Para ello, se deseca el grano y después se tuesta (1).

La cebada germinada, con un 40 a 45% de agua, se llama malta verde. Esta se pone en locales moderadamente calientes y aireados, extendida en capa delgada y se convierte en malta seca al aire, conserva el 12% de agua. Se tuesta en hornos especiales así pasa a ser malta tostada o simplemente malta (1). Con el tueste; las proteínas se solubilizan, parte del almidón se convierte en dextrina y las materias albuminoideas se transforman en otras distintas que sirven para la nutrición de las células ovoideas que forman el hongo que

constituye la levadura (1,3).

Después del tueste, la malta pasa a los aparatos de limpieza y luego se tritura entre cilindros, se le agrega agua y se lleva a la cuba de sacarificación para proceder a la maceración, en donde se mezcla con más agua por agitación mecánica. Entonces es cuando se verifica la conversión del almidón en maltosa o azúcar de malta, por la acción de la amilasa. La peptasa peptoniza las proteínas (1,2).

Terminada la sacarificación, se hace pasar el mosto a través de un filtro y se transfiere a la caldera, donde hierve con lúpulo (1).

Los principales componentes del mosto son maltosa, glucosa, dextrinas y peptonas. Al hervirlo con el lúpulo, disuelve de éste el ácido tánico (tanino), las sustancias amargas y el aceite esencial, que aromatiza la cerveza y que contribuye a su conservación, además inactiva las enzimas, esteriliza el caldo, coagula sustancias proteicas y concentra el caldo hasta que tiene el contenido deseado de sólidos solubles o extracto (1,3).

Tras la ebullición se procede a la clarificación del mosto por medio de filtración o por un dispositivo que a través de una fuerza centrífuga separa las sustancias menos densas y las acumula en el eje de rotación. Luego es enfriado y se lleva a cubas de fermentación (26). Aunque el mosto se fermentaría espontáneamente por los gérmenes de levadura que hay en el aire, es preferible añadirle levadura pura obtenida

por un cultivo o procedente de una fermentación anterior. La levadura de cerveza está constituida por una aglomeración de microorganismos unicelulares pertenecientes al grupo de hongos ascomicetos. En su actividad total estas células, Saccharomyces cerevisiae, segregan enzimas zimasa que descomponen la maltosa y la glucosa en alcohol y anhídrido carbónico (1,3).

Terminada la fermentación, se traslada la cerveza a tanques de almacenamiento para su maduración y clarificación. La filtración y la disolución de gas carbónico, carbonatación, completan el proceso para obtener la cerveza terminada (3).

13.3. Fermentación

Hace por lo menos seis mil años que la humanidad sabe que puede obtenerse alcohol del azúcar, que es uno de los principales carbohidratos, según lo demuestran estudios relativos al antiguo Egipto (10).

Fermentación procede de la palabra latina fermentum, síncopa de fervimentum, de fervére, hervir, porque al desprenderse el dióxido de carbono gaseoso, parece, efectivamente, como si el mosto estuviese en ebullición. Pasteur descubrió que esa fermentación es producida por unos microbios, hongos microscópicos llamados comúnmente levaduras (1).

Las levaduras aunque son seres unicelulares poseen una gran complejidad física y química; muchos segregan sustancias que son las que verdaderamente producen las fermentaciones, a las que se les llamo primeramente fermentos solubles porque se disuelven en el agua, y mas tarde, diastasis, zimasa y enzimas; pero su verdadero nombre es fermentos (1).

El azúcar es el alimento natural de las levaduras, conforme se consume azúcar se produce alcohol, si se deja que la concentración de alcohol aumente, la levadura muere como cualquier ser vivo al que se deja sumido en sus propias secreciones; por tanto, cuando se elaboran bebidas alcohólicas, es necesario separar el alcohol a medida que se forma, pues de lo contrario cesaría la fermentación debido a que el alcohol mata al fermento que produce, como mata a cualquier ser vivo que lo absorba con exceso (10).

13.4. Proteínas

Las proteínas son las moléculas orgánicas mas abundantes en las células constituyendo el 50% o mas de su peso seco. Se encuentran en todas las partes de cada célula, ya que son fundamentales en todos los aspectos de la estructura y función celulares. Existen muchas clases de proteínas, cada una especializada en una función biológica diferente. Además la información genética es expresada en su mayor parte por las proteínas (27).

