



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

**Facultad de Ingeniería Química y Metalúrgica
Escuela Profesional Ingeniería Química**

Evaluación de la influencia de la temperatura de fermentación en la reducción del diacetilo de una Cerveza Lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022

Tesis

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico

Autor

Juan Brandon Andree Bueno Cabello

Asesor

Mg. José Saúl Orbegozo López

Huacho - Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

LICENCIADA

(Resolución de Consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALÚRGICA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA

INFORMACIÓN DE METADATOS

DATOS DEL AUTOR (ES):		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	FECHA DE SUSTENTACIÓN
Juan Brandon Andree Bueno Cabello	71414312	01 de agosto de 2023
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
José Saúl Orbegozo López	06800598	0000-0003-4866-3404
DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADOS – PREGRADO/POSGRADO-MAESTRÍA-DOCTORADO:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CODIGO ORCID
Luis Manuel Peralta Aguilar	17939894	0000-0003-2153-7264
Luis Rolando Gonzales Torres	17835252	0000-0002-0777-8013
Israel Narvasta Torres	15614197	0000-0002-7687-3858

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN EN LA REDUCCIÓN DEL DIACETILO DE UNA CERVEZA LAGER EN HEINEKEN PERÚ, HUACHIPA, 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%
INDICE DE SIMILITUD

19%
FUENTES DE INTERNET

5%
PUBLICACIONES

9%
TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unprg.edu.pe:8080 Fuente de Internet	1%
2	www.grafiati.com Fuente de Internet	1%
3	repositorio.cientifica.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	idus.us.es Fuente de Internet	1%
5	repositorio.usil.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	inta.gob.ar Fuente de Internet	<1%
7	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.udh.edu.pe Fuente de Internet	<1%

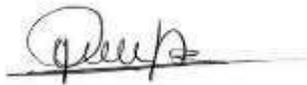
**UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN**

FACULTAD INGENIERÍA QUÍMICA Y METALÚRGICA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE
FERMENTACIÓN EN LA REDUCCIÓN DEL DIACETILO DE UNA
CERVEZA LAGER EN HEINEKEN PERÚ, HUACHIPA, 2022**

Sustentado y aprobado ante jurado evaluador



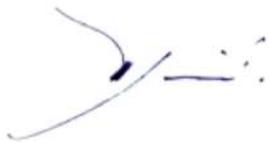
M(o) Ing. Luis Manuel Peralta Aguilar

Presidente


LUIS ROLANDO GONZALES TORRES
INGENIERO QUÍMICO
Reg. CEP N° 34457

M(o) Ing. Luis Rolando Gonzales Torres

Secretario



Ing. Israel Narvasta Torres

Vocal



Mg. Ing. José Saúl Orbegoso López

Asesor

HUACHO – PERU

2022

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a Dios por permitirme culminar mi carrera y ayudarme a no decaer en los momentos difíciles.

A mis padres Zulema Cabello y Juan Bueno, por darme educación, apoyo y soporte durante todas mis etapas de vida y a Jostim Boris, mi hermano a quien siempre llevo presente.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sentido agradecimiento a todas las personas que han estado presentes en mi desarrollo personal y profesional, quienes a pesar de las circunstancias me han ayudado desinteresadamente.

A mi Asesor, Ing. José Orbegoso, le expreso mi agradecimiento por su paciencia, disponibilidad y por animarme a seguir adelante durante este período.

Además, me gustaría agradecer a la empresa Heineken por la oportunidad y también expresar mi más sincero agradecimiento al Ing. Modesto Florián, Maestro Cervecerero, por compartir conmigo sus conocimientos, simpatía y entusiasmo sobre este trabajo.

Por último, me gustaría expresar mi agradecimiento a todos los colegas que trabajan en el área de elaboración de cerveza, por permitirme seguir su trabajo y por compartir sus conocimientos conmigo.

INDICE

DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTO	7
INDICE	8
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN	14
CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.1 Descripción de la realidad problemática	15
1.2 Formulación del problema	16
1.2.1 Problema general	16
1.2.2 Problemas específicos.....	16
1.3. Objetivos de la investigación	17
1.3.1. Objetivo general	17
1.3.2. Objetivos específicos	17
1.4. Justificación de la investigación.....	18
1.4.1. Justificación teórica	18
1.4.2. Justificación práctica	18
1.5. Delimitación del estudio.....	18
1.5.1. Delimitación espacial	18
1.5.2. Delimitación Temporal.....	18
1.5.3. Delimitación Teórica	18
1.6. Viabilidad del estudio.....	19
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Antecedentes de la investigación	20
2.1.1. Investigaciones internacionales	20

2.1.2. Investigaciones nacionales	22
2.2. Bases teóricas	24
2.2.1. La cerveza.....	24
2.2.2. Elaboración de cerveza.....	24
2.2.3. Tipos de cerveza	24
2.2.4. Levadura	25
2.2.5. Tipos de Fermentación	26
2.2.6. Cervezas de Fermentación Baja o tipo Lager.....	26
2.2.7. Principales requerimientos de la levadura para llevar a cabo la Fermentación.....	26
2.2.8. Fermentador.....	28
2.2.9. Fermentación.....	28
2.2.10. Fases de la Fermentación.....	29
2.2.11. Efecto de la temperatura	30
2.2.12. Compuestos principales producidos en la fermentación	31
2.2.13. Compuestos secundarios producidos en la fermentación.....	31
2.2.14. Producción de diacetilo	33
2.2.15. Proceso en fermentación.....	34
2.2.16. Umbral de detección de diacetilo en cerveza	34
2.2.17. Espectrofotometría UV Visible	35
2.2.18. Espectrofotómetro	35
2.2.19. Verificación de Espectrofotómetro.....	35
2.2.20. Curva de Calibración	36
2.2.21. Curva de Calibración de Espectrofotómetro	36
2.2.22. Puntos de calibración.....	37
2.2.23. Solución estándar.....	37
2.3. Definición de términos básicos	37
2.4. Hipótesis de investigación.....	39

2.4.1. Hipótesis general	39
2.4.2. Hipótesis específicas.....	39
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	40
3.1. Diseño metodológico.....	40
3.1.1. Ubicación.....	40
3.1.2. Materiales e insumos	40
3.1.3. Diseño experimental	41
3.1.4. Tratamientos	42
3.1.5. Características del área experimental	44
3.1.6. Variables evaluadas	44
3.1.7. Conducción del experimento	46
3.2. Población y muestra	48
3.2.1. Población	48
3.2.2. Muestra	48
3.3. Técnicas de recolección de datos	48
3.3.1. Técnicas empleadas	48
3.3.2. Descripción de los instrumentos.....	49
3.4. Técnicas para el procedimiento de la información.....	49
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	50
4.1 Formulación de hipótesis estadística.....	50
4.2 Determinación del tamaño de muestra	50
4.3 Determinación de los factores intrasujetos e intersujetos	51
4.4 Estadísticos descriptivos	51
4.5 Supuestos previos al análisis de datos.....	52
4.6 Interpretación del análisis estadístico.....	53
4.7 Interpretación de los resultados.....	55
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	57

CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
6.1. Conclusiones	58
6.2. Recomendaciones.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
Fuentes documentales	60
Fuentes bibliográficas	61
Fuentes hemerográficas.....	62
Fuentes electrónicas	62
ANEXOS	63

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo demostrar la relación de causalidad entre la variación de la curva de temperaturas de fermentación y la reducción de la concentración de diacetilo (2,3 butanodiona) producido por la levadura cervecera *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis*, durante la fermentación de un tipo de cerveza lager. La importancia del análisis de esta molécula radica en el hecho de que esta afecta el perfil sensorial del producto final.

Para ello se realizó un experimento, en el cual se midió, por medio de un método normado de la ASBC, el diacetilo en las muestras tomadas de los fermentadores. Estos fermentadores tienen una curva de temperaturas de fermentación ordinaria como grupo control y otros cuentan con una curva de temperaturas de fermentación distinta a la ordinaria como grupo experimental. Posteriormente se analizaron los datos mediante el uso de software estadístico.

Se obtuvo como resultado que sí existe una reducción en la concentración de diacetilo tanto en el análisis intersujetos como en el intrasujetos.

Se demuestra que existe una relación causal entre la variación de temperaturas de fermentación y la concentración de diacetilo y que la variación de la curva de temperaturas de fermentación tiene como consecuencia una mayor reducción de diacetilo.

Palabras Clave: Diacetilo, fermentación, butanodiona, levadura, perfil sensorial

ABSTRACT

The objective of this study is to demonstrate the causal relationship between the variation in the fermentation temperature curve and the reduction in the concentration of diacetyl (2,3 butanedione) produced by the brewer's yeast *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis*, during the fermentation of a type of lager beer. The importance of the analysis of this molecule lies in the fact that it affects the sensory profile of the final product.

For this, an experiment was carried out, in which the diacetyl in the samples taken from the fermenters was measured by means of a standard ASBC method. These fermenters have an ordinary fermentation temperature curve as a control group and others have a different fermentation temperature curve than the ordinary one as an experimental group. Subsequently, the data were analyzed using statistical software.

It was obtained as a result that there is a reduction in the diacetyl concentration both in the intersubject and intrasubject analysis.

It is shown that there is a causal relationship between the variation of fermentation temperatures and the concentration of diacetyl and that the variation of the fermentation temperature curve results in a greater reduction of diacetyl.

Keywords: Diacetyl, fermentation, butanedione, yeast, sensory profile

INTRODUCCIÓN

El diacetilo es un compuesto químico que se puede encontrar en la cerveza y otras bebidas fermentadas. Es un subproducto de la fermentación y se produce naturalmente durante el proceso de conversión del azúcar en alcohol. Si bien el diacetilo es un componente natural de la cerveza, también es posible que las cervezas contengan niveles de diacetilo más altos de lo normal debido al manejo de la fermentación, la contaminación bacteriana u otros factores.

Los altos niveles de diacetilo en la cerveza pueden dar a la bebida un sabor a mantequilla o caramelo indeseable. Esto puede notarse especialmente en ciertos estilos de cerveza, como lager y pilsner, que son conocidas por sus sabores limpios y suaves. Además de afectar el sabor de la cerveza, los altos niveles de diacetilo también pueden afectar el aroma y la sensación en la boca de la bebida.

Hay varias formas de controlar el nivel de diacetilo en la cerveza. Un enfoque es manejar cuidadosamente el proceso de fermentación para minimizar la producción de diacetilo. Esto se puede lograr controlando la temperatura y el pH de la fermentación y utilizando cepas específicas de levadura. Otro enfoque es utilizar tratamientos posteriores a la fermentación, como agregar ciertas enzimas o bacterias, para eliminar el exceso de diacetilo de la cerveza.

La presencia de diacetilo en la cerveza es un tema complejo que requiere una cuidadosa atención por parte de los cerveceros. Al comprender los factores que pueden afectar el nivel de diacetilo en la cerveza e implementar las medidas adecuadas para controlarlo, los cerveceros pueden asegurarse de que sus cervezas tengan el sabor y el aroma deseados.

La preocupación del investigador por evaluar la reducción del diacetilo toma en cuenta una variedad de problemas relacionados con la presencia de este, incluidos los siguientes:

Sabor y aroma: Los altos niveles de diacetilo pueden afectar negativamente la calidad del aroma y el sabor de la cerveza, lo que genera un sabor indeseable. Es necesario controlar los factores que contribuyen a la producción de diacetilo y desarrollar métodos para minimizarlo o eliminarlo.

Control de calidad: Asegurar que el nivel de diacetilo en la cerveza esté dentro de los límites aceptables es un aspecto importante del control de calidad. Es necesario medir y controlar con precisión el nivel de diacetilo en la cerveza.

Preferencias del Consumidor: Diferentes consumidores pueden tener diferentes preferencias cuando se trata del nivel de diacetilo en su cerveza. Se debe tener en cuenta las preferencias de

los consumidores y desarrollar métodos de fermentación para producir cervezas que satisfagan estas preferencias.

Implicaciones para la salud: algunos estudios han sugerido que los altos niveles de diacetilo pueden tener efectos negativos para la salud, aunque se hace necesaria más investigación para poder comprender plenamente los riesgos potenciales.

La investigación pretende comprender los factores que afectan el nivel de diacetilo en la cerveza y entender el efecto de las curvas de temperatura de fermentación para controlarlo a fin de producir cervezas sabrosas y de alta calidad que satisfagan las preferencias de los consumidores y tengan riesgos potenciales mínimos para la salud.

Según Kunze (2006), el mecanismo bioquímico de reducción de diacetilo en un fermentador involucra a la enzima diacetylreductasa, que cataliza la reducción de diacetilo a acetoína. Esta reacción requiere la presencia de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) como cofactor. La acetoína resultante luego se reduce aún más a 2,3-butanodiol por la enzima acetoína reductasa, lo que nuevamente requiere la presencia de NADH.

Hay varios factores que pueden afectar la eficiencia de la reducción de diacetilo en un fermentador, incluidos el pH y la temperatura de la fermentación, la presencia de oxígeno y los microorganismos o enzimas específicos que se utilizan.

Por ejemplo, las enzimas diacetyl reductasa y acetoína reductasa tienen rangos óptimos de pH y temperatura dentro de los cuales son más activas. Mantener la fermentación dentro de estos rangos puede ayudar a maximizar la eficiencia de la reacción de reducción de diacetilo. Además, la presencia de oxígeno puede influir en la actividad de estas enzimas y es posible que deba controlarse cuidadosamente durante el proceso de fermentación.

Según Hough (1990), la temperatura de fermentación es un factor crítico en la producción de cerveza y otras bebidas fermentadas. Desempeña un papel crucial en la determinación del sabor, el aroma y la calidad general del producto final.

Durante el proceso de fermentación, las células de levadura consumen los azúcares presentes en el mosto (el líquido dulce sin fermentar que se convertirá en cerveza) y los convierten en alcohol y en dióxido de carbono. La temperatura del ambiente de fermentación afecta la velocidad a la que se produce esta conversión, así como la producción de otros compuestos como ésteres y fenoles que forman parte del sabor y aroma de la cerveza.

Las diferentes cepas de levadura tienen rangos óptimos de temperatura de fermentación, y la elaboración a temperaturas fuera de estos rangos puede generar sabores desagradables y otras características indeseables en la cerveza. Por ejemplo, la fermentación a una temperatura demasiado alta puede conducir a la producción de alcoholes superiores, que pueden dar a la cerveza un sabor a alcohol caliente o similar a un solvente. Por otro lado, fermentar a una temperatura demasiado baja puede resultar en una fermentación lenta o incompleta, lo que da como resultado una cerveza poco atenuada con un sabor dulce o empalagoso.

Además del impacto sobre el sabor y el aroma, la temperatura de fermentación también afecta la eficiencia general del proceso de fermentación. La fermentación a la temperatura óptima puede dar como resultado una conversión más completa de los azúcares en alcohol, lo que lleva a una mayor producción de cerveza con la misma cantidad de mosto.

Controlar la temperatura de fermentación es un aspecto fundamental en la elaboración de la cerveza y requiere una cuidadosa atención por parte de los cerveceros. Al elegir la cepa de levadura adecuada y mantener la temperatura de fermentación adecuada, los cerveceros pueden producir cervezas de alta calidad con el sabor, el aroma y el contenido de alcohol deseados.

Podemos encontrar artículos relacionados a la investigación como:

"125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation" de Kristoffer Krogerus y Brian R. Gibson, publicado en el Journal of the Institute of Brewing en 2013, el cual es una revisión exhaustiva del estado actual del conocimiento sobre el diacetilo y cómo se controla en la industria cervecera. El diacetilo es un compuesto volátil que se produce durante la etapa de fermentación el cual tiene un sabor y aroma a mantequilla o vainilla. Sin embargo, en altas concentraciones es indeseable en el sabor final de la cerveza. Los autores del artículo describen las rutas metabólicas, así como también los genes involucrados en la producción de diacetilo y cómo estos procesos son afectados por factores ambientales y genéticos.

En cuanto a las estrategias utilizadas para controlar la producción de diacetilo, los autores mencionan varios enfoques, como el control de la fermentación por medio del ajuste del pH, la temperatura y la adición de compuestos químicos como el ácido ascórbico para reducir la producción de diacetilo.

Por otro lado, los autores discuten los desarrollos recientes en la tecnología de control de diacetilo, como la ingeniería de levaduras para reducir la producción de diacetilo y la utilización de enzimas exógenas para reducir los niveles de diacetilo en la cerveza.

Por último, los autores hacen una evaluación sobre los desafíos y oportunidades futuras en el control del diacetilo en la cerveza y cómo esto podría afectar a la industria cervecera en general.

CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La producción de cerveza implica una serie de tres procesos bioquímicos definidos: la formación de enzimas en los granos germinados, la descomposición del almidón en azúcares por estas enzimas y la fermentación de azúcares en alcoholes y CO₂.

El tercer proceso crea un subproducto que afecta el sabor, olor, así como otros atributos de la cerveza. La formación y degradación de este producto secundario está íntimamente ligado con el metabolismo de la levadura.

Según Kunze (2006), uno de los compuestos secundarios producidos más importantes es el diacetilo (2,3 butanodiona), el cual le confiere a la cerveza un sabor dulce poco agradable y en altas concentraciones un olor a manteca. A la par de la 2,3 butanodiona se produce la 2,3 pentanodiona la cual tiene una procedencia y actuar similar puesto que a ambas son dicetonas vecinales, se prioriza el estudio de la 2,3 butanodiona debido a que esta tiene un umbral de percepción diez veces mayor que la 2,3 pentanodiona.