Las proteínas son esenciales para la vida misma. El rol predominante que juegan en sistemas vivientes puede ser apreciado por medio de pocos ejemplos que ilustran la variedad de proteínas fisiológicas asociadas con esas moléculas. Todas las reacciones químicas en sistemas vivientes son catalizadas por enzimas, moléculas de proteínas que son catalíticas por ellas mismas o por la formación de complejos con pequeñas moléculas. Las proteínas participan en procesos diversos y necesarios tales como respiración, contracción muscular, transporte activo de constituyentes celulares, transmisión eléctrica y en la perpetuidad de características genéticas. También actúa como regulador hormonal del metabolismo, como depósito del almacenamiento de ciertas moléculas, en mecanismos de defensa inmunológica y como elementos estructurales (28).

Debido a la versatilidad de sus propiedades, pueden convertirse en ingredientes clave que determinen muchos parámetros de la calidad de los alimentos, sin embargo, muchas de las proteínas tienen la particularidad de ayudar a mejorar las propiedades físicas y funcionales (29).

13.5. Composición de las proteínas

Todas contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno (8,27).

Una de las características distintivas de las moléculas de proteína es su contenido de nitrógeno, que es aproximadamente de 14 a 17 % por peso (28).

Casi todas contienen azufre y hay algunas que contienen elementos adicionales particularmente fósforo, hierro, cinc y cobre (8,27).

Los pesos moleculares de las proteínas son muy elevados, pero por hidrólisis ácida, las moléculas proteicas dan una serie de compuestos orgánicos sencillos de bajo peso molecular; son los alfa aminoácidos, que difieren entre sí en la estructura de sus grupos R o cadenas laterales. Los aminoácidos están unidos en una ordenación de cabeza a cola mediante uniones amida sustituidas llamadas enlaces peptídicos, producidas por eliminación de los elementos del agua entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo alfa amino del siguiente. Estas macromoléculas, llamadas polipéptidos, pueden contener centenares de unidades de aminoácidos. Las proteínas contienen cadenas polipeptídicas de composición química específica, un peso molecular y una secuencia ordenada de sus aminoácidos estructurales y una forma tridimensional (27).

13.6. Desnaturalización

Las proteínas pueden sufrir cambios intramoleculares en su configuración cuando su medio ambiente es alterado. Estos cambios pueden ser ocasionados por una variación de

temperatura, pH, concentración de sustancias tales como urea, etc. (30).

A estos cambios se les conoce como desnaturalización y el efecto más visible consiste en el descenso de su solubilidad (27). Este proceso se describe como la transformación de una proteína de un estado ordenado a uno desordenado sin la ruptura de enlaces covalentes y por ello la estructura primaria permanece intacta (27,30).

El desorden puede acompañar otras reacciones tales como proteólisis limitada (30). La consecuencia más significativa de la desnaturalización es que las proteínas pierden su actividad biológica característica (27).

La desnaturalización consiste en el desplegamiento de la estructura nativa plegada característica de la cadena polipeptídica de las moléculas de las proteínas (27). En muchos casos, de acuerdo a las condiciones, la molécula desplegada recupera su forma nativa en un proceso llamado renaturalización (27,30).

La estabilidad de la molécula, es por tanto, afectada por la desnaturalización; la cual puede ser considerada como una fase de transición de un estado cristalino a uno amorfo (30).

13.7. Propiedades estructurales de las proteínas de cereales

El contenido de proteína de todos los cereales proporciona alrededor del 10% en contenido de humedad

natural; está distribuida de forma irregular entre los tejidos del grano, pero en términos generales se puede decir que las concentraciones más altas se encuentran en el extremo del grano o subaleurona, en el germen y el lecho de aleurona del endosperma. El interior del endosperma tiene el contenido de proteína más bajo que el grano entero y hay muy poco en el pericardio (31).

Si la harina de algún cereal se somete a fraccionamiento con agua seguida de etanol al 70% y ácido diluido o alcali se obtiene albúmina, globulina, prolamina (gliadina) y glutelina (glutenina). La gliadina y la gluteína constituyen el 80-85 % del total de proteína del endospermo y se encuentra junto con cantidades pequeñas de otras proteínas, lípidos y almidón (31).