En el Perú, existen al menos tres empresas productoras de cerveza a escala industrial de diferentes capacidades en volumen, cada una de ellas con marcadas diferencias en su tamaño y distribución, pero todas enfrentan la necesidad de reducir la presencia de diacetilo en sus procesos para evitar su presencia en el producto final. En la ciudad de Lima se encuentra ubicada la empresa cervecera Heineken Perú bajo la denominación Limba Services S.A.C. en el distrito de Huachipa, Lurigancho, Lima.

En esta empresa se encuentran los fermentadores que se hacen necesarios analizar en cuanto a su temperatura de operación y los días en los cuales fermenta un lote de cerveza.

En tal sentido, se realizará la evaluación de la temperatura de los fermentadores y su relación con la reducción de diacetilo presente en la cerveza fermentada para encontrar la relación entre estas variables.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Existe una relación causal entre la temperatura de fermentación y la reducción del diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022?

1.2.2 Problemas específicos

¿Qué efecto tiene la manipulación de la temperatura de fermentación en la concentración del diacetilo de una cerveza lager, en comparación con un grupo control en Heineken Perú, Huachipa, 2022?

¿De qué manera la temperatura de fermentación afecta al tiempo de fermentación de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022?

¿De qué manera la temperatura de fermentación afecta al porcentaje de reducción de diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Demostrar la relación causal entre la temperatura de fermentación y la reducción del diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

1.3.2. Objetivos específicos

Demostrar el efecto causal de la manipulación de la temperatura de fermentación en la concentración del diacetilo de una cerveza lager, en comparación con un grupo control en Heineken Perú, Huachipa, 2022

Establecer la relación causal entre la temperatura de fermentación y el tiempo de fermentación de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

Verificar experimentalmente la relación de causa entre la temperatura de fermentación y el porcentaje de reducción de diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1. Justificación teórica

El estudio brindará una evaluación detallada del procedimiento de reducción del diacetilo en una cerveza lager contribuyendo a una base teórica relevante para esta área de investigación. Además, desarrolla información adicional basada en el conocimiento existente en la industria cervecera que ampliará el conocimiento sobre la fermentación en la industria cervecera en general.

1.4.2. Justificación práctica

El estudio permitirá determinar parámetros de operación en cuanto a la temperatura de los fermentadores y cómo afecta a la presencia de diacetilo, para su evaluación en la empresa. Además, su método de evaluación puede ser referenciado en otros estudios similares.

1.5. Delimitación del estudio

1.5.1. Delimitación espacial

Lugar: Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Sala de Fermentadores de Heineken Perú,
Avenida La Paz Nro. 129

Distrito: Huachipa - Lurigancho

Provincia: Lima Metropolitana

Departamento: Lima

1.5.2. Delimitación Temporal

Para realizar la investigación se toman como referencia tres meses de junio a agosto del 2022

1.5.3. Delimitación Teórica

El estudio se realiza en los fermentadores, con un sistema de enfriamiento con amoníaco. Se estudia los parámetros de temperatura y partes por millón de diacetilo. Los análisis para medir la concentración diacetilo se realizan en el laboratorio de análisis físicoquímicos.

1.6. Viabilidad del estudio

La investigación es viable, ya que el tesista es ex alumno de la FIQYM y la investigación se desarrollará en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y en la Sala de fermentadores de Heineken Perú, Avenida La Paz Nro. 129, esto beneficiará a esta empresa, a la comunidad universitaria y al público en general interesado en la investigación cervecera en el Perú.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Investigaciones internacionales

Fécher M. (2022) Universidad Técnica de Munich presentó su tesis doctoral titulada: "Molecular Insights into the Contribution of Specialty Malts to the Beer Aroma". El objetivo de la investigación fue examinar la contribución de las maltas especiales al aroma de la cerveza, tiene como objetivo investigar los procesos y cambios en la transferencia de los odorantes de los maltas especiales (caramelo y tostado) a la cerveza durante el proceso de elaboración. Para lograr esto, se elaboraron dos cervezas Lager con malta de cebada especial y dos cervezas de trigo con malta de trigo especial (caramelo y tostado). Se realiza un análisis de aroma utilizando la técnica GC-MS para cuantificar los compuestos odorantes en seis tipos de cervezas: tres elaboradas con malta de cebada (KBB, CBB, RBB) y tres elaboradas con malta de trigo (KWB, CWB, RWB). Los resultados indican que hay diferencias considerables en los compuestos odorantes entre las cervezas elaboradas con malta de trigo y cebada. El 2-acetil-1-pirrolina, con un olor a palomitas de maíz, es más activo en el aroma de las cervezas elaboradas con malta de cebada, mientras que la acidez acética es más alta en la cerveza elaborada con malta de trigo. En conclusión, el estudio ha identificado los compuestos odorantes responsables del aroma característico de las cervezas elaboradas con malta de trigo y cebada y ha establecido una relación entre los compuestos odorantes en las maltas y las cervezas resultantes.

Leal A. (2017), Universidade da Madeira, Portugal, realizó un trabajo titulado: "Vicinal Diketones Monitoring During Lager Beer Fermentation: The Importance of Nitrogenous Compounds" El objetivo principal de esta tesis es analizar cómo los niveles de compuestos nitrogenados, como el amoníaco y el dióxido de nitrógeno, afectan la formación de dicetonas vecinales, como el diacetilo, en la cerveza. Los resultados del trabajo muestran que los niveles de compuestos nitrogenados tienen un impacto significativo en la formación de dicetonas vecinales en la cerveza lager, y que una adecuada gestión de estos compuestos puede ayudar a controlar y optimizar la formación de dicetonas vecinales. Según las conclusiones de la tesis, se recomienda monitorear y controlar los niveles de compuestos nitrogenados durante la fermentación de cerveza lager para obtener una mejor calidad de producto final.

Gómez A. (2014), Universitat Politècnica De Valencia, España, realizó un trabajo titulado: "Mejora y optimización del proceso de elaboración de la cerveza dentro de una industria

cervecera”. Entre sus objetivos planteó: Mejorar las curvas estandarizadas de las fermentaciones producidas en el departamento de producción y analizar los diferentes factores que afectan la calidad y el rendimiento del proceso de elaboración de la cerveza. Los resultados del estudio sugieren que factores como el monitoreo de las temperaturas de fermentación, la calidad del agua y la selección de ingredientes tienen un efecto importante en el rendimiento y la calidad del proceso de elaboración de la cerveza. Según las conclusiones del estudio, se recomienda implementar medidas para controlar y optimizar estos factores para mejorar el rendimiento y la calidad del proceso de elaboración de la cerveza.

Naydenova V., Iliev V., Kaneva M., & Kostov G. (2014), Universidad de Tecnologías Alimentarias de Plovdiv, Bulgaria, realizaron un trabajo titulado: “Modeling of alcohol fermentation in brewing - carbonyl compounds synthesis and reduction” El objetivo principal del estudio era analizar cómo los compuestos carbónicos afectan la fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza y cómo pueden ser controlados y optimizados para mejorar el proceso de elaboración de cerveza. Los resultados del estudio sugieren que la gestión adecuada de los compuestos carbónicos puede tener un impacto significativo en la fermentación alcohólica y en la calidad final del producto cervecero. Según las conclusiones del estudio, se recomienda el uso de un modelo matemático para el control y optimización de los compuestos carbónicos durante la fermentación alcohólica en la elaboración de cerveza.

Zambrano J. y Borbor K. (2014), Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, realizaron un trabajo titulado: "Utilización de una nueva cepa de levadura en el proceso de fermentación en una industria cervecera en la ciudad de Guayaquil" El objetivo principal del estudio era evaluar cómo la nueva cepa *S. pastorianus* de levadura afectaba a la producción de diacetilo en el proceso de fermentación. Los resultados del estudio sugieren que la cepa nueva de levadura utilizada en este proceso fermentativo redujo significativamente la producción de diacetilo en comparación con las cepas de levadura tradicionales utilizadas en la industria cervecera. Según las conclusiones del estudio, los experimentos realizados en el proceso de fermentación demostraron que cuando se incrementa la temperatura y la concentración inicial de levadura, se produce una rápida conversión de los precursores del diacetilo durante las etapas iniciales de la fermentación.

2.1.2. Investigaciones nacionales

Huamán D. & León E. (2019), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, realizaron un trabajo titulado: “Diseño y construcción de un biorreactor “Airlift” y determinación de parámetros de operación óptimos para su aplicación en procesos fermentativos”, se observó que la densidad del medio de cultivo tiene un impacto mayor en el tiempo de homogeneización que en el valor de KLa . Al aumentar la densidad característica del fluido, el tiempo de homogeneización aumenta significativamente, al mismo tiempo que los valores de KLa se ven repercutidos en menor medida. Después del análisis realizado, se ha determinado que la actividad fermentativa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está estrechamente relacionada con la presencia de azúcares residuales en el proceso de fermentación, en lugar de ser influenciada por la configuración y/o los parámetros de operación del biorreactor Airlift. La levadura utiliza estos azúcares como sustratos para su metabolismo y fermentación, mientras que la configuración y los parámetros de operación del biorreactor influyen en el comportamiento hidrodinámico del fluido en la fermentación, lo que tiene un impacto directo en la actividad de la levadura.

Falcón C. (2018), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, realizó un trabajo titulado: “Estudio de la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en soportes naturales para la fermentación de cerveza”, Se pudo observar que las cervezas producidas con levaduras inmovilizadas en ambos soportes obtuvieron una alta calificación en los atributos "frutal" y "cítrico". Además, se registraron puntajes menores en la percepción de "a levadura", "alcohólico" y "ácido" en la cerveza fermentada con levaduras inmovilizadas en soportes de toronja. Tras el análisis, se pudo concluir que las cervezas elaboradas con levaduras *S. cerevisiae* S-33 inmovilizadas en soportes de toronja exhibieron una calificación elevada en los atributos "a cítrico" y "frutal", mientras que presentaron puntajes más bajos en la percepción de "a levadura", "alcohólico" y "ácido", en comparación con cervezas elaboradas con levaduras que han sido inmovilizadas en soportes de Maní. Además, se determinó que el aumento de temperatura afecta directamente el rendimiento de la fermentación del mosto de malta.

Arana G. (2016), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, realizó un trabajo titulado: “Proceso productivo de la elaboración de cerveza lager a nivel industrial”, entre sus objetivos planteó explicar las mejoras tecnológicas y operativas orientadas para reducir la variabilidad del pH y del consumo de ácido fosfórico en la paila mezcladora, aumentar la eficiencia durante la etapa de cocimiento, disminuir y estabilizar el consumo de ayuda filtrante durante la etapa

de filtración de la cerveza. El resultado fue un aumento del rendimiento de la materia prima del 94% al 97%, lo que se tradujo en conseguir incrementar la cantidad de hectolitros de mosto producidos por cada kilogramo de materia prima utilizado en el proceso. Para llevar a cabo el proyecto, se utilizó la metodología DMAIC, que combina Lean Manufacturing y seis sigma.

Toribio K. (2015), Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú, realizó un trabajo titulado: “Evaluación de la estabilidad como starter de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager” Entre los objetivos planteados en la investigación fue evaluar la estabilidad del Starter llevando a cabo en escala de laboratorio la producción de cerveza tipo lager utilizando la levadura *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis*, mediante la implementación de dos métodos de cultivo diferentes empleados en las cervecerías. Concluyó que la calidad del mosto utilizado en la preparación del Starter, así como en la elaboración posterior de la cerveza, fue óptima. Se han obtenido los resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica y microbiológica confirmaron las características óptimas del mosto utilizado, así como su estabilidad. Por lo tanto, se puede concluir con firmeza que los métodos de cultivo empleados en las cervecerías para la elaboración de cerveza tipo lager han demostrado ser efectivos y garantizan la estabilidad del Starter, lo que tiene un impacto positivo en la calidad de la cerveza producida.

Altamirano C. (2013), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, realizó un trabajo titulado: “Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto”, Entre los objetivos planteó desarrollar una metodología estandarizada para la reactivación, propagación y aumento eficiente de la biomasa de células *Saccharomyces cerevisiae*, así como comprender los fundamentos de los bioprocesos que controlan y dirigen el metabolismo celular durante la fermentación del mosto de uva cerveza, desde el nivel de laboratorio hasta el nivel piloto. Concluyó que el proceso de reactivación, propagación y aumento de las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* consta de dos etapas bien diferenciadas. La primera de ellas implica la reactivación y propagación a nivel de laboratorio, mientras que la segunda se refiere a la propagación y el aumento a nivel piloto para alcanzar la concentración celular necesaria. Para lograr un volumen de inóculo o starter del 10 por ciento del volumen de mosto de malta a inocular, se requiere una concentración celular de $15-18 \times 10^6$ células/mL con una viabilidad y vitalidad superior al 98% para el escalamiento desde el nivel de laboratorio hasta el nivel piloto.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. La cerveza

Se define como una bebida alcohólica elaborada a partir de la fermentación de granos germinados de cebada u otros cereales en agua y aromatizados con lúpulo (DRAE, 2021)

En el Perú, la NTP 213.014:2014 CERVEZA. Requisitos, define a la cerveza como la bebida que se produce a través de un proceso fermentativo controlado con levadura cervecera a partir de mosto de cebada malteada o extracto de malta, que previamente ha sido sometido a un proceso de cocción y al que se le agrega lúpulo.

2.2.2. Elaboración de cerveza

Según Mazariegos (2011), para la elaboración de la cerveza necesario usar: agua, malta, lúpulo y levadura. Estos son los únicos ingredientes aceptados de acuerdo a la ley de la pureza alemana, no obstante, una gran cantidad de cervecías utilizan otros cereales adicionales como fuente de almidón como el maíz, el arroz o el sorgo a los cuales se les llama adjuntos cerveceros.

La cerveza se obtiene por fermentación alcohólica de un mosto elaborado con cebada malteada (malta) sola o con otros cereales (malteados o no), lúpulo, levadura y agua cervecera. Para efecto de los procesos empleados el término “cerveza” aplicará sin distinción de la proporción de malta utilizada para la elaboración.

La elaboración de la cerveza requiere un conocimiento técnico detallado y un cuidadoso control de las condiciones de fermentación y almacenamiento para garantizar la calidad y la consistencia de la cerveza final.

2.2.3. Tipos de cerveza

De acuerdo con Alves y De Faria (2008), la clasificación básica de cervezas consta de dos tipos: ale (fermentación alta) y lager (fermentación baja). Las cervezas lager se fermentan a temperaturas que oscilan entre 3.5 y 13°C, y su periodo de maduración puede ser de 4 a 12 semanas. Debido a las temperaturas bajas utilizadas durante el proceso de fermentación de las cervezas lager, los aromas y sabores de estas cervezas suelen ser más suaves en comparación con las ales.

2.2.4. Levadura

Según Hough (1990), la levadura usada comúnmente en cerveza pertenece al género *Saccharomyces*, que significa “hongos del azúcar” es un microorganismo unicelular perteneciente a los hongos, que actúa como catalizador en la conversión de azúcar en alcohol y CO₂. Se clasifican en dos tipos:

Saccharomyces cerevisiae: levadura de fermentación “ale”. Al final de su fermentación se asocia en cúmulos que flotan sobre la superficie del líquido.

Saccharomyces pastorianus (*carlsbergensis*): usada en fermentaciones “lager”. Al final de la fermentación, sedimenta hacia el fondo del tanque (flocula).

Capaces de producir la transformación del mosto en cerveza bajo condiciones apropiadas.

En este proceso se usan levaduras *Saccharomyces pastorianus* (*carlsbergensis*)

La cual tiene las siguientes características en su fermentación:

- Fermentan a temperaturas bajas (1-15°C)
- Floculación
- Genera un perfil de ésteres medio
- Produce muy pocos fenoles

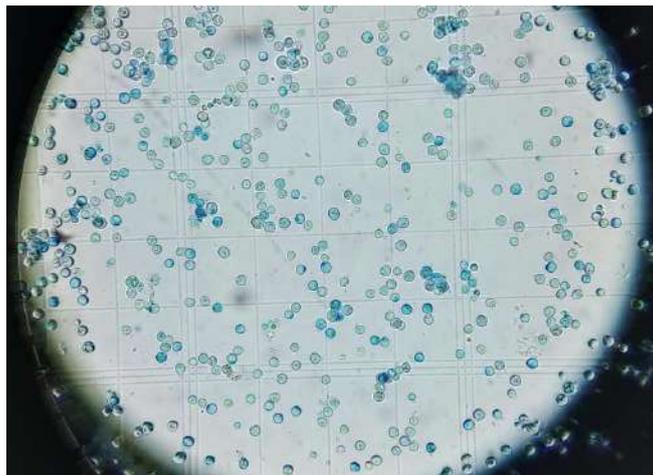


Figura 1. Levaduras Saccharomyces carlsbergensis vistas en microscopio en cámara de Neubauer. Fuente: Elaboración propia.

2.2.5. Tipos de Fermentación

De acuerdo con Kunze (2006), en la elaboración industrial de cerveza se emplean dos clases diferentes de fermentación:

a. Fermentación alta: Utilizada en la elaboración de cervezas "ale", donde las levaduras forman un conglomerado flotante en el líquido o pueden flocular al inicio de la fermentación y hundirse en el líquido. La fermentación se lleva a cabo a temperaturas que oscilan entre 15 y 22°C, y durante este proceso, las levaduras metabolizan los carbohidratos del mosto para producir etanol y CO₂ en su mayoría.

b. Fermentación baja: Utilizada en la elaboración de cervezas "lager", en la que las levaduras floculan en aglomerados y sedimentan en el líquido al final de la fermentación. La temperatura en esta etapa varía de 7 a 15°C y las levaduras también metabolizan los carbohidratos del mosto para producir etanol y CO₂ en su mayoría.

2.2.6. Cervezas de Fermentación Baja o tipo Lager

Según Comptom (1977), las levaduras de fermentación baja fueron utilizadas por primera vez en Baviera para elaborar la cerveza conocida como lager. El término Lager se origina de la palabra alemana "Lagern" que significa guardar o almacenar en una bodega. La levadura *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis*, que generalmente no forma esporas, es altamente adecuada para la fermentación lenta a temperaturas bajas y es preferida en la producción de cerveza tipo lager. Estas levaduras pueden fermentar a temperaturas bajas de entre 5 °C a 15°C, y al final de la fermentación, la levadura se asienta en el fondo del tanque.

2.2.7. Principales requerimientos de la levadura para llevar a cabo la Fermentación

1.- Carbohidratos del Mosto

Según Vogel (2003), En la producción industrial de cerveza con un contenido de etanol de 4-5% v/v, se requiere un mosto con una concentración de 12° a 14°Plato. Se puede establecer una relación entre la densidad del mosto y los grados Plato (°P) a través de la siguiente ecuación:

$$^{\circ}P = 259 - \frac{259}{D}$$

Donde:

°P: Grados plato

D: Densidad del mosto (g/L)

El contenido de azúcares fermentescibles del mosto es importante porque determina el contenido de alcohol de la cerveza

Se dividen en:

- Fermentables: 60-65% Solo las cadenas pequeñas de carbohidratos son asimilables.

Ejemplos: Xilosa, Arabinosa, Glucosa, Fructosa, Maltosa, Sacarosa.

- No Fermentables: 35-40% Son las cadenas grandes de carbohidratos:

Ejemplo: Dextrinas

Observación: El límite de atenuación se obtiene cuando todos los azúcares fermentables, han sido fermentados.

2.- Aminoácidos del Mosto

Los aminoácidos del mosto constituyen la fuente de nitrógeno necesaria para que la levadura lleve a cabo sus funciones metabólicas esenciales durante la fermentación cervecera.

El contenido de alfa amino nitrógeno en el mosto debe ser superior a los 50 mg/100 ml

3.- Oxígeno

El oxígeno es indispensable para la levadura en la primera Fase de la fermentación, pues es necesario para respirar, para poder llevar a cabo su reproducción por Gemación y para poder almacenar glucógeno como material de reserva.

4.- Vitaminas

Según Hornsey (2003), durante la primera fase de fermentación del mosto, se necesitan vitaminas para el crecimiento de las levaduras. Dentro del grupo de las vitaminas más frecuentes se pueden incluir las siguientes: la biotina, tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxamina, piridoxina inositol y pantotenato de calcio. A diferencia de las demás vitaminas que cumplen un papel catalítico como parte de una coenzima para el metabolismo, el inositol tiene una función estructural al intervenir en la síntesis de la membrana lipídica de la levadura.

5.- Minerales

Se requieren para el crecimiento de las levaduras y para que la levadura flocule: Cobre, calcio, hierro y zinc. Los cationes como el magnesio y el calcio resulta esencial para garantizar una óptima proliferación celular y una producción adecuada de etanol. (Hornsey, 2003)

2.2.8. Fermentador

El fermentador es un tipo de biorreactor, que utiliza hongos o bacterias para la fermentación, como en el caso del etanol. Por lo tanto, un fermentador opera en un entorno anaeróbico. Además, el fermentador es capaz de proporcionar las condiciones de crecimiento óptimas a los microorganismos.

En el presente estudio el tipo de fermentador al que se hará referencia será un fermentador de 20 metros de alto y 4 metros de ancho, de base cónica, con capacidad bruta de 3000 hectolitros hecho de fierro revestido con pintura epóxica de grado alimenticio, vitreado por dentro y con aislante térmico de espuma.

Además, cuenta con un sistema de frío en base a amoníaco el cual tiene zonas de enfriamiento en el cono y en el cuerpo en las zonas baja, media y alta, este sistema de enfriamiento se controla desde un HMI (Interfaz Hombre Máquina) en el cual se programan las temperaturas de enfriamiento de acuerdo a la curva de fermentación que se le quiera dar.

2.2.9. Fermentación.

La fermentación es el proceso mediante el cual la levadura transforma el extracto (azúcares) del mosto, resultando en cerveza verde. Durante la fermentación se produce alcohol, otros compuestos (ácidos orgánicos, cetonas, ésteres, etc.), CO₂ y calor.

Según Novotny et. al (1992), existen varios factores tecnológicos que pueden afectar el proceso fermentativo, entre ellos se incluyen la temperatura, la presión osmótica, el pH, la concentración celular y la concentración de oxígeno. De estos factores, la temperatura es particularmente significativa ya que puede influir tanto en la velocidad de fermentación como en la calidad sensorial de la cerveza resultante.

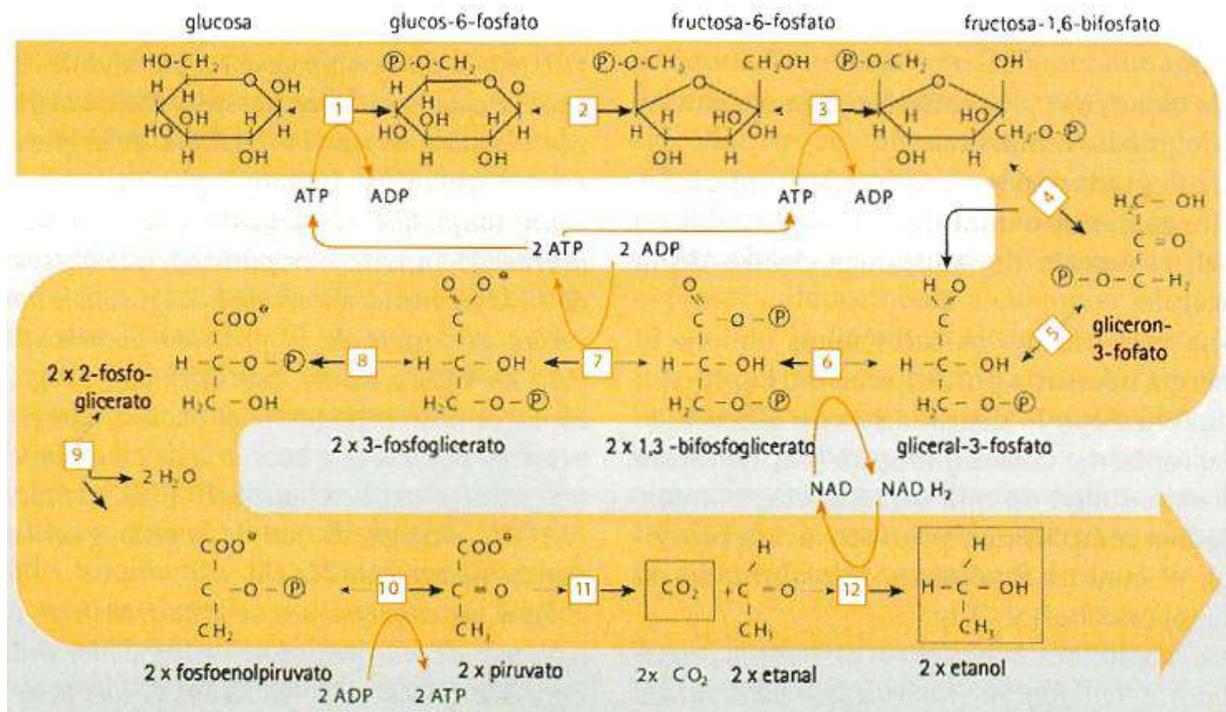


Figura 2. Esquema de la fermentación alcohólica, según Embden-Meyerhof-Parnas. Fuente: Kunze (2006)

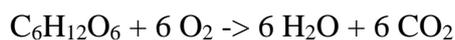
2.2.10. Fases de la Fermentación

Fase aerobia:

Se lleva a cabo al principio de la fermentación con un mosto saturado de oxígeno conteniendo de 15 - 19 ppm de oxígeno disuelto.

En esta primera fase la levadura lleva a cabo su metabolismo, su respiración, la reproducción por gemación y la formación de compuestos para una sana fermentación.

En el proceso de respiración, los nutrientes consumidos, tales como el azúcar, se descomponen en dióxido de carbono y agua, sin dejar residuos:



Fase anaerobia:

Es la segunda etapa de la fermentación, en donde la levadura ha agotado el oxígeno del mosto; esta fase Anaeróbica es la más larga.

Es la etapa donde la levadura se dedica a producir etanol y CO₂, entre otros muchos compuestos.

Cuando no hay presencia de oxígeno, la levadura se somete a la fermentación alcohólica, siendo el único organismo vivo que tiene esta capacidad. En este proceso, la glucosa se transforma en alcohol (etanol) y dióxido de carbono:



Las levaduras son capaces de adoptar ya sea un metabolismo de respiratorio o de fermentación dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y glucosa, los cuales son correspondientes al efecto Pasteur y al efecto Crabtree respectivamente.

Efecto Pasteur: El oxígeno inhibe la fermentación y fomenta la producción de biomasa.

Efecto Crabtree: Favorece la producción de etanol en lugar de biomasa.

2.2.11. Efecto de la temperatura

El incremento de la temperatura ejerce una influencia significativa en la capacidad fermentativa de las levaduras al acelerar los procesos bioquímicos intracelulares, lo que conlleva a una mayor velocidad de consumo de azúcares, producción de etanol y generación de subproductos. Es crucial mantener la temperatura bajo control durante el proceso de fermentación para prevenir la formación de compuestos no deseados que puedan afectar negativamente el perfil sensorial de la cerveza. Estos compuestos pueden incluir alcoholes superiores y la presencia no deseada de diacetilo en el producto final según Hornsey (2003) y Owen (1991)

Según Kunze (2006) Durante la etapa de fermentación principal, es importante controlar: La temperatura de inicio de fermentación, la temperatura máxima (Krausen) y la temperatura de enfriamiento.

Temperatura de inicio de fermentación

La temperatura inicial de la fermentación es de 5 a 6 °C. En procesos de fermentación con una duración reducida, esta temperatura a menudo se aumenta hasta los 9°C para iniciar una fermentación más rápida.

Temperatura máxima (Krausen)

Durante el proceso de fermentación, el calor generado provoca un aumento en la temperatura del mosto. Aunque la fermentación es más rápida a temperaturas más altas, no se debe sobrepasar cierta temperatura máxima durante la fermentación con el fin de preservar la calidad del producto. Esta temperatura oscilará entre los 9° a 15°C de acuerdo a la receta.

Temperatura de enfriamiento

La temperatura máxima debe mantenerse constante durante un periodo de uno o dos días. Luego de esto, la cerveza verde es enfriada lentamente. Es importante mantener una disminución gradual y uniforme de la temperatura durante la fermentación, ya que la levadura es sensible a las bruscas disminuciones de temperatura. La temperatura para el trasiego es aproximadamente 1° a 5°C.

2.2.12. Compuestos principales producidos en la fermentación

Según Gigliarelli (2013), la producción de alcohol y gas carbónico son productos de la fermentación de carbohidratos por la levadura en un ambiente anaerobio.

El grado de alcohol de una cerveza dependerá:

- a. De la cantidad de azúcares fermentables del mosto, lo cual se determina por la formulación y la curva de maceración.
- b. De la cepa de levadura utilizada.

2.2.13. Compuestos secundarios producidos en la fermentación

De acuerdo a Gigliarelli (2013), Los compuestos secundarios más característicos que se generan son: alcoholes superiores, ésteres, diacetilo (dicetonas vecinales), acetaldehídos y compuestos azufrados.

- Ésteres

Olor Característico: Frutas.

Son los principales componentes aromáticos y volátiles de la cerveza.

Se producen en mayor cantidad cuando hay deficiencia de oxígeno en el mosto.

Se incrementan debido a: Altas temperaturas. Alto extracto original.

Se reducen debido a: Inoculo y temperaturas controladas.

Ejemplos: Acetato de etilo y Acetato de isoamilo.

- Alcoholes superiores

Sabor Característico: Alcohol.

Son formados por la levadura durante la fase anaeróbica de la fermentación como subproductos del metabolismo de los aminoácidos.

Incrementa el efecto del alcohol.

Son aromáticos, pero menos que los ésteres.

Son los responsables de la “Resaca”

Se incrementan debido a: Altas temperaturas. Alta oxigenación.

Se reducen debido a: Inoculo y temperaturas controladas.

Alcohol isoamilico. Isobutanol.

- Compuestos de azufre

La producción de Sulfuro de Hidrógeno (H_2S) y Dimetil Sulfuro (DMS) es debida a la reducción por parte de la levadura de los aminoácidos azufrados del mosto y los iones sulfato durante la primera fase de la fermentación.

Los compuestos de azufre tienen olores y sabores desagradables.

Los orígenes de estos compuestos son: Fermentación, materias primas, contaminaciones bacterianas, aditivos.

Control de los compuestos de azufre: Vigilar la calidad de las Materias Primas.

Evitar contaminaciones bacterianas tanto en materias primas como en la Fermentación.

- Diacetilo

Olor Característico: Mantequilla.

Es una desviación indeseable en la cerveza

Es una cetona (Butano-2,3-diona) producida por la levadura en los primeros días de Fermentación y eliminado por la misma levadura durante la etapa de Krausen.

Se incrementa debido a un enfriamiento antes de tiempo o en casos de contaminación microbiológica.

Se reduce en forma normal al mantener la temperatura a $16.5^{\circ} C$

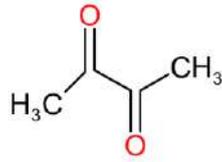


Figura 3. Formula química del diacetilo (2,3 butanodiona). Fuente: Elaboración propia

- Acetaldehido

Es el precursor del etanol en la fermentación. Sabor indeseable a alta concentración >8 ppm

Se produce en los 2 primeros días de fermentación

Se incrementa debido altas temperaturas de fermentación. Alta presión dentro del fermentador.

Fermentaciones agitadas. Inóculos altos. Aereación después de iniciada la fermentación.

Se reduce en la etapa de Krausen y durante la maduración.

2.2.14. Producción de diacetilo

Durante la fermentación la levadura excreta alfa - acetolactato, el cual se convierte mediante una reacción no-enzimática producto del bajo pH, bajo oxígeno y alta temperatura del medio, en la desviación conocida como diacetilo (2,3 butanodiona) el cual en altas concentraciones dará un sabor grasoso o de mantequilla a la cerveza.

Una vez formado el diacetilo, la levadura lo vuelve a metabolizar en acetoina y posteriormente en 2,3 butanodiol.

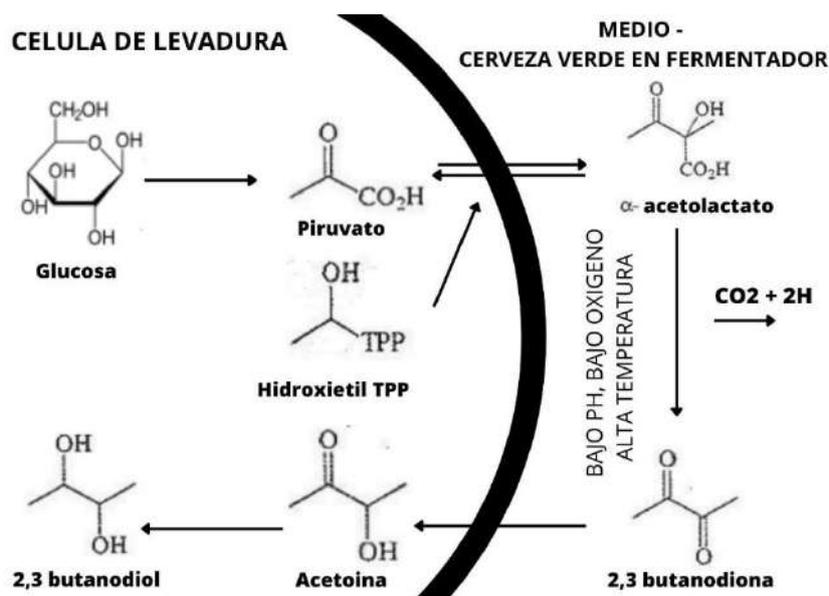


Figura 4. Ruta de la formación de diacetilo. Fuente: Elaboración propia

La lenta conversión del acetolactato en diacetilo es relativamente la razón principal para el período de maduración requerido por la cerveza.

2.2.15. Proceso en fermentación

Según Kunze (2006), Luego de la obtención del mosto en la sala de cocimiento, este es llevado al proceso de fermentación, en el cual la levadura transforma los azúcares presentes en el extracto del mosto, produciendo lo que se conoce como cerveza verde.