Aunque la gliadina es soluble en alcohol y la glutenina en ácidos diluidos y alcalis, esas dos fracciones juntas son frecuentemente referidas como proteína insoluble, proteína soluble se refiere generalmente a la albúmina y la globulina. Ambos tipos de proteína son diferentes en sí, son formadas por separado y existen independientemente en las células del endospermo (31).

La apariencia física o textura del endospermo puede ser de dos formas vítreo o algodonoso. El endospermo vítreo es translúcido, cristalino y físicamente duro; el endospermo algodonoso es opaco, de aspecto harinoso y físicamente blando. La opacidad del endosperma algodonoso es debido a la

presencia de innumerables grietas diminutas o fisuras en el endospermo, las cuales constituyen superficies refrigerantes (31).

Las porciones vítrea y algodonosa difieren en el contenido de proteínas: vítreo 9.12% y algodonoso 5.76%. Todos los granos inmaduros son vítreos, según maduran algunos se convierten en algodonosos (31).

La condición vítrea o algodonosa depende de la proporción de proteína viscosa y de inclusiones granulares, gránulos de almidón o gránulos de proteína; la proteína viscosa en el endospermo inmaduro es plástica y abundante, lo suficiente para envolver todas las inclusiones granulares. Conforme el grano madura la proteína viscosa pierde volumen y elasticidad; se contrae y algunas veces se vuelve insuficiente en volumen para envolver todos los gránulos por completo; en tales casos se rompe. Las células en las cuales la proteína viscosa así rota se convierte en células del endospermo algodonoso. La proporción relativa de proteínas solubles influye en la textura del endospermo y éste efecta la calidad de molienda del grano (31).

13.8 Nitrógeno

El nitrógeno es el elemento fundamental en la composición de los seres vivos, su símbolo químico es N y su nombre lo debe a Chaptal porque se halla en el ácido nítrico, de donde derivó su nombre: nitrum, salitre y gennán, engendrar (4,32).

Se encuentra en estado de combinación con los ácidos nitroso, nítrico y sus sales; es un elemento importante para la vida de los seres vivos: lo contiene la urea, los albuminoides, los alcaloides, etc. (32).

Es poco soluble en agua y algo más soluble en alcohol. Su tendencia a combinarse con los demás elementos es muy débil (32).