El mosto aireado ingresa al fermentador entre 9.0 a 9.5 °C, se activa la receta desde el panel de control; luego se le agrega la levadura en el primer cocimiento.

Después que ingresa el mosto del último cocimiento, se prefija la temperatura a 10.0°C (+/-0.5°C) y comienza la fermentación, se mide el extracto y lo registra en el formato “Control de línea - proceso de fermentación”, también debe mantener la presión interna del fermentador en 0.5 (+/- 0.2 Bar).

Cuando el extracto se aproxima entre 8 - 7 °P, se eleva la temperatura a 10.5 - 11.0°C (dependiendo de la curva de fermentación configurada en el HMI) y continua así hasta que el extracto se aproxime al valor de la atenuación límite en donde empieza a repetirse el extracto; luego se refrigera el cono del fermentador y se cosecha levadura y se almacena.

Después de cosechar la levadura, se homogeneiza la cerveza verde con CO₂; luego el área de Calidad analiza el diacetilo en la cerveza verde, si el valor es ≤ 0.25 ppm, se enfría la cerveza hasta 1.0 +/- 1.0°C, caso contrario se mantiene la temperatura o se enfría como máximo hasta 7°C y se solicita nuevo análisis de diacetilo, hasta llegar al valor antes mencionado.

2.2.16. Umbral de detección de diacetilo en cerveza

El umbral de detección de diacetilo en cerveza es de aproximadamente de 0.2 partes por millón (ppm). Sin embargo, esto puede diferir en función del tipo de cerveza y del gusto individual del catador. Un nivel de diacetilo mayor a 0.3 ppm es considerado como defecto en la cerveza. La concentración de diacetilo en cerveza no deberá exceder los 0.25 ppm al concluir la fermentación, con el propósito de no sobrepasar dicho umbral.

2.2.17. Espectrofotometría UV Visible

Según Owen (2000), la espectrofotometría UV-visible es un método analítico que se emplea en el ámbito de la química y la bioquímica para cuantificar la capacidad de una muestra para absorber la luz en relación a la longitud de onda de la radiación.

Es un método que nos permite medir cómo una muestra absorbe la luz en diferentes longitudes de onda. Esto nos da información sobre la estructura y composición química de la muestra, lo que es útil en la caracterización y cuantificación de moléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos y compuestos orgánicos e inorgánicos en solución.

En la presente investigación se utilizará esta técnica analítica para la determinación de la concentración de diacetilo en las muestras evaluadas.

2.2.18. Espectrofotómetro

De acuerdo con Owen (2000), un espectrofotómetro es un instrumento de laboratorio utilizado en la espectrofotometría para medir la intensidad de la luz que es absorbida o transmitida por una muestra en función de la longitud de onda de dicha radiación.

Consta de una fuente de luz, un sistema óptico para enfocar la luz en la muestra, un soporte para la muestra y un detector para medir la intensidad de la luz que pasa a través de la muestra. La muestra se coloca en el camino de la luz y la cantidad de luz absorbida o transmitida por la muestra se mide mediante el detector.

Se utiliza para medir la absorbancia de una muestra en diferentes longitudes de onda de la radiación, lo que permite determinar la concentración de una sustancia en una solución o caracterizar la estructura y composición química de la muestra.

2.2.19. Verificación de Espectrofotómetro

De acuerdo con el ASTG-4 (2005), La verificación de un espectrofotómetro es un proceso mediante el cual se comprueba si el instrumento está funcionando correctamente y produce mediciones precisas y confiables.

Implica la realización de una serie de pruebas para concluir si el instrumento está cumpliendo con las especificaciones del fabricante y si está dentro de los límites aceptables de error. Estas

pruebas pueden incluir la medida de la exactitud de la longitud de onda, la resolución espectral, la exactitud y precisión de la absorbancia, la uniformidad del haz de luz, entre otras.

Se realiza con una fuente de referencia certificada que se utiliza para calibrar el instrumento y se comparan las mediciones realizadas por el espectrofotómetro con los valores conocidos. Si el espectrofotómetro no cumple con las especificaciones del fabricante o produce mediciones imprecisas, se deben tomar medidas correctivas para ajustar el instrumento y mejorar su precisión y exactitud.

La verificación regular del espectrofotómetro es importante para garantizar que los resultados obtenidos sean precisos y confiables, y que los datos de la investigación científica, análisis clínicos, control de calidad y otras aplicaciones sean precisos y reproducibles.

El espectrofotómetro utilizado en este estudio se verificará con un filtro de Holmio certificado.

2.2.20. Curva de Calibración

Según Blázquez (2005), la curva de calibración es una representación gráfica de la relación entre la señal analítica medida por un instrumento de análisis y la concentración de la sustancia analizada. Formalmente, la curva de calibración se define como un conjunto de puntos experimentales que relacionan la respuesta analítica del instrumento (por ejemplo, la absorbancia o la intensidad de fluorescencia) con las concentraciones conocidas de una sustancia de referencia. A partir de esta curva, es posible determinar la concentración desconocida de una muestra analizada por el instrumento mediante la interpolación de la señal analítica medida en la curva de calibración.

2.2.21. Curva de Calibración de Espectrofotómetro

Conforme a lo indicado por Blázquez (2005), la curva de calibración en espectrofotometría es una relación matemática que se establece entre la absorbancia o transmitancia medida por un espectrofotómetro y la concentración de una sustancia absorbente en una solución. Formalmente, la curva de calibración en espectrofotometría se define como una representación gráfica de la relación lineal entre la absorbancia medida y la concentración conocida de una solución de referencia. Esta curva se genera a partir de una serie de soluciones estándar de la sustancia de interés, cada una con una concentración conocida, cuyas absorbancias se miden a diferentes longitudes de onda utilizando el espectrofotómetro. La curva de calibración permite

establecer una relación cuantitativa entre la absorbancia y la concentración de la sustancia absorbente en la muestra analizada, lo que permite cuantificar la cantidad de sustancia presente en una muestra desconocida a partir de su absorbancia.

2.2.22. Puntos de calibración

Los puntos de calibración son valores de referencia utilizados para ajustar y calibrar el instrumento de medición para obtener mediciones precisas y exactas de la absorbancia de una muestra. Estos puntos se obtienen midiendo la señal del espectrofotómetro en soluciones estándar de concentraciones conocidas y diferentes longitudes de onda.

Suelen ser tres o más y se utilizan para crear una curva de calibración, también conocida como curva de absorbancia-concentración.

2.2.23. Solución estándar

Según el ASTG-4 (2005), Una solución estándar es una solución química de concentración conocida y exacta que se utiliza como referencia para calibrar o estandarizar instrumentos de medición en química, como espectrofotómetros, tituladores, entre otros. La elaboración de una solución estándar implica disolver una cantidad precisa de un compuesto químico puro en una cantidad precisa de disolvente, y luego ajustar la concentración mediante técnicas analíticas.

Los estándares se utilizan para elaborar las soluciones de calibración, que son luego medidas para establecer los puntos de calibración. Estos puntos de calibración se utilizan para construir una curva de calibración que se ajusta matemáticamente, permitiendo determinar la concentración de una muestra no conocida a partir de la señal medida por el instrumento.

2.3. Definición de términos básicos

Atenuación. - Es la disminución del grado plato durante la fermentación

Azúcar. - Compuesto orgánico soluble en agua, dulce al paladar, que se encuentra en muchas frutas, verduras y plantas, y que se utiliza como edulcorante en la alimentación y en la producción de bebidas y alimentos

Calibración. - implica la comparación de la respuesta de un instrumento de medición con una serie de valores de referencia conocidos, llamados puntos de calibración y a partir de estas señales establecer una relación matemática con la cantidad de sustancia que se está midiendo.

Cerveza. - Bebida alcohólica obtenida a partir de la fermentación de cereales, principalmente cebada malteada, lúpulo y agua.

Diacetilo. - Compuesto orgánico que se produce durante la fermentación alcohólica de la cerveza y que a altas concentraciones puede dar lugar a un sabor y aroma a mantequilla o a queso rancio.

Espectrofotometría. – Es una técnica analítica que se utiliza para medir la absorción o transmisión de la luz por una muestra en función de la longitud de onda de la radiación.

Espectrofotómetro. - Instrumento analítico utilizado para medir la absorción o transmisión de luz por una muestra en función de la longitud de onda de la radiación, que se utiliza en diversas áreas como la investigación científica, análisis clínicos y el control de calidad. permite la medición de la cantidad de luz que una sustancia absorbe, lo que a su vez permite determinar la concentración de solutos presentes en una muestra.

Estándar. - Sustancia química de pureza conocida y concentración exacta utilizada como referencia para calibrar o estandarizar instrumentos de medición

Extracto. - Es la cantidad total de material disuelto en un mosto dulce después de la maceración y la filtración de la malta y adjunto cereal y determinan el extracto original del mosto que es medido por el sacarímetro y se puede expresar en grados Plato o Balling

Calibración. - Se define como la comparación de los valores de medición obtenidos por un instrumento de medición con los valores conocidos de un estándar de referencia.

Fermentación. - Proceso biológico en el que microorganismos, como las levaduras y bacterias, transforman los azúcares en otros compuestos, como el alcohol y el dióxido de carbono

Fermentación cervecera. - Proceso de fermentación utilizado en la elaboración de cerveza, en el que las levaduras convierten los azúcares de los cereales en alcohol y dióxido de carbono

Fermentador. - Es un biorreactor diseñado para asegurar que la fermentación se desarrolle de manera controlada y en condiciones óptimas

Grados Plato. - Mide el porcentaje en peso del extracto original por cada 100 gramos de cerveza. Es la lectura del sacarímetro y expresa la gravedad específica como extracto en peso en 100 gramos de solución a 20.0 °C

Levadura. - Las levaduras son organismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi, con una forma distintiva de esfera u óvalo, en lugar de tener una estructura filamentosa, utilizado en la fermentación para convertir los azúcares en alcohol y dióxido de carbono

Temperatura. - Magnitud que indica el grado de calor de un objeto o sustancia y que se mide en grados Celsius o Fahrenheit. La temperatura es un factor importante en la fermentación de la cerveza ya que afecta la actividad de la levadura y la velocidad de la fermentación

Verificación. - Es un proceso de evaluación sistemático que se realiza para asegurar que los equipos de laboratorio se encuentren en condiciones óptimas de funcionamiento y cumplan con las especificaciones y requerimientos de calidad establecidos para su uso

2.4. Hipótesis de investigación

2.4.1. Hipótesis general

La temperatura de fermentación tiene un efecto causal significativo en la reducción del diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022

2.4.2. Hipótesis específicas

La manipulación de la temperatura de fermentación tiene un efecto causal significativo en la concentración del diacetilo de una cerveza lager en comparación con un grupo control en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

La temperatura de fermentación afecta el tiempo de fermentación de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

La temperatura de fermentación afecta al porcentaje de reducción de diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico

Tipo de Investigación

Experimental: Suelen ser prospectivos, longitudinales, analíticos y de nivel investigativo explicativo, busca identificar las causas y efectos; asimismo son controlados para evitar sesgos.

Prospectivo: Se recogen los datos necesarios para la investigación de forma intencional (primarios). Esto permite un mayor control del sesgo de medición.

Longitudinal: la variable de interés es medida en dos o más momentos diferentes, lo que permite realizar comparaciones entre muestras relacionadas (antes-después).

Analítico: El análisis estadístico es como mínimo bivariado, lo que significa que establece y prueba hipótesis y determina la asociación entre factores.

Nivel de Investigación

Explicativo: buscan dar una explicación a la relación entre dos o más variables, donde una es la causa y la otra es el efecto. Se debe tener un control y cumplir con criterios de causalidad.

Diseño

Experimental. Experimento verdadero: cumple con la asignación aleatoria de un grupo control y un grupo experimental, así como la intervención intencional por parte del investigador.

Enfoque

Es cuantitativo, por ser medible

3.1.1. Ubicación

Laboratorio de análisis fisicoquímicos y sala de fermentadores

3.1.2. Materiales e insumos

- Materiales y equipos:

Probeta de 25 ml y 250 ml.

Balón de destilación.

Tubo inyector de CO₂

Vaso de 50 ml.

Pipetas de 1 ml y 5 ml.

Enchapadora manual.

Baño María

Cocina eléctrica

- Reactivos:

Antiespumante

Agua destilada

Solución alcalina de fosfato diácido de potasio

Clorhidrato de hidroxilamina al 6%.

Fosfato ácido de potasio

Hidróxido de amonio

Tartrato de sodio y potasio

Sulfato de fierro

3.1.3. Diseño experimental

Se realizará un Análisis de la varianza factorial diseño mixto, con un factor intersujetos, del cual uno será el grupo control y el otro será el grupo experimental, y un factor intrasujetos, pues se hará repeticiones de la medición de un mismo lugar, pero en tres días consecutivos, los días 7, 8 y 9 de fermentación, para ver su evolución.

Este análisis, será aplicado a la evaluación de la influencia de la temperatura de fermentación en la reducción del diacetilo de una cerveza lager.

El análisis estadístico ANOVA se utilizará para evaluar si los factores individuales y sus interacciones tienen un efecto significativo sobre la respuesta, con el propósito de entender la influencia de los tratamientos.

3.1.4. Tratamientos

Tratamiento al grupo control

Los fermentadores que fermentarán las muestras pertenecientes al grupo control, seguirán una curva de temperaturas convencional, la cual mantiene una temperatura que no superan 11°C.

Tabla 1

Temperatura de fermentación para el grupo control

Días	Temperatura
0	9.5
1	9.5
2	9.5
3	9.5
4	10.5
5	11.0
6	11.0
7	11.0
8	11.0
9	11.0
10	10.0
11	6.0
12	1.0

Nota. Las temperaturas serán programadas desde un HMI

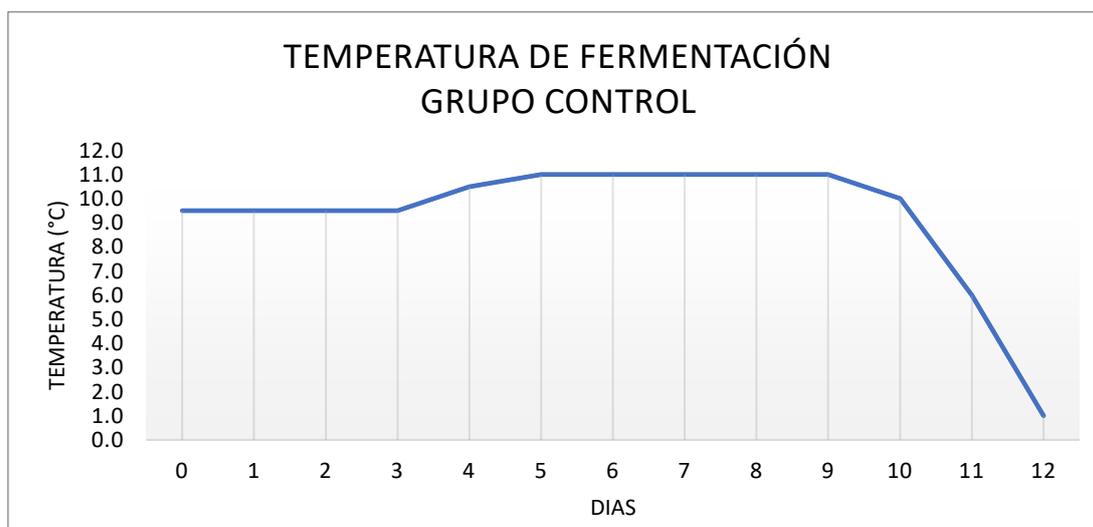


Figura 5. Temperaturas de fermentación del grupo control. Fuente: Elaboración propia

Tratamiento al grupo experimental

Los fermentadores que fermentarán las muestras pertenecientes al grupo control, fermentarán a temperaturas máximas de 15°C.