Anova table for a 3-factor Analysis of Variance on Y_1 : % de NC

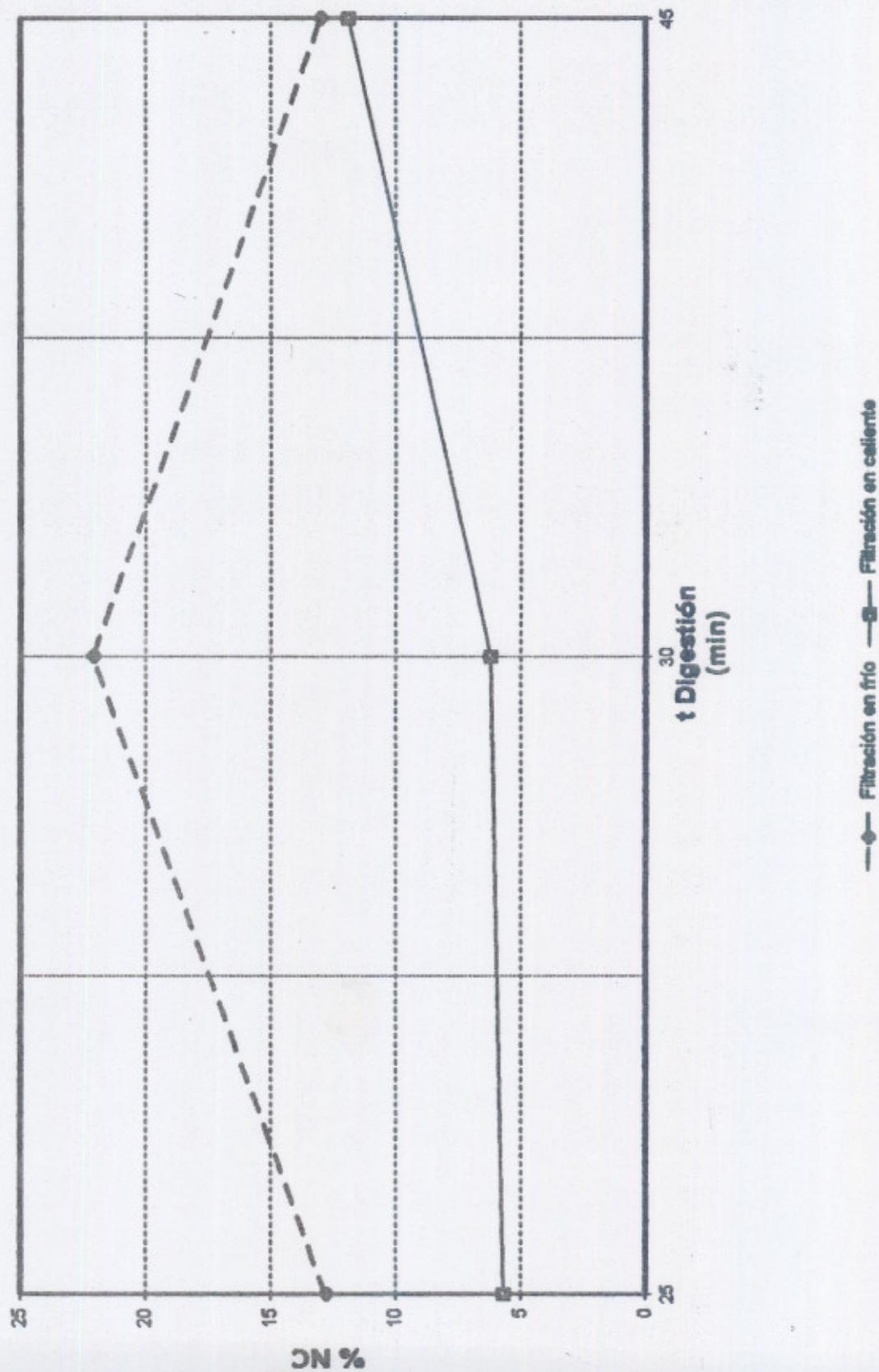
Source:	df:	Sum of Squares:	Mean Square:	F-test:	P value:
FILTRACION (A)	1	1157.607	1157.607	11.619	.0012
ALMACENADO (B)	1	136.29	136.29	1.368	.2468
AB	1	128.534	128.534	1.29	.2606
DIGESTION (C)	2	289.844	144.922	1.455	.2416
AC	2	672.574	336.287	3.375	.0408
BC	2	433.658	216.829	2.176	.1223
ABC	2	1806.705	903.353	9.067	.0004
Error	60	5977.989	99.633		

13.