Tabla 2

Temperatura de fermentación para el grupo experimental

Días	Temperatura
0	9.5
1	10.5
2	10.5
3	13.5
4	15.0
5	15.0
6	15.0
7	15.0
8	15.0
9	15.0
10	1.0

Nota. Las temperaturas serán programadas desde un HMI

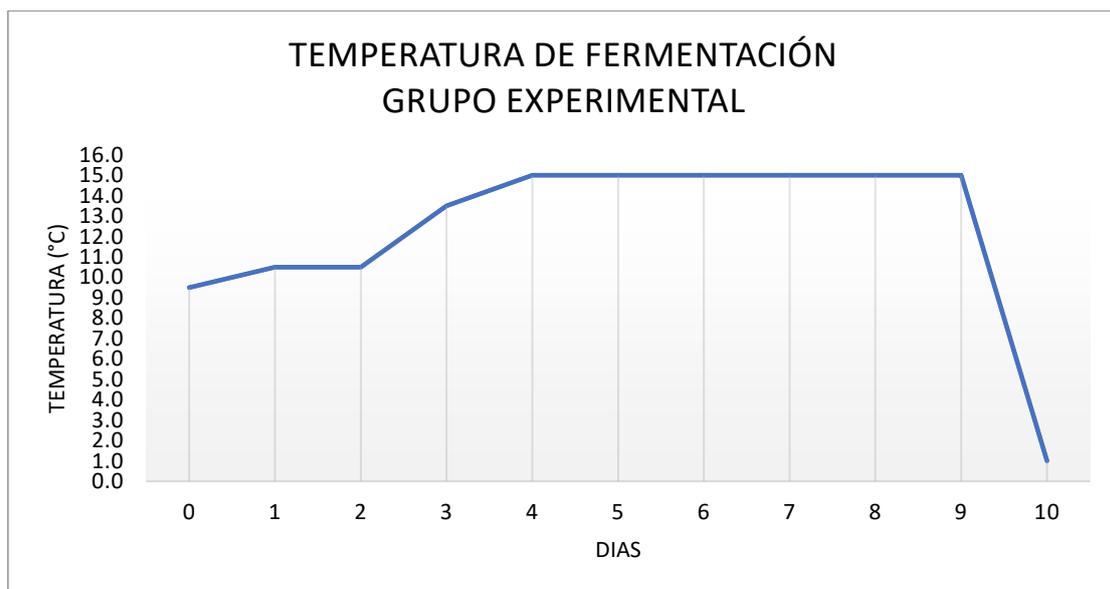


Figura 6. Temperaturas de fermentación del grupo experimental. Fuente: Elaboración propia

3.1.5. Características del área experimental

La sala de fermentadores debe estar a una temperatura aproximada de 8°C

El análisis de diacetilo en el laboratorio fisicoquímico debe realizarse en un ambiente a 20°C

3.1.6. Variables evaluadas

Variable Independiente: Temperatura de fermentación

Variable dependiente: Reducción del diacetilo de una cerveza lager

MATRIZ DE CONSISTENCIA

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
Temperatura de fermentación	<p>La temperatura de fermentación está relacionada a la velocidad de fermentación, reducción de compuestos volátiles, conversión de acetaldehído en etanol y reducción de diacetilo.</p> <p>Siebel Institute of Technology (2011)</p> <p>World Brewing Academy</p>	<p>Temperatura de fermentación se puede dividir en:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inicio de fermentación - Máxima (Krausen) - Enfriamiento 	Temperatura de inicio de fermentación	- Grados Celsius
			Temperatura Máxima (Krausen)	- Grados Celsius
			Temperatura de Enfriamiento	- Grados Celsius
Reducción del diacetilo de una cerveza lager	<p>El diacetilo le otorga un sabor impuro a la cerveza, puede ser considerado como criterio del grado de maduración de una cerveza</p> <p>Wolfgang Kunze (2006) Tecnología para cerveceros y malteros</p>	<p>Reducción de diacetilo en una cerveza lager de tener en cuenta:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Concentración del diacetilo -Tiempo de fermentación -Porcentaje de reducción de diacetilo 	Concentración del diacetilo	-ppm diacetilo
			Tiempo de fermentación	-Número de días
			Porcentaje de reducción de diacetilo	-Porcentaje

3.1.7. Conducción del experimento

La parte experimental está relacionada con la medición de la concentración del diacetilo en fermentadores de cerveza lager de la cual unos han sido fermentados siguiendo una curva de temperaturas ordinaria (grupo control) común en el proceso y otros siguiendo una curva de temperaturas distinta a la ordinaria (grupo experimental). Para el experimento se usará el método de análisis de la ASBC (2004) para análisis de 2,3 butanodiona en cerveza.

Para el cual primero se tomará una muestra de cada fermentador a analizar. Una vez tomadas las muestras se seguirá el siguiente procedimiento con cada una:

Se toman 350 ml. de cerveza sin descarbonatar y se le airea pasándola sucesivamente de un recipiente a otro (20 veces) La muestra aireada se vierte en una botella, se enchapa y se le pone en Baño María, luego se enfría a temperatura ambiental y posteriormente se lleva refrigeración.

En un balón de destilación se agregan 250 ml. de muestra tratada + 3 gotas de antiespumante + 25 ml. de solución alcalina de fosfato diácido de potasio. La tapa del balón de destilación debe ser de jebe con una toma de ingresos de tal forma que permita que este burbujee dióxido de carbono dentro de la muestra y se mantenga una atmósfera de en todo el sistema.

La salida del condensador debe introducirse dentro de un vaso de 50 ml. y el gas debe burbujear dentro de una solución que contiene 3 ml. de agua destilada + 0.75 ml. de clorhidrato de hidroxilamina al 6%. El vaso que recibe el destilado debe estar dentro de otro recipiente con hielo. Se debe colocar \pm 30 ml. de destilado. El destilado se concentra hasta \pm 15 ml. en un baño maría en ebullición y luego se deja enfriar al medio ambiente.

Luego de que enfría se le añade al concentrado 1 ml. de fosfato ácido de potasio y se deja en reposo por 5 minutos, luego se le agrega 0.6 ml. de hidróxido de amonio + 2.5 ml de tartrato de sodio y potasio + 0.2 ml de sulfato de fierro. Se completa a 20 ml. con agua destilada.

Se prepara un blanco con 3 ml. de agua destilada + 0.75 ml. de clorhidrato de hidroxilamina y agregando los mismos reactivos descritos hasta el momento. Finalmente se completa el volumen hasta 20 ml. con agua destilada.

Se lee la muestra en el espectrofotómetro a 520 nm. Calibrando a 0 de absorbancia con el blanco. El valor de absorbancia medido se multiplica por el factor 4.54 obtenido de la curva de calibración con 2,3 butanodiona del equipo.

Una vez obtenido los valores de diacetilo (2,3 butanodiona) en ppm, se registrarán en una tabla de Excel tanto el valor de la muestra control como el de la muestra experimental. Esta medición se efectuará tres días consecutivos correspondientes a los días 7, 8 y 9 del periodo de fermentación, los cuales también serán anotados en la tabla para su posterior análisis de datos.

Para la realización de la curva de calibración de diacetilo (2,3 butanodiona) en el espectrofotómetro se prepara en primer lugar una solución stock de 500 mg/L o 500 ppm de diacetilo (2,3 butanodiona) a partir de su estándar de 1000 mg/L y posteriormente una solución de trabajo de 5 mg/L a partir de la solución stock.

Tabla 3

Curva de calibración del espectrofotómetro para análisis de Diacetilo (2,3 butanodiona)

Punto de curva	Concentración mg Diacetilo/L (ppm)	Absorbancia
STD1	0.125	0.027
STD2	0.250	0.054
STD3	0.500	0.110
STD4	0.750	0.165
STD5	1.500	0.330
STD6	2.000	0.445

Nota. Los estándares son preparados a partir de una solución de trabajo de 5 ppm

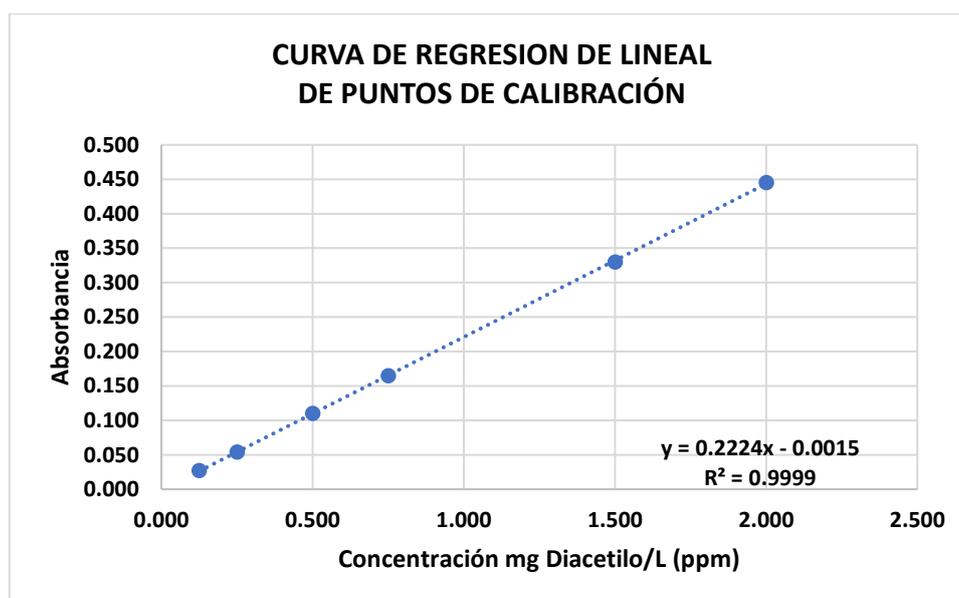


Figura 7. Curva de regresión lineal de los puntos de calibración del espectrofotómetro para análisis de Diacetilo (2,3 butanodiona). Fuente: Elaboración propia

Para la verificación del equipo se utilizará un filtro de Holmio certificado para la verificación de absorbancias del cual se adjunta su certificado como material de referencia (Anexo 7) del cual se obtiene la tolerancia del filtro: ± 0.11 nm así como la longitud de onda de picos máximos con referencia al aire a un ancho de banda espectral (SBW, por sus siglas en inglés) de 1 nm.

Para la obtención del rango de aceptación de absorbancias (Anexo 8) se considera las tolerancias del Filtro de oxido de holmio más la tolerancia del equipo espectrofotómetro para obtener la tolerancia final para cada longitud de onda característica del filtro de Holmio. Considerando un SBW de 1 nm.

El reporte de verificación de picos del espectrofotómetro con Filtro de Holmio (Anexo 9) se efectúa en el rango de longitudes de onda de 640 a 240 nm de acuerdo con el certificado del material de referencia filtro de Holmio y considerando la tolerancia para cada longitud de onda en concordancia con el rango de aceptación de absorbancias. Para lo cual se verifica que cada longitud de onda se encuentre en dicho reporte de verificación.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Población: Fermentadores de la empresa Heineken Perú

3.2.2. Muestra

Fermentadores de la empresa Heineken Perú. Para el muestreo se utilizará el muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple. Para determinar la cantidad de muestras necesarias a tomar se utilizará el software estadístico G*power.

3.3. Técnicas de recolección de datos

3.3.1. Técnicas empleadas

Técnica documental de información secundaria

Técnica cuantitativa experimental

3.3.2. Descripción de los instrumentos

Para técnica documental de información secundaria: Bibliografía, libros y sitios web.

Para técnica cuantitativa experimental: Materiales y equipos de laboratorio

3.4. Técnicas para el procedimiento de la información

Hoja de Excel para el procesamiento de la base de datos tomada de los registros del fermentador

SPSS para Análisis de datos

Organizadores visuales (Tablas, listas y gráficos)

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Formulación de hipótesis estadística

H_0 : La temperatura de fermentación no causa la reducción del diacetilo de una cerveza lager

$$H_0 : \mu_i = 0$$

H_1 : La temperatura de fermentación causa la reducción del diacetilo de una cerveza lager

$$H_1 : \mu_i \neq 0$$

4.2 Determinación del tamaño de muestra

Se utilizó el software estadístico G*power para calcular el tamaño de la muestra.

Para la prueba estadística ANOVA: Medidas repetidas, entre factores y dentro de los factores.

Ingresando el parámetro de entrada f de Cohen=0.25 tamaño del efecto (donde .10 es un efecto pequeño, .25 es un efecto medio y .40 es un efecto grande), error alfa (nivel de significancia α) = 0.05, Potencia = 0.90, Número de grupos (Factores Intersujetos) = 2, Número de mediciones (Factores intersujetos) = 3, Corr (correlación entre medidas repetidas) = 0.5 y se utilizó el límite inferior para el error de corrección de no esfericidad (ϵ)=0.5

Dando un tamaño de muestra de 60 en total, 30 del grupo control y 30 del grupo experimental.

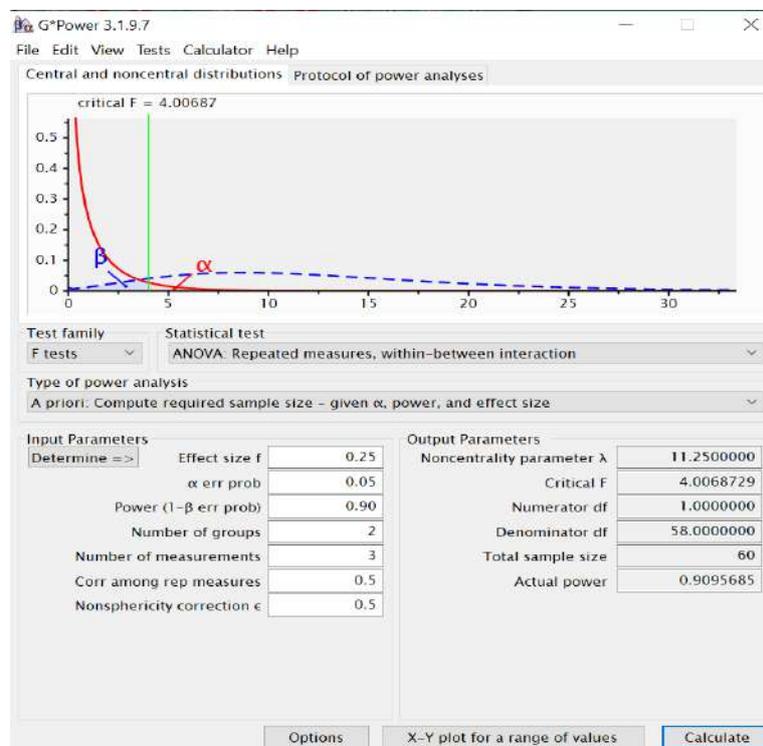


Figura 8. Tamaño de muestra ANOVA Medidas repetidas, entre factores y dentro de los factores. Fuente: Software G*power

4.3 Determinación de los factores intrasujetos e intersujetos

El ANOVA factorial de diseño mixto compara diferentes medidas cuando hay dos o más factores y al menos uno ha sido medido utilizando los mismos participantes (factor intra-sujeto) y al menos uno ha sido medido utilizando diferentes participantes (factor inter-sujeto)

Tabla 4

Factores intrasujetos

TIEMPO	VARIABLE DEPENDIENTE
1	Concentración de diacetilo Dia 7
2	Concentración de diacetilo Dia 8
3	Concentración de diacetilo Dia 9

Nota. Medida: Concentración de diacetilo

Tabla 5

Factores intersujetos

GRUPO	N
CONTROL	30
EXPERIMENTAL	30

Nota. N obtenido de software G*power

4.4 Estadísticos descriptivos

Tabla 6

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente	Grupo	Media	Desv, Tipica	N
CONCENTRACION DIACETILO DIA 7	CONTROL	0.420	0.02577	30
	EXPERIMENTAL	0.420	0.02551	30
	TOTAL	0.420	0.02559	60
CONCENTRACION DIACETILO DIA 8	CONTROL	0.293	0.04722	30
	EXPERIMENTAL	0.292	0.04733	30
	TOTAL	0.293	0.04711	60
CONCENTRACION DIACETILO DIA 9	CONTROL	0.182	0.05215	30
	EXPERIMENTAL	0.180	0.05207	30
	TOTAL	0.181	0.05206	60

Nota. Realizado en software Excel

4.5 Supuestos previos al análisis de datos

4.5.1 Cumplimiento del supuesto de normalidad

Se evalúa la normalidad de los factores intersujetos (Grupo control y experimental) así como de los factores intrasujetos (Concentración de diacetilo en los días 7,8 y 9).

Pruebas de normalidad							
	GRUPO	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CONCENTRACION_DIACE TILO_DIA_7	CONTROL	.143	30	.120	.947	30	.137
	EXPERIME	.114	30	.200 [*]	.970	30	.542
CONCENTRACION_DIACE TILO_DIA_8	CONTROL	.090	30	.200 [*]	.965	30	.404
	EXPERIME	.078	30	.200 [*]	.977	30	.740
CONCENTRACION_DIACE TILO_DIA_9	CONTROL	.106	30	.200 [*]	.943	30	.108
	EXPERIME	.160	30	.049	.951	30	.176

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Figura 9. Prueba de normalidad. Fuente: Software SPSS

Se toma en cuenta los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk pues el número de valores es menor de 50 sujetos.

El valor de significancia es mayor a 0.05 por lo cual los valores tienen distribución normal

4.5.2 Cumplimiento del supuesto de homocedasticidad u homogeneidad de las varianzas

La prueba contraste de Levene nos sirve para comprobar la homocedasticidad en el factor intersujetos, es decir en los grupos control y experimental.

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error ^a						
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
CONCENTRACION_DIACE TILO_DIA_7	Se basa en la media	.010	1	58	.919	
	Se basa en la mediana	.011	1	58	.917	
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	.011	1	55.946	.917	
	Se basa en la media recortada	.011	1	58	.916	
CONCENTRACION_DIACE TILO_DIA_8	Se basa en la media	1.067	1	58	.306	
	Se basa en la mediana	.874	1	58	.354	
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	.874	1	54.888	.354	
	Se basa en la media recortada	1.044	1	58	.311	
CONCENTRACION_DIACE TILO_DIA_9	Se basa en la media	2.346	1	58	.131	
	Se basa en la mediana	1.310	1	58	.257	
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1.310	1	47.617	.258	
	Se basa en la media recortada	2.167	1	58	.146	

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Diseño : Intersección + GRUPO
Diseño intra-sujetos: TIEMPO

Figura 10. Prueba de igualdad de Levene. Fuente: Software SPSS

Esta prueba analiza la igualdad de las varianzas para los factores intersujetos se puede observar que en cada factor analizado se cumple que el valor de significación es mayor que $p > 0.05$ es decir se cumple el supuesto de homogeneidad de las varianzas.

4.5.3 Cumplimiento del supuesto de esfericidad

Se realiza la prueba de esfericidad de Mauchly tomando en cuenta el efecto intrasujetos: Tiempo

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: CONCENTRACION_DIACETILO

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
TIEMPO	.996	.246	2	.884	.996	1.000	.500

Prueba la hipótesis nula de que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Intersección + GRUPO
Diseño intra-sujetos: TIEMPO

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos intra-sujetos.

Figura 11. Prueba de Esfericidad de Mauchly. Fuente: Software SPSS

Se obtuvo que el Valor de significancia p es mayor a 0.05 por lo cual los datos cumplen el criterio de esfericidad.

4.6 Interpretación del análisis estadístico

4.6.1 Pruebas POST-HOC

Utilizamos la prueba de Bonferroni para hacer pruebas de T student en pares de muestras la cual divide el error entre el número de contrastes (0.05/num. Contrastes)

Comparaciones por parejas

Medida: CONCENTRACION_DIACETILO

(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig. ^b	95% de intervalo de confianza para diferencia ^b	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	.127 [*]	.002	<.001	.123	.132
	3	.239 [*]	.002	<.001	.234	.244
2	1	-.127 [*]	.002	<.001	-.132	-.123
	3	.111 [*]	.002	<.001	.106	.116
3	1	-.239 [*]	.002	<.001	-.244	-.234
	2	-.111 [*]	.002	<.001	-.116	-.106

Se basa en medias marginales estimadas

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

Figura 12. Comparación por parejas. Fuente: Software SPSS

Existen diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$ en la comparación por parejas entre las muestras con respecto al tiempo.

4.6.2 Prueba de efectos intrasujetos

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: CONCENTRACION_DIACETILO

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
TIEMPO	Esfericidad asumida	1.716	2	.858	7186.684	<.001	.992	14373.368	1.000
	Greenhouse-Geisser	1.716	1.991	.862	7186.684	<.001	.992	14311.766	1.000
	Huynh-Feldt	1.716	2.000	.858	7186.684	<.001	.992	14373.368	1.000
	Límite inferior	1.716	1.000	1.716	7186.684	<.001	.992	7186.684	1.000
TIEMPO * GRUPO	Esfericidad asumida	.026	2	.013	110.108	<.001	.655	220.216	1.000
	Greenhouse-Geisser	.026	1.991	.013	110.108	<.001	.655	219.273	1.000
	Huynh-Feldt	.026	2.000	.013	110.108	<.001	.655	220.216	1.000
	Límite inferior	.026	1.000	.026	110.108	<.001	.655	110.108	1.000
Error(TIEMPO)	Esfericidad asumida	.014	116	.000					
	Greenhouse-Geisser	.014	115.503	.000					
	Huynh-Feldt	.014	116.000	.000					
	Límite inferior	.014	58.000	.000					

a. Se ha calculado utilizando alpha = .05

Figura 13. Prueba de efectos intrasujetos. Fuente: Software SPSS

Como la prueba de esfericidad es no significativa, es decir una $p > 0.05$ por lo tanto se cumplía la esfericidad, tomamos en cuenta la esfericidad asumida.

Existe una interacción significativa de los factores tiempo * grupo en la variable concentración de diacetilo $F(2, 116) = 110.108$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.655$.

4.6.3 Prueba de efectos intersujetos

Pruebas de efectos inter-sujetos

Medida: CONCENTRACION_DIACETILO

Variable transformada: Media

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada ^a
Intersección	15.985	1	15.985	60792.042	<.001	.999	60792.042	1.000
GRUPO	.274	1	.274	1042.409	<.001	.947	1042.409	1.000
Error	.015	58	.000					

a. Se ha calculado utilizando alpha = .05

Figura 14. Prueba de efectos intersujetos. Fuente: Software SPSS

Existe un efecto principal significativo del factor grupo en la variable concentración de diacetilo $F(1, 58) = 60792.042$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.999$.

4.6.4 Medias marginales estimadas

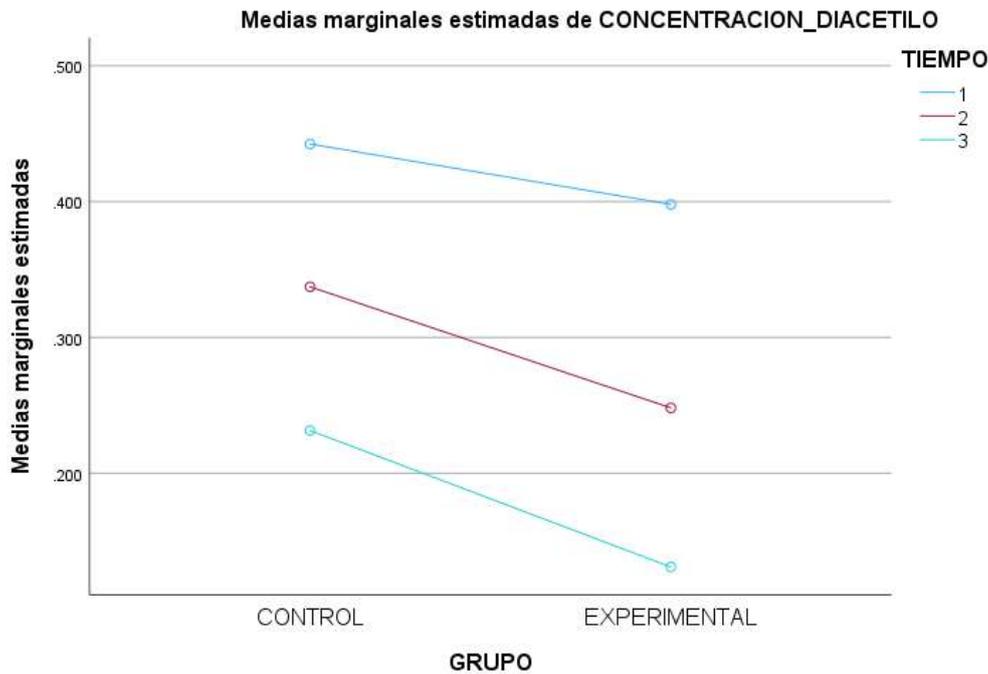


Figura 15. Medidas marginales estimadas de Concentración de diacetilo para el grupo experimental y control. Fuente: Software SPSS

4.7 Interpretación de los resultados

Para el reporte de resultados se tomará en cuenta los resultados presentados en las tablas de estadísticos descriptivos, comparación por parejas, prueba de efectos intrasujetos, efecto intersujetos

Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de concentración de diacetilo en los tres días con un tamaño de efecto grande $F(2,116) = 110.108$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.655$, $\beta - 1 = 1$. En donde las puntuaciones del día 7 ($M = 0.42$, $DT = 0.0256$) fueron menores a la concentración de diacetilo en el día 8 ($M = 0.293$, $DT = 0.0471$, $p < 0.05$ [IC 95% 0.123, 0.132]) y a la concentración de diacetilo del día 9 ($M = 0.181$, $DT = 0.0521$, $p < 0.05$ [IC 95% 0.234, 0.244]). Asimismo, la concentración de diacetilo en el día 8 fue menor que la concentración de diacetilo el día 9 ($p < 0.05$ [IC 95% 0.106, 0.116]).

Existe una interacción significativa de los factores tiempo * grupo en la variable concentración de diacetilo $F(2,116) = 110.108$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.655$, lo cual indica que el 65.5% de la varianza se explica por la interacción de esos dos factores.

Por lo tanto, existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de diacetilo según el tiempo.

Existe un efecto principal significativo del factor grupo en la variable concentración de diacetilo $F(1, 58) = 60792.042$, $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.999$, lo cual indica que el 99.9% de la varianza se explica por la diferencia entre grupos (control y experimental).

Por lo tanto, existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de diacetilo según el grupo.

CAPITULO V. DISCUSIÓN

En la evaluación de la influencia de la temperatura de fermentación en la reducción del diacetilo de una cerveza lager, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de diacetilo según el tiempo y según el grupo. Además, existe una interacción significativa de los factores tiempo y grupo en la concentración de diacetilo.

Estos resultados sugieren que la temperatura de fermentación es un factor importante a considerar en la producción de cerveza lager con bajo contenido de diacetilo. Además, es importante tener en cuenta la interacción entre la temperatura y el tiempo para optimizar la reducción del diacetilo en la cerveza.

A pesar de que subir la temperatura de fermentación puede ayudar a lograr la reducción del diacetilo a los parámetros adecuados en menor tiempo, es importante tener en cuenta que esto también puede ocasionar el aumento de la presencia de otros compuestos perjudiciales al perfil de la cerveza, como los alcoholes superiores, causantes de la resaca. Por lo tanto, es importante considerar la influencia de la temperatura de fermentación en la presencia de otros compuestos que pueden perjudicar el perfil de la cerveza, lo cual puede ser un tema para investigaciones posteriores en la misma línea de investigación.

Asimismo, es necesario indicar que existen otros métodos para analizar la concentración de diacetilo como, por ejemplo, el análisis sensorial y análisis por cromatografía de gases, y es posible que estos métodos puedan proporcionar resultados complementarios o alternativos. Sería interesante futuras investigaciones para comparar los resultados obtenidos con diferentes métodos y verificar su consistencia.

Es importante continuar investigando para entender mejor cómo la temperatura de fermentación y otros factores afectan la cantidad de diacetilo presente en la cerveza.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- El análisis estadístico realizado indicó que la temperatura de fermentación causa una reducción significativa del diacetilo en la cerveza lager, demostrado por las diferencias estadísticamente significativas en la concentración de diacetilo según el tiempo y el grupo ($p < 0.05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula H_0 y se acepta la hipótesis alternativa H_1 .

- En base a los resultados presentados en las tablas de estadísticos descriptivos, comparación por parejas, prueba de efectos intrasujetos e intersujetos, se pudo demostrar la relación causal entre la temperatura de fermentación y la reducción del diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

- Los resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de diacetilo según el grupo, lo cual demuestra el efecto causal de la manipulación de la temperatura de fermentación en la concentración del diacetilo de una cerveza lager, en comparación con un grupo control en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

Los resultados también demuestran una diferencia significativa entre los grupos, con una mayor reducción de diacetilo en el grupo experimental en comparación con el grupo control.

- Los resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de diacetilo según el tiempo, lo cual establece la relación causal entre la temperatura de fermentación y el tiempo de fermentación de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

La interacción entre el tiempo y grupo explica gran parte de la varianza en la concentración de diacetilo, lo que sugiere que ambos factores son importantes para el resultado final.

- Los resultados indican que existe un efecto principal significativo del factor grupo en la variable concentración de diacetilo, lo cual verifica experimentalmente la relación de causa entre la temperatura de fermentación y el porcentaje de reducción de diacetilo de una cerveza lager en Heineken Perú, Huachipa, 2022.

La manipulación de la temperatura de fermentación tuvo un impacto significativo en la concentración de diacetilo, con un aumento del porcentaje de reducción en la concentración de diacetilo.

6.2. Recomendaciones

Realizar un seguimiento adecuado del tiempo de fermentación al aumentar la temperatura de fermentación para evitar la presencia de otros compuestos perjudiciales al perfil de la cerveza.

Continuar investigando y monitoreando los efectos de la temperatura de fermentación en la reducción de diacetilo y otros compuestos relevantes para la calidad de la cerveza.

Considerar las variables ambientales y las prácticas de producción que puedan afectar la concentración de diacetilo en la cerveza.

Desarrollar programas de capacitación para los trabajadores en la manipulación adecuada de la temperatura de fermentación y su relación con la calidad de la cerveza.

Se sugiere llevar a cabo más investigaciones con diferentes tipos de cerveza y en diferentes condiciones para tener una comprensión más amplia de la influencia de la temperatura de fermentación en la reducción del diacetilo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fuentes documentales

Altamirano, C. (2013). Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza, desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Arana, G. (2016). “Proceso productivo de la elaboración de cerveza lager a nivel industrial”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Comptom, J. (1977). El cervecero en la Práctica.: Asociación de Maestros cerveceros de las Américas. Madison, Wisconsin. Estados Unidos.

Falcón, C. (2018). Estudio de la actividad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizadas en soportes naturales para la fermentación de cerveza. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Féchir, M. (2022). Molecular Insights into the Contribution of Specialty Malts to the Beer Aroma. Technische Universität München School of Natural Sciences, Dr. rer. nat. Dissertation, Technische Universität München.

Gómez, A. (2014). Mejora y optimización del proceso de elaboración de la cerveza dentro de una industria cervecera. Universitat Politècnica De Valencia, España

Hornsey, I. S. (2003). Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología. Acribia, España

Huamán, D. & León, E. (2019). Diseño y construcción de un biorreactor “Airlift” y determinación de parámetros de operación óptimos para su aplicación en procesos fermentativos”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú

Leal, A. (2017). Vicinal Diketones Monitoring During Lager Beer Fermentation: The Importance of Nitrogenous Compounds. (Tesis de maestría en Bioquímica Aplicada), Universidad de Madeira, Funchal, Madeira, Portugal.

Marais, L. (2010). The effect of yeast propagation temperature on diacetyl reduction. An in-process study at Spendrups brewery. Göteborg, Sweden.

Naydenova, V., Iliev, V., Kaneva, M., & Kostov, G. (2014). Modeling of alcohol fermentation in brewing - carbonyl compounds synthesis and reduction. Department "Technology of wine and brewing", University of Food Technologies, Plovdiv, Bulgaria.

Owen, T. (2000). Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna Conceptos básicos. Agilent Technologies, Alemania.

Toribio, K. (2015). Evaluación de la estabilidad como starter de *Saccharomyces Pastorianus* ssp. *Carlsbergensis* para la producción de cerveza tipo lager. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

Vogel, W. (2003). Elaboración casera de cerveza. Acribia. España.

Zambrano, J., & Borbor, K. (2014). Utilización de una nueva cepa de levadura en el proceso de fermentación en una industria cervecera en la ciudad de Guayaquil. (Tesis de Grado en Ingeniería en Alimentos) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil, Ecuador.

Fuentes bibliográficas

ASBC. (2004) ASBC Methods of Analysis (9th ed.), American Society of Brewing Chemists; St. Paul, Minnesota.

Alves, P., & de Faria, F. (2008). Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. BR. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Vol. 28. Brasil.

Hough, J. (1990). Biotecnología de la cerveza y de la malta. (J. B. Gonzales, Trad.) Zaragoza, España: Acribia.

Kunze, W. (2006). Tecnología para Cerveceros y Malteros (Primera ed.). (C. Bauer, Trad.) España: VLB Berlín.

MEBAK, (2000) Recopilación de Métodos Técnicos Cerveceros de la Comisión de Análisis de Europa Central. Métodos de análisis cerveceros, Tomo III. (ALAFACE, Trad.) Caracas, Venezuela.

Novotny, C., Flieger, M., Panos, J., & Karst, F. (1992). Effect of 5,7-unsaturated sterols on ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Applied Biochemistry. Estados Unidos.

NTP 213.014:2014 CERVEZA. Requisitos (2014). Lima, Peru: CNB-INDECOPI.

Fuentes hemerográficas

Krogerus, K., & Gibson, B. R. (2016). 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 119, 86-97.