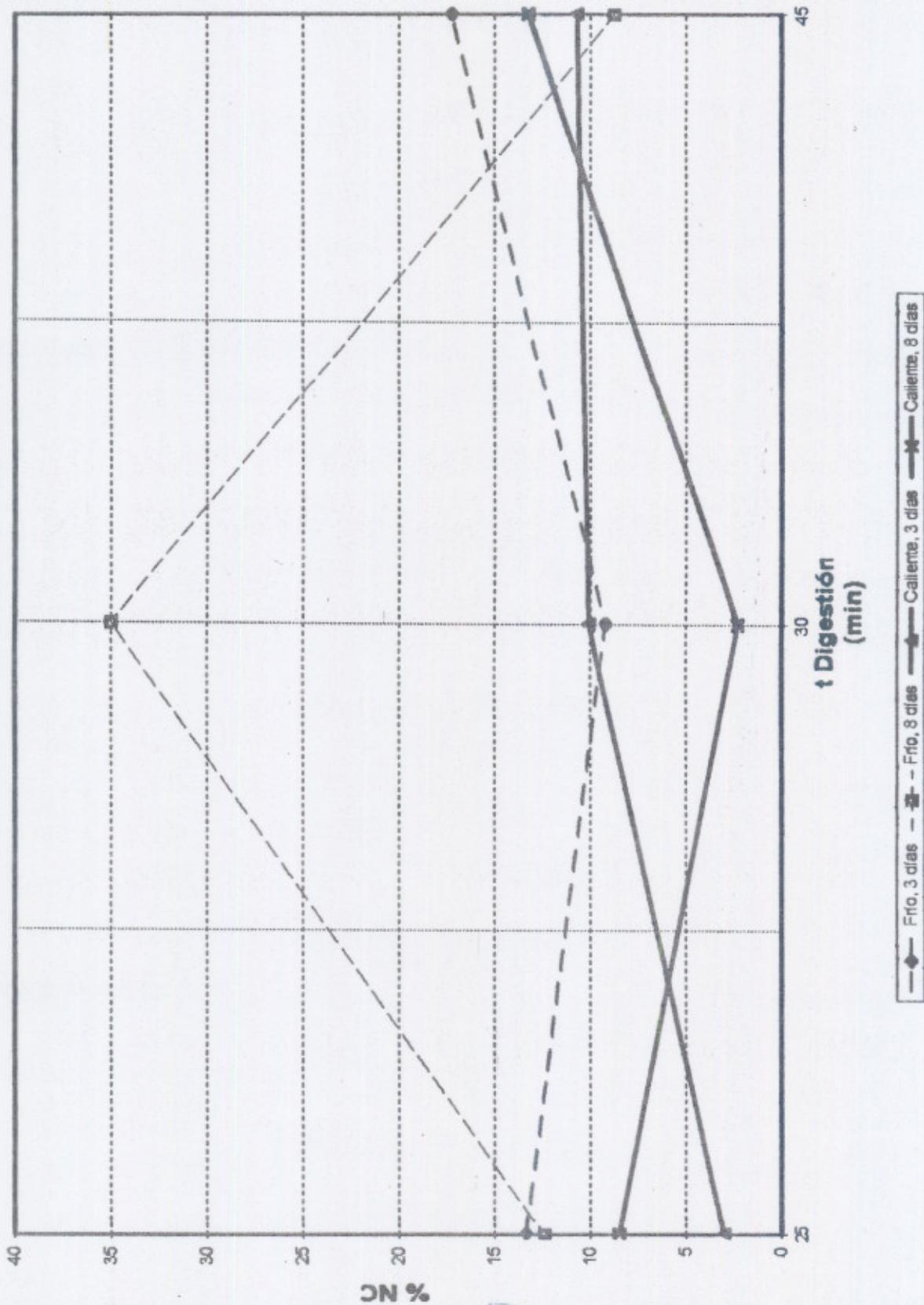
GRAFICAS

Gráfica No. 1 Interacción de la Temperatura de la cerveza al filtrarla- Tiempo de digestión

TENDENCIA NITROGENO COAGULABLE



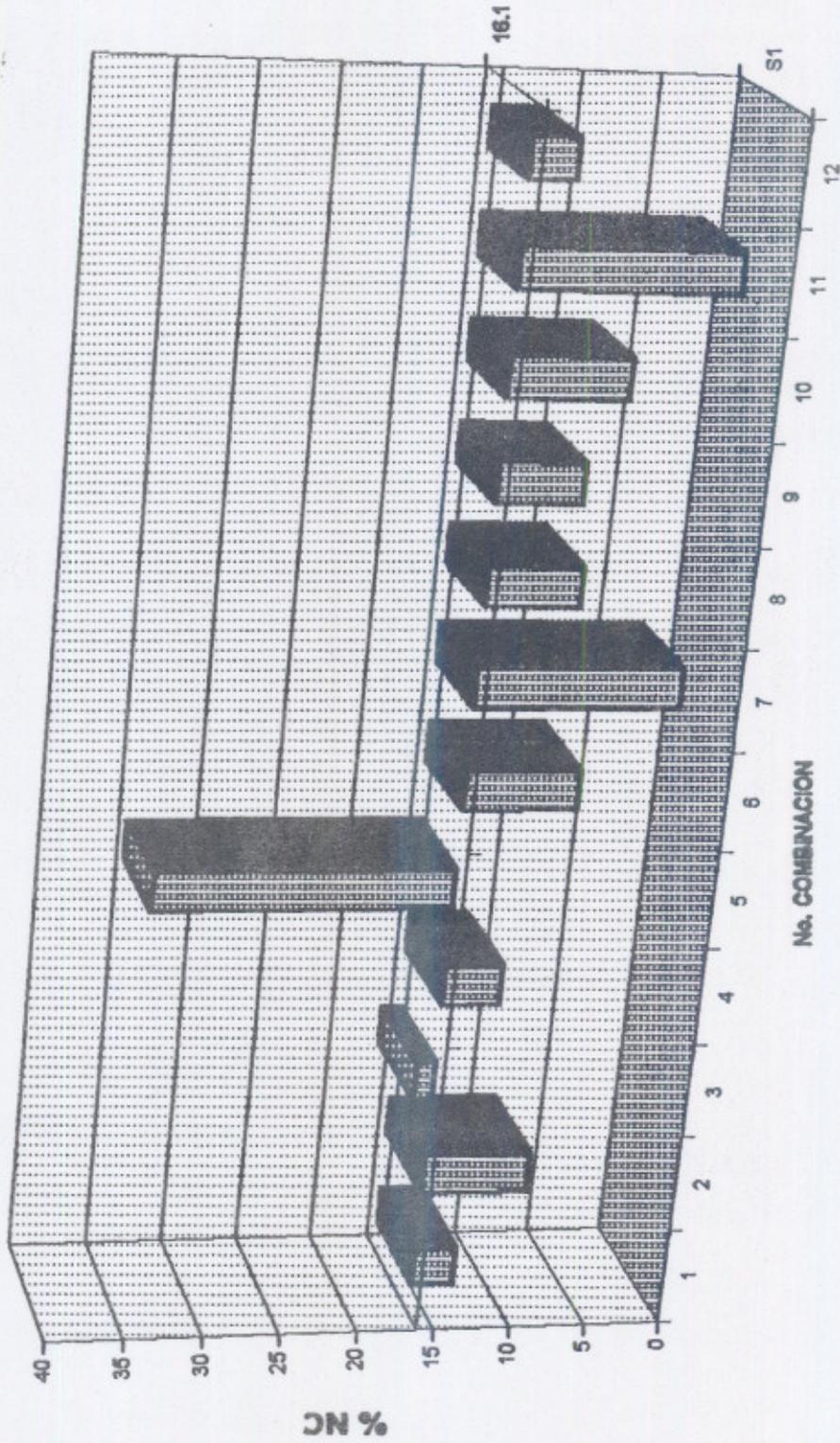
GRAFICA DE INTERACCION
 Temperatura de filtrado-Tiempo de almacenamiento-Tiempo de digestión



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD
 biblioteca
 MEXICALMA

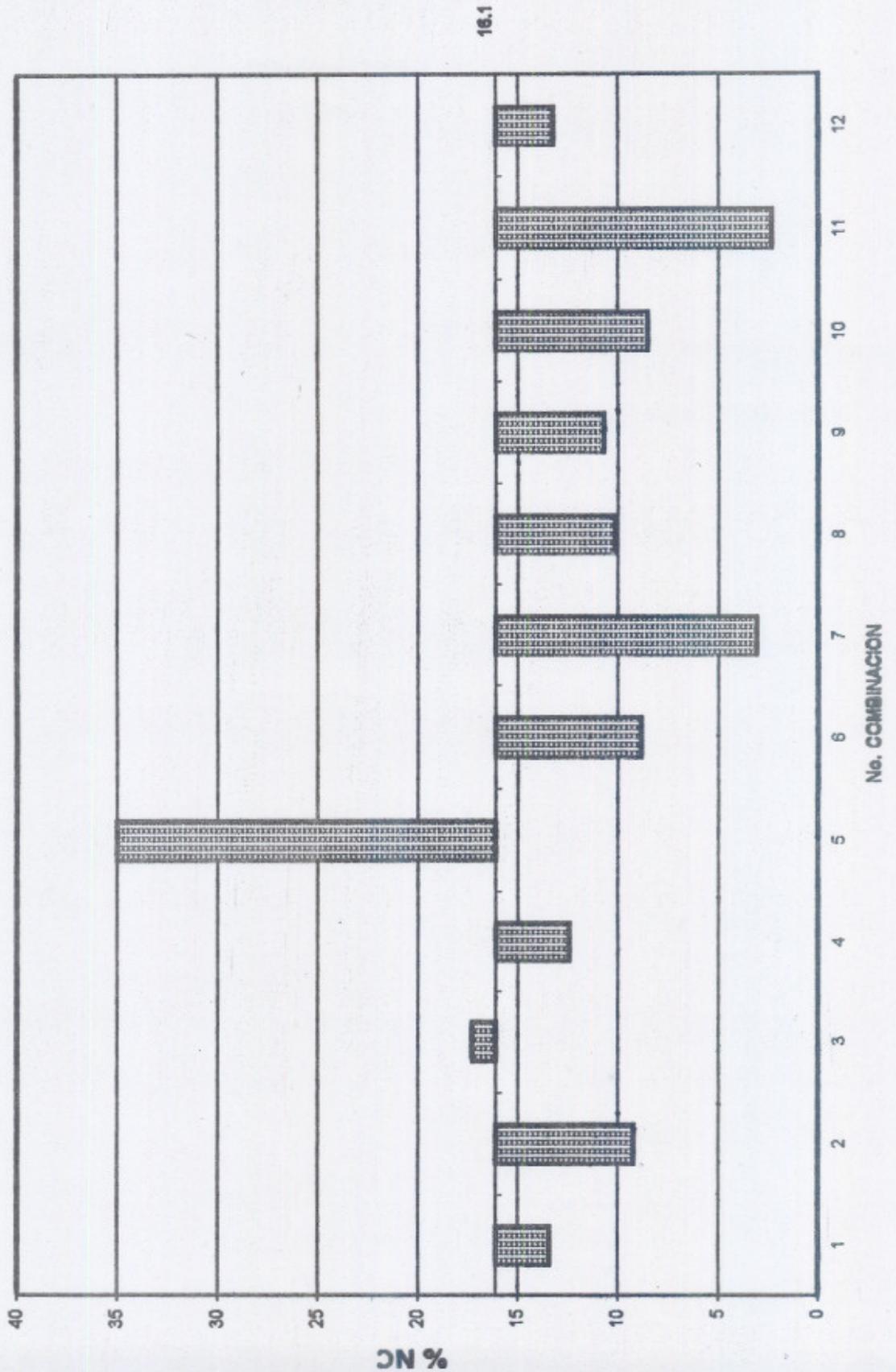
Gráfica No. 3 Comparación de valores obtenidos con el valor esperado