Fuentes electrónicas

ASTG-4 (2005) Technical guide: UV/Vis Spectrophotometers – Calibration Procedures. International Accreditation New Zealand (IANZ). Obtenido de: http://www.ianz.govt.nz/publications2/pdfs/ASTG4_UVVIS_Spectro.pdf

Blázquez, J. (2005) Calibración de espectrofotómetros para la medida directa de absorbancias. III Congreso Virtual Iberoamericano. Gestión de Calidad en Laboratorios. Obtenido de: <http://www.iberolab.org/opencms/opencms/congreso/IberolabIII2005/index.html>

Delgado, F. S. (2014). Elaboración de la cerveza. Instituto Nacional de Tecnologías Educativas, Volumen 8. Obtenido de: [https://aliso.pntic.mec.es/~vferna8/recursos/elaboracion de cerveza.pdf](https://aliso.pntic.mec.es/~vferna8/recursos/elaboracion_de_cerveza.pdf)

Floch, A. L. (2014). De la malta a la cerveza. Malteurop, Volumen 5. Obtenido de www.es.malteurop.com

Gigliarelli, P. (2013). Fermentación. Mash, Volumen 379. Obtenido de <http://www.revistamash.com/detalle.php?id=379>

Guy, M. [Math Guy Zero]. (2022, 8 de junio). G*Power- Mixed design ANOVA minimum sample size. [Video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=3Dbm-LCp5w>

Mazariegos, A. (2011). Elaboracion de Cerveza. Universidad de San Carlos de Guatemala Volumen 1. Obtenido de: <http://documents.mx/documents/cerveza-559546f8124e3.html>

Real academia española: *Diccionario de la lengua española*, 23.^a ed. Obtenido de: <https://dle.rae.es>

StatisTICs. [Serra, P; Ponce, M; López, L; González, L & García, X.] (2010) Introducción- Análisis de varianza factorial diseño mixto [Video]. Youtube. Obtenido de: <https://youtu.be/E546OOaD7S8>

ANEXOS

Anexo 1. Registro fotográfico



Toma de muestra de fermentadores



Análisis de diacetilo de cada muestra



Medición de diacetilo en Espectrofotómetro UV-VIS



Material de referencia para Verificación de Espectrofotómetro UV-VIS - Filtro de Holmio

Anexo 2. Resultados del análisis de diacetilo

Estudio sobre la evaluación de la influencia de la temperatura de fermentación (grupo experimental y grupo control) en la concentración de diacetilo (días 7, 8 y 9)

ID	GRUPO	FERMENTADOR	CONCENTRACION DIACETILO DIA 7 (en ppm)	CONCENTRACION DIACETILO DIA 8 (en ppm)	CONCENTRACION DIACETILO DIA 9 (en ppm)	ID	GRUPO	FERMENTADOR	CONCENTRACION DIACETILO DIA 7 (en ppm)	CONCENTRACION DIACETILO DIA 8 (en ppm)	CONCENTRACION DIACETILO DIA 9 (en ppm)
1	CONTROL	F7	0.450	0.324	0.232	31	CONTROL	F5	0.450	0.329	0.243
2	EXPERIMENTAL	F2	0.383	0.257	0.126	32	EXPERIMENTAL	F4	0.412	0.246	0.131
3	CONTROL	F4	0.455	0.334	0.241	33	CONTROL	F5	0.460	0.352	0.239
4	EXPERIMENTAL	F8	0.372	0.263	0.153	34	EXPERIMENTAL	F8	0.405	0.228	0.123
5	CONTROL	F5	0.455	0.339	0.229	35	CONTROL	F4	0.453	0.329	0.244
6	EXPERIMENTAL	F4	0.375	0.241	0.134	36	EXPERIMENTAL	F6	0.389	0.226	0.102
7	CONTROL	F3	0.425	0.332	0.218	37	CONTROL	F8	0.440	0.330	0.231
8	EXPERIMENTAL	F5	0.389	0.249	0.118	38	EXPERIMENTAL	F5	0.402	0.229	0.138
9	CONTROL	F6	0.434	0.338	0.218	39	CONTROL	F9	0.434	0.312	0.22
10	EXPERIMENTAL	F7	0.418	0.263	0.117	40	EXPERIMENTAL	F4	0.395	0.238	0.123
11	CONTROL	F2	0.435	0.346	0.236	41	CONTROL	F5	0.461	0.358	0.225
12	EXPERIMENTAL	F8	0.408	0.255	0.150	42	EXPERIMENTAL	F3	0.407	0.247	0.138
13	CONTROL	F5	0.421	0.318	0.228	43	CONTROL	F8	0.453	0.362	0.238
14	EXPERIMENTAL	F7	0.401	0.241	0.134	44	EXPERIMENTAL	F7	0.389	0.224	0.135
15	CONTROL	F2	0.439	0.345	0.219	45	CONTROL	F5	0.456	0.366	0.242
16	EXPERIMENTAL	F4	0.388	0.247	0.146	46	EXPERIMENTAL	F4	0.42	0.266	0.139
17	CONTROL	F8	0.427	0.338	0.246	47	CONTROL	F6	0.420	0.335	0.215
18	EXPERIMENTAL	F6	0.391	0.248	0.150	48	EXPERIMENTAL	F2	0.408	0.252	0.135
19	CONTROL	F5	0.435	0.326	0.231	49	CONTROL	F7	0.436	0.322	0.217
20	EXPERIMENTAL	F4	0.386	0.244	0.146	50	EXPERIMENTAL	F5	0.406	0.271	0.147
21	CONTROL	F3	0.427	0.319	0.229	51	CONTROL	F2	0.448	0.324	0.239
22	EXPERIMENTAL	F7	0.410	0.256	0.115	52	EXPERIMENTAL	F4	0.396	0.245	0.123
23	CONTROL	F4	0.448	0.348	0.222	53	CONTROL	F8	0.452	0.329	0.233
24	EXPERIMENTAL	F7	0.379	0.234	0.105	54	EXPERIMENTAL	F2	0.398	0.268	0.137
25	CONTROL	F5	0.435	0.345	0.245	55	CONTROL	F5	0.461	0.368	0.235
26	EXPERIMENTAL	F4	0.395	0.259	0.104	56	EXPERIMENTAL	F8	0.385	0.264	0.133
27	CONTROL	F2	0.437	0.341	0.236	57	CONTROL	F7	0.430	0.311	0.213
28	EXPERIMENTAL	F8	0.412	0.236	0.119	58	EXPERIMENTAL	F6	0.401	0.251	0.133
29	CONTROL	F7	0.445	0.335	0.245	59	CONTROL	F2	0.450	0.362	0.234
30	EXPERIMENTAL	F6	0.408	0.242	0.139	60	EXPERIMENTAL	F9	0.409	0.253	0.135

Anexo 3. Certificado de calificación del espectrofotómetro



Representante Autorizado



CERTIFICADO DE CALIFICACION N° ADP-OQ-UVVIS-005-2021

El presente indica la CONFORMIDAD al término de la Calificación del sistema mencionado líneas abajo, de parte de ANALITICA DEL PACIFICO SAC y el Usuario Final (representado por el responsable del laboratorio y/o de la adquisición del mismo).

El SISTEMA Y SOFTWARE ASOCIADO **CUMPLE** Las funciones para las que fue fabricado, según consta en documentos de Calificación y Reportes Adjuntos.

CLIENTE: LIMBA S.A.C. - HEINEKEN PERU
DIRECCION: Av. La Paz 129 – Santa Maria de Huachipa – Lurigancho
INSTRUMENTO: Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific® Genesys 150

FECHA DE REALIZACION: Lunes, 10 de Mayo de 2021

SISTEMA INSTALADO:

Marca:	Thermo Scientific
Modelo:	Genesys 150
N° Serie	9A5Y311028
Ubicación:	Laboratorio
Id. Interna:	No indica
Software:	Vision Lite 5.4

Accesorio(s) Instalados

Descripción de Modulo	Modelo	N° de Serie	Id. Interna
Espectrofotómetro UVVIS	Genesys 150	9A5Y311028	N/A
--	--	--	--

PRUEBAS REALIZADAS

PRUEBA	ESTÁNDARES UTILIZADOS				RESULTADO DE LA PRUEBA
	SET	IDENTIFICACION	CERTIFICADO	VENCIMIENTO	
RUIDO 0,0 a 500nm	Ninguno	Ninguno	Ninguno	No aplica	CONFORME
EXACTITUD FOTOMETRICA (ABS)	Set de 6 estándares de vidrio polarizado	SA1502-XX	CC007224	21/06/2022	CONFORME
LUZ DIFUSA	Estándar de Luz Difusa (Nitrito de Sodio en Agua)	25144	27 de Diciembre de 2075	29/06/2021	CONFORME
PRECISION DE LONGITUD DE ONDA	Filtro de Oxido de Holmio	SA1501-Ho	CC007226	20/06/2022	CONFORME
REPETIBILIDAD DE LONGITUD DE ONDA	Filtro de Oxido de Holmio	SA1501-Ho	CC007226	20/06/2022	CONFORME
PLANEIDAD DE LINEA BASE	Ninguno	Ninguno	Ninguno	No aplica	CONFORME
PRECISION DE LONGITUD DE ONDA	Barrido de Xenón interno	9A5Y311028	No aplica	No aplica	CONFORME
EXACTITUD FOTOMETRICA (ABS)	Celda de Dicromato de Potasio	25110	64170	21/06/2021	CONFORME

PROXIMO SERVICIO

miércoles, 11 de Mayo de 2022

Lima, 11 de Mayo de 2021


 Analítica del Pacífico S.A.C.
 Javier Paredes
 INGENIERO DE SOPORTE

(FIRMA DE INGENIERO DE SERVICIO)

CERVEZA. Requisitos

1. OBJETO

Esta Norma Técnica Peruana establece los requisitos que deben cumplir las cervezas.

2. REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Técnica Peruana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda Norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos, con base en ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones recientes de las normas citadas seguidamente. El Organismo Peruano de Normalización posee, en todo momento, la información de las Normas Técnicas Peruanas en vigencia.

Normas Técnicas Nacionales

2.1	NTP 210.027:2011	BEBIDAS ALCOHOLICAS. Rotulado
2.2	NTP 209.038:2009 (revisada el 2014)	ALIMENTOS ENVASADOS. Etiquetado
2.3	NTP 213.004:2015	CERVEZA. Alcohol en cerveza por destilación
2.4	NTP 213.037:2015	CERVEZA. Método para determinar el extracto original, real y aparente en cervezas

2.5	NTP 213.038:2015	CERVEZA. Determinación de dióxido de carbono. Método de presión
2.6	NTP 213.027:2016	CERVEZA. Método espectrofotométrico para la determinación del color
2.7	NTP 213.013:2015	CERVEZA. Toma de muestras

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Técnica Peruana se aplica a las cervezas.

4. DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Técnica Peruana se aplican las siguientes definiciones:

4.1 **aditivos alimentarios:** Cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluido los organolépticos) en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características.

4.2 **coadyuvante de elaboración:** Toda sustancia o materia, excluidos aparatos y utensilios, que en cuanto tal no se utiliza como ingrediente alimentario y que se emplea intencionadamente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes, para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración pudiendo dar lugar a la presencia no intencionada pero inevitable, de residuos o derivados en el producto final.

4.3 **adjuntos cerveceros:** Materias primas que sustituyan parcialmente a la malta, o al extracto de malta, en la elaboración de cerveza. Su empleo no podrá superar el 45 % en relación al extracto original o primitivo.

Se consideran adjuntos cerveceros a la cebada cervecera y a los cereales, malteados o no, aptos para el consumo humano, a excepción de los productos definidos como cebada malteada o malta y extracto de malta.

También se consideran adjuntos cerveceros a los almidones y azúcares de origen vegetal.

4.4 **agua de bebida:** Agua que puede ser consumida debido a que no representa un riesgo para la salud.

4.5 **cebada malteada o malta:** Es el producto resultante de someter el grano de cebada a un proceso controlado de remojo, germinación, secado y/o tostado. Las maltas de otros cereales deberán denominarse de acuerdo con su procedencia: malta de trigo, malta de maíz, es decir deberá denominarse “malta...” seguido del nombre del cereal.

4.6 **cerveza:** Se entiende exclusivamente por cerveza a la bebida resultante de un proceso de fermentación controlado, mediante levadura cervecera, de un mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionado de lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazada por adjuntos cerveceros.

4.7 **lúpulo:** Son los conos de la inflorescencia del *Humulus lupulus*, bajo su forma natural o industrializada aptos para el consumo humano.

4.8 **extracto original o extracto primitivo:** Es la cantidad de sustancias disueltas (extracto) del mosto que dio origen a la cerveza y se expresa en porcentaje (%) en peso o grados Plato (°P).

4.9 **mosto de cerveza:** Es la solución acuosa de carbohidratos, proteínas, sales minerales y demás compuestos resultantes de la degradación enzimática de la malta, con o sin adjuntos cerveceros, con lúpulo, realizada mediante procesos tecnológicos adecuados.

5. CLASIFICACIÓN

Las cervezas se clasifican en:

5.1 Respecto a su extracto original o extracto primitivo:

5.1.1 **Cerveza liviana:** Es la cerveza cuyo extracto original es mayor o igual a 5 % en peso y menor que 9,0 °P en peso. Podrá denominarse “light” a la cerveza liviana cuando también cumpla con los requisitos a) y b).

- a) Reducción de 25 % del contenido de nutrientes y/o del valor energético con relación a una cerveza similar del mismo fabricante (misma marca) o del valor medio del contenido de tres cervezas similares conocidas, que sean producidas en la región; y
- b) Valor energético de la cerveza lista para el consumo: máximo de 35 Kcal/100 mL .

5.1.2 **Cerveza:** Es la cerveza cuyo extracto original es mayor o igual a 9,0 °P en peso.

5.2 Respecto al grado alcohólico:

5.2.1 **Cerveza sin alcohol:** Se entiende a la cerveza cuyo contenido alcohólico es inferior o igual a 0,5 % en volumen.

5.2.2 **Cerveza con alcohol:** Es la cerveza cuyo contenido alcohólico es superior a 0,5 % en volumen.

5.3 Respecto al color:

5.3.1 **Cervezas claras:** color < 30 unidades E.B.C.

5.3.2 **Cervezas oscuras:** color \geq 30 unidades E.B.C.

5.4 **Respecto a la proporción de materias primas**

5.4.1 **Cerveza**

Es la cerveza elaborada a partir de un mosto cuyo contenido de cebada malteada es igual o mayor que 55 °P en peso.

5.4.2 **Cerveza 100 % malta o de pura malta**

Es la cerveza elaborada a partir de un mosto cuyo extracto primitivo proviene exclusivamente de cebada malteada.

5.4.3 **Cerveza de ...(seguida del nombre del o de los cereales mayoritarios)**

Es la cerveza elaborada a partir de un mosto cuyo extracto original proviene mayoritariamente de adjuntos cerveceros. Podrá tener hasta un 80 % en peso de la totalidad de los adjuntos cerveceros referido a su extracto original (no menos del 20 % en peso de malta). Cuando dos o más cereales aporten igual cantidad de extracto original, deben citarse todos ellos.

5.4.4 **Denominaciones especiales**

5.4.4.1 Cerveza aromatizada, coloreada y/o saborizada, es el producto al cual se le ha adicionado aromatizantes y/o saborizantes limitados por buenas prácticas de manufactura y demás sustancias aprobadas por la autoridad sanitaria competente. Véase el apartado 4.6 .

6. CONDICIONES GENERALES

6.1 Se deberá tener en cuenta la legislación nacional vigente para la elaboración, preparación, manipulación y conservación del producto.

6.2 La cerveza no debe ser turbia ni contener sedimentos, (a excepción de aquellas que por la naturaleza de sus materias primas y sus procesos de producción presentan turbidez como característica propia).

6.3 Prácticas permitidas

El agua de proceso puede ser corregida mediante tratamientos que no dejen residuos nocivos a la salud.

6.4 Prácticas no permitidas.

No está permitida la adición o uso en el proceso de producción:

- Alcoholes, cualquiera sea su procedencia.
- Agentes edulcorantes artificiales.
- Sustitutos del lúpulo o sus derivados por otros.
- Usar saponinas u otras sustancias espumígenas no autorizadas expresamente.

7. REQUISITOS

7.1 Las cervezas deberán satisfacer los siguientes requisitos:

- 7.1.1 Contener un mínimo de 0,3 % de dióxido de carbono por peso.
- 7.1.2 Contener un mínimo de extracto original del 5 % en peso.
- 7.1.3 El contenido de alcohol debe estar de acuerdo a su clasificación (véase en los apartados 5.2.1 y 5.2.2).
- 7.1.4 El color debe estar de acuerdo a su clasificación (véase en los apartados 5.3.1 y 5.3.2).
- 7.2 **Requisitos específicos**
- 7.2.1 La cerveza debe cumplir con los requisitos establecidos en la Tabla 1 .

TABLA 1

PARÁMETROS MEDIDOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Contenido alcohólico a 20° C	% (v/v)	0,5	NTP 213.004
Extracto original	°Plato	5	NTP 213.037
Contenido de dióxido de carbono	Volúmenes de CO ₂	0.3	NTP 213.038
Color	EBC	*	NTP 213.027

* Véase en los apartado 5.3.1 y 5.3.2 .

8. MUESTREO

Las muestras se extraerán de acuerdo a la NTP 213.013 .

9. ENVASE Y ROTULADO

9.1 **Envase:** Deberá cumplir con los siguientes requisitos:

9.1.1 Los envases para el expendio de la cerveza deberán cumplir con las buenas prácticas de manufactura. La cerveza debe envasarse en recipientes de material resistente a la acción del producto que no alteren las características del mismo.

9.2 **Rotulado:** Los requisitos del rotulado deberán ser los establecidos en la NTP 210.027 en lo que aplique.

10. ANTECEDENTE

NTP 213.014:2014

CERVEZAS. Requisitos

Anexo 5. Ficha técnica levadura



SafLager™ S-23



Esta cepa de fermentación baja es originaria del instituto VLB de Berlín, Alemania, y es recomendada para la producción de lagers frutales, con elevados ésteres. Su bajo perfil de atenuación produce cervezas con buena persistencia en el paladar.

INGREDIENTES: Levadura (*Saccharomyces pastorianus*), agente emulsionante E491

ÉSTERES TOTALES

37

ppm a 18°P y 12°C durante las primeras 48 h de fermentación, luego a 14 °C en tubos EBC

ALCOHOLES SUPERIORES TOTALES

177

ppm a 18°P y 12°C durante las primeras 48 h de fermentación, luego a 14 °C en tubos EBC

AZÚCARES RESIDUALES

8 g/l*

* 4g maltotriose/L corresponde a un atenuación aparente de 82%

FLOCULACIÓN

+

SEDIMENTACIÓN

Rápido

FERMENTACIÓN: ideal 12-15°C (53.6-59°F)

DOSIS: 80 a 120 g/hl cuando es inoculada a 12 – 15°C (53-59°F).

Se requiere un incremento de la dosis cuando se inoculan mostos a temperaturas por debajo de los 12°C (53°F), hasta 200 a 300 g/hl a 9°C (48°F).