COMPARACION CON VALOR ESPERADO



Gráfica No. 3 Comparación de los valores obtenidos con el valor esperado

COMPARACION CON VALOR ESPERADO



13.10. Método Actualizado

- Agregar 100 ml de cerveza descarbonatada en un balón de fondo redondo de 300 ml.
- Conectar el balón a un condensador y colocarlo en un baño maría que contenga una solución que mantenga una temperatura en un rango de 100 a 107 grados centígrados.
- Aplicar calor, dejar ebullicir durante cinco horas.
- Enfriar
- Filtrar el contenido del balón, utilizando un papel filtro S & S (Shleicher & Shvelli, d = 110 mm).
- Lavar el balón con agua destilada caliente, enfriar y filtrar.
- Secar el papel filtro (el papel filtro puede ser almacenado durante tres días en refrigeración).
- En un tubo Büchi colocar dos perlas de ebullición, una pastilla Kjeldahl de selenio, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y el papel filtro.
- Colocar el tubo en la estufa de digestión Büchi, iniciar la digestión a baja temperatura, cuando los vapores disminuyan ir aumentando la temperatura poco a poco hasta que el color café desaparezca y la solución mantenga una claridad bien definida.
- Prolongar el calentamiento 45 minutos más.
- Dejar que el tubo de digestión se enfríe y luego colocarlo en la unidad de destilación con las siguientes condiciones:

- 100 ml de agua
- 70 ml de NaOH
- 30 segundos de espera
- 3 minutos de destilación

- Recibir el destilado en un erlenmeyer de 250 ml que contenga 25 ml de ácido bórico 2% y 0.5 ml de indicador verde bromocresol-rojo de metilo 10:4.
- Titular el destilado con HCl 0.1 N

Cálculos

Para calcular el porcentaje de nitrógeno coagulable utilizar la siguiente fórmula:

$$\% \text{ NC} = \frac{(\text{ml HCl Mt} - \text{ml HCl BLK})(10 \times 12 \times F)}{E_o}$$

donde:

ml HCl Mt = ml HCl 0.1 N utilizados para titular la muestra

ml HCl BLK = ml HCl 0.1 N utilizados para titular el blanco

10 y 12 = Factores de conversión

F = N / 0.0715 (N = normalidad de HCl)

E_o = Extracto original de la muestra

Uglderón

Valma Maribel Calderón Castilla
AUTORA

Jorge Luis Domínguez

Ing. Jorge Luis Domínguez Monterroso
ASESOR

BB Jiménez

Licda. Beatriz Bâtres de Jiménez
DIRECTORA DE ESCUELA

JRF

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
DECANO

PROPIEDAD DE LA UNIVET
BIBLIA
GUATEMALA