SIEMBRA:

La habilidad de Lesaffre y su mejora continua en el proceso de producción, genera una calidad excepcional de levaduras secas. Son capaces de resistir a una larga variedad de formas de uso como la rehidratación en frío o la no rehidratación, sin afectar su viabilidad, su perfil cinético y/o analítico. Los cerveceros pueden elegir las condiciones de utilización correspondientes a sus necesidades como:

La siembra directa



Sembrar directamente la levadura en la cuba, sobre la superficie del mosto aunque el mismo esté a una temperatura mayor a la de fermentación. Espolvorear progresivamente la levadura seca en el mosto, cuidando que la levadura cubra toda la superficie disponible, a fin de evitar la formación de grumos. Idealmente, la levadura debería ser añadida durante la primera parte del llenado del recipiente. En ese caso, la hidratación puede ser realizada a una temperatura del mosto superior a la temperatura de fermentación. El fermentador una vez lleno, alcanzará una temperatura más baja para el inicio de la fermentación.

Con una rehidratación previa

Alternativamente, espolvorear la levadura en al menos 10 veces su peso en agua estéril o en mosto hervido y a una temperatura entre 15 y 25°C (59°F et 77°F). Dejar descansar durante 15 a 30 minutos, remover suavemente y sembrar la crema obtenida en la cuba de fermentación.

The obvious choice for beverage fermentation   

Fermentis Division of S.I. Lesaffre - BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri - 59703 Marco-en-Baroeul. Cedex - FRANCE - Tel. +33 (0)3 20 81 62 75 - Fax. +33 (0)3 20 81 62 70 - www.fermentis.com



ANÁLISIS TÍPICOS:

% peso seco:	94.0 – 96.5
Células viables al envasado:	$> 6 \times 10^9$ /g
Bacterias totales*	< 5 / ml
Bacterias ácido acéticas*:	< 1 / ml
Lactobacilos*:	< 1 / ml
Pediococcus*:	< 1 / ml
Levaduras salvajes no Saccharomyces*:	< 1 / ml
Microorganismos patógenos: en acuerdo a la regulación vigente:	

*Cuando la levadura seca es inoculada a una tasa de 100 g/hl o $> 6 \times 10^6$ células viables / ml

ALMACENAMIENTO

Durante el transporte: el producto puede ser transportado y almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses, sin que sea afectada su performance.

A destino: Conservar en lugar fresco (< 10 °C / 50 °F) y ambiente seco.

VIDA ÚTIL

36 meses luego de la fecha de producción. Ver la fecha máxima recomendada para su impresa en el sachet.

Los sachet abiertos deben ser sellados y almacenados a 4°C (39°F) y utilizados dentro de los 7 días posteriores a su apertura. No utilizar los sachet blandos o dañados.

Se informa que cualquier cambio en el proceso fermentativo puede alterar la calidad final del producto. Por lo tanto, se sugiere realizar ensayos de fermentación antes de utilizar comercialmente nuestra levadura.

TECHNICAL DATA SHEET - Saflager™ S-23 - Rev : MAY2018



DIACETYL

Determine diacetyl content of beer by one of the following methods.

The Gas Chromatographic Method (Method E) is specific for diacetyl; it measures diacetyl and 2,3-pentanedione separately. Other methods determine vicinal diketones (VDKs). All methods are affected by sample treatment before and during analysis; VDK precursors will convert to free compounds, partially or completely, depending on the pH, extent of exposure to air, and temperature.

The Macro Dimethyl Glyoxime (Method A) and the UV Spectrophotometer (Method D) methods are available from the archives.

A. MACRO DIMETHYL GLYOXIME METHOD

This section has been archived.

B. BROAD SPECTRUM METHOD FOR VDK

Reagents

- α-Naphthol solution.* Dissolve 4 g *α*-naphthol (C₁₀H₇OH) in 100 mL isopropanol, 99.6%. Add ca. 0.5 g vegetable carbon and shake mixture for about 0.5 hr, then filter. Store filtrate in the dark in an amber bottle.
- KOH-creatinine solution.* Dissolve 0.3 g creatine in 80 mL 40% KOH solution (aqueous) and filter. Store in a polyethylene container under refrigeration.
- Diacetyl, stock solution.* Prepare an aqueous solution containing 500 mg/L. Store stock solution in an amber bottle in refrigerator (see **C. Micro Dimethyl Glyoxime Method** [reagent h] for source of diacetyl).
- Diacetyl, working solution.* Prepare immediately before use by diluting 1 mL of stock solution to 100 mL with water; concentration: 5.0 mg/L diacetyl.

Apparatus

- Colorimeter or spectrophotometer* (see **APPENDIX-I,A** for calibration of spectrophotometer).
- Distillation equipment, preferably all glass.*
 - Boiling flask, two-neck, 500-mL.
 - Distilling tube, mounted vertically on (i).
 - Condenser, water-cooled, connected (by a 75° adapter if necessary) to (ii) so that it slopes downward.
 - Curved tapered tube adapter, connected to (iii), delivery tip to dip below liquid level in (v).
 - Receiver, such as 50-mL beaker, marked at 15- and 33-mL levels.
- Volumetric flasks, 10-mL.*

(d) *Graduated cylinders, 50-mL.*

(e) *Heating mantle for boiling flask* (b, i above).

Calibration

Prepare a standard curve from 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, and 4.0 mL of working diacetyl solution in 10-mL volumetric flasks. Add water to bring volume in each to approximately 5 mL. Use 5 mL water for a reagent blank. Develop color as in (b) below.

Method

1. Distill 100 mL decarbonated beer into 50-mL graduated cylinder containing 5 mL water. Collect ca. 15 mL distillate and make to 25 mL with water. Pipet a 5-mL aliquot into a 10-mL volumetric flask.

2. Color development. Add 1 mL *α*-naphthol solution (reagent a) to each flask and swirl. Add 0.5 mL KOH-creatinine solution (reagent b) to not more than 4-5 flasks at a time. Make to mark and shake vigorously for exactly 1 min. Let stand, and measure absorbance at 530 nm against the reagent blank between 5 and 6 min after shaking. Repeat this procedure until all samples have been measured.

3. Plot absorbance values for standards against mg/L diacetyl. Read unknowns from the graph and calculate diacetyl content of beer.

1964

C. MICRO DIMETHYL GLYOXIME METHOD

Reagents

- Dipotassium hydrogen phosphate.* Prepare a solution containing 33 g K₂HPO₄ in 100 mL water. It is most conveniently kept in a plastic wash bottle.
- Hydroxylamine hydrochloride.* Dissolve 11 g NH₂OH·HCl in water and make to 250 mL.
- Sodium acetate.* Dissolve 35 g NaC₂H₃O₂ in water. Make to 100 mL total volume.
- Buffered hydroxylamine acetate.* Prepare by mixing two volumes K₂HPO₄ + four volumes NH₂OH·HCl + one volume NaC₂H₃O₂ (reagents a, b, and c).
- Acetone-dipotassium hydrogen phosphate.* Dissolve 29 g anhydrous K₂HPO₄ (or 38 g K₂HPO₄·3H₂O) in water; add 40 mL pure acetone and make to 200 mL with water. Store in refrigerator.
- Tartrate ammonium hydroxide.* Prepare a saturated solution of potassium sodium tartrate (Rochelle salt), ca. 270 g/150 mL. Mix 12 volumes of this solution with three volumes concentrated NH₄OH.
- Ferrous sulfate.* Dissolve 5 g FeSO₄·7H₂O in 100 mL 1% H₂SO₄. This solution should be discarded when it turns yellow (oxidation of ferrous iron).

- (h) *Diacetyl standard.* Diacetyl of adequate purity used for the standard curve may be obtained from Polarome Manufacturing Co., Inc., 22 Ericsson Pl., New York, NY 10013; other suppliers also are listed.
- (i) *Diacetyl, stock solution.* Prepare an aqueous solution containing 500 mg/L. The stock solution should be stored in an amber bottle in the refrigerator.

Apparatus

- (a) *Colorimeter or spectrophotometer* (see APPENDIX-I,A for calibration of spectrophotometer).
- (b) *Generator trap assembly* (Fig. 1). The generator is a test tube, 250 × 25 mm, of 100-mL capacity. The trap is a glass-stoppered 10-mL footless graduated cylinder, Pyrex (Corning No. 2972). These cylinders take No. 00 rubber stoppers. The connection between the generator and the trap is a piece of bent tubing, 4 mm o.d., extending to bottom of the trap. The bends are smooth and gentle, with a slope toward the trap to minimize entrainment of condensing vapors.
- (c) *Tygon tubing* of suitable size ($1/8$ in. i.d.) is used between the trap and the generator of the next sample. Four units are connected in a train and contained in a water bath (a 2-L beaker serves well).

If more than samples are to be run, better replication can be obtained by use of a glass manifold designed for six samples such as is available from Pope Scientific

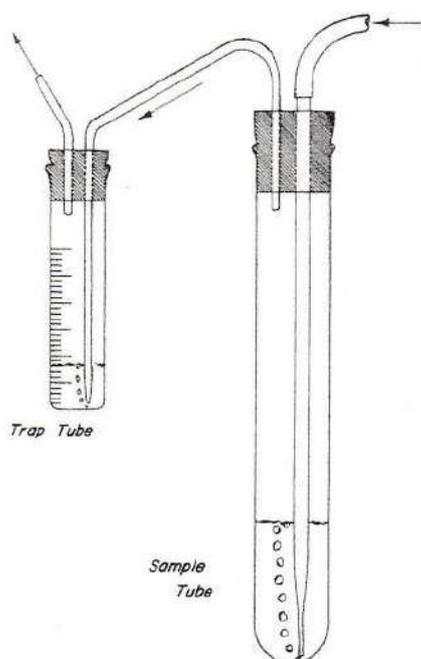


Fig. 1. Sample and trap tube assembly (from Ref. 9, p. 22).

Issued 2004

Inc., N90 W 14337 Commerce Drive, Menomonee Falls, WI 53051.

Calibration

Prepare dilutions from stock of diacetyl (reagent i) to range from 0 to 20 mg/L. Develop colors as follows:

Pipet 1.0 mL diluted diacetyl solution into 10-mL cylinder containing 1 mL buffered hydroxylamine acetate (reagent d). Immerse for 10 min in a water bath maintained at 65–75°C. While it is still warm, add 0.5 mL acetone- K_2HPO_4 (reagent e), mix, and let cool. Proceed as described under **Method**, paragraph f, below. Plot absorbance (ordinate) against concentration (abscissa).

Method

Pipet 20 mL beer (which may be decarbonated at room temperature) into generator. Sample size may be increased to 30 mL or reduced to 10 mL, depending on diacetyl level.

Add 1 mL buffered hydroxylamine (reagent d) to trap and connect to sample tube. Then attach tube carrying CO_2 gas into generator. Additional sets of tubes, up to 12, may be connected in series (not in parallel). Begin flow of gas at a rate of 100–150 mL per min (visually this rate is such that individual bubbles can be just distinguished).

The generators are immersed in a water bath maintained at 65°C ($\pm 5^\circ C$), but the traps *must* not be immersed in the bath; they should be left hanging outside, suspended by connected tubing.

Sweep for 1.5 hr (for 30-mL samples sweep for 2 hr; for 10-mL samples 1 hr is sufficient). When temperature and gas flow rate are properly adjusted, there is very little increase of volume in trap.

Disconnect traps (starting with last in train) while gas is still bubbling. Tips of trap inlets may be rinsed with a few drops of K_2HPO_4 solution (reagent a). If volume exceeds 3 mL, contents should be carefully evaporated down to about 2 mL (in water bath). This evaporation should be avoided, though, because of increased manipulation and risk of decomposition of dimethyl glyoxime by heat.

Color development

Prepare a reagent blank by placing 1 mL buffered hydroxylamine acetate (reagent d) in a 10-mL cylinder. Place all cylinders in a water bath at 70–80°C for 10 min. While the bath is still warm, add 0.5 mL acetone- K_2HPO_4 (reagent e) and mix by inverting. Allow to cool, and add 1.5 mL of tartrate- NH_4OH (reagent f) and mix again. Finally add 0.1 mL $FeSO_4$ (reagent g), mixing immediately after addition of this reagent. Adjust volume to 5.0 mL total with K_2HPO_4 solution (reagent a). Water must not be used, since it causes fading of color. A pink color will appear almost immediately after

addition of the FeSO_4 . It reaches its maximum within 2–3 min. Determine absorbance of solution in a 1-cm cell at 530 nm, or close to 530 nm, depending on apparatus available, within 15 min. Calculate concentration of diacetyl in sample from standard curve.

1964, rev. 1987

D. UV SPECTROPHOTOMETER METHOD

This section has been archived.

E. GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD

Reagents (Note 1)

- 2,3-Hexanedione*, internal standard.
Stock solution: dissolve 500 mg in water to make 100 mL (stable for 1–2 months refrigerated)
Working solution: dilute 1 mL of stock solution to a total of 100 mL with water (prepare daily).
- Diacetyl*, stock and working solutions as prepared in (a).
- 2,3-Pentanedione*, stock and working solutions as prepared in (a).
- Carbon dioxide*, gas, bone dry purity.

Apparatus

- Gas chromatograph*, equipped with an electron capture detector.
- Column*, capable of giving baseline separation of diacetyl, pentanedione, and hexanedione. Two suggested packing materials are 10% Carbowax 20 M on Chromosorb W AW-DMS and 0.2% Carbowax 1500 on Carboxpack C.
- Syringe*, 2-mL pressure lock, gas tight.
- Serum bottles*, 100-mL with aluminum-faced septa and aluminum rings. (See Note 2.)
- Magnetic stirrers*.
- Water bath*, capable of maintaining both 30 and 60°C.
- Oven*, 40°C.

Method

Calibration standard

Combine in a serum bottle 50 mL water and 50 μL of each of the three standard working solutions: hexanedione (reagent a), diacetyl (reagent b), and pentanedione (reagent c). Seal with an aluminum-lined septum and an aluminum ring. This solution contains 0.05 mg/L of each of the standards. If the expected VDK levels are higher than 0.05 mg/L, the calibration standard should be appropriately adjusted, i.e., 0.10, 0.15, 0.20 mg/L. A calibration curve may be necessary if the detector response is nonlinear.

Beer samples for "as-is" VDKs

Purge a 100-mL serum bottle with CO_2 , then add 50 mL beer and 50 μL of the internal standard working solution (reagent a) and a magnetic stirring bar. Seal by crimping on an aluminum-faced septum with an aluminum ring.

Beer samples for "total" VDKs (VDKs + precursors)

Decarbonate 100 mL of beer by gently swirling in a 400-mL beaker. Aerate by pouring five times between two beakers. Transfer 50 mL of the beer to a 100-mL serum bottle containing a magnetic stirring bar. Add 50 μL of internal standard working solution (reagent a). Seal by crimping on an aluminum-faced septum with an aluminum ring. Incubate in a water bath at 60°C for 90 min (without stirring). Equilibrate all beer samples with magnetic stirring in a water bath at 30°C for 20–30 min. Sample 1 mL of headspace from the serum bottle, of either the beer sample or the calibration standard, with a gas syringe "rinsed" by pumping five times with the needle in the headspace. Inject into gas chromatograph and run with the following or other appropriate conditions:

- Injector temperature: 90°C
- Detector temperature: 150°C
- Column temperature: 70°C
- Carrier gas: oxygen-free nitrogen at 25 mL/min

The calibration standard should be run in triplicate. Store the dismantled syringe in a 40°C oven between injections. Record the chromatogram and measure either the peak height or the peak area of the diacetyl, 2,3-pentanedione, and 2,3-hexanedione (see Note 3). A sample chromatogram is shown in Fig. 2.

Calculations

Determine the response ratios from the calibration mixture as follows:

$$F_{\text{diacetyl}} = \frac{\text{peak height int. std.}}{\text{peak height diacetyl}}$$

$$F_{\text{pentanedione}} = \frac{\text{peak height int. std.}}{\text{peak height pentanedione}}$$

Calculate the average response ratios from the three replicates as follows:

$$F_{\text{Adiacetyl}} = \frac{F_{1\text{da}} + F_{2\text{da}} + F_{3\text{da}}}{3}$$

$$F_{\text{Apentanedione}} = \frac{F_{1\text{pen}} + F_{2\text{pen}} + F_{3\text{pen}}}{3}$$

Determine the concentration of VDKs in beer samples as follows:

$$\text{mg/L Diacetyl} = F_{\text{Adiacetyl}} \times S_1 \times \frac{\text{peak height diacetyl}}{\text{peak height int. std.}}$$

$$\text{mg/L Pentanedione} = F_{\text{Apentanedione}} \times S_1 \times \frac{\text{pk. ht. peritanedione}}{\text{peak height int. std.}}$$

Issued 2004

where S_i = concentration of internal standard, typically 0.05 mg/L.

Example

Concentration of internal standard = 0.05 mg/L.

Average peak height of hexanedione standard = 8.25 mm.

Average peak height of diacetyl standard = 5.33 mm.

Average peak height of pentanedione standard = 9.14 mm.

Peak height of hexanedione from beer = 7.27 mm.

Peak height of diacetyl from beer = 2.63 mm.

Peak height of pentanedione from beer = 2.83 mm.

$$\text{Diacetyl ratio} = \frac{8.25}{5.33} = 1.55$$

$$\text{Pentanedione ratio} = \frac{8.25}{9.14} = 0.90$$

$$\text{mg/L Diacetyl} = 1.55 \times 0.05 \times \frac{2.63}{7.27} = 0.028$$

$$\text{mg/L Pentanedione} = 0.90 \times 0.05 \times \frac{2.83}{7.27} = 0.018$$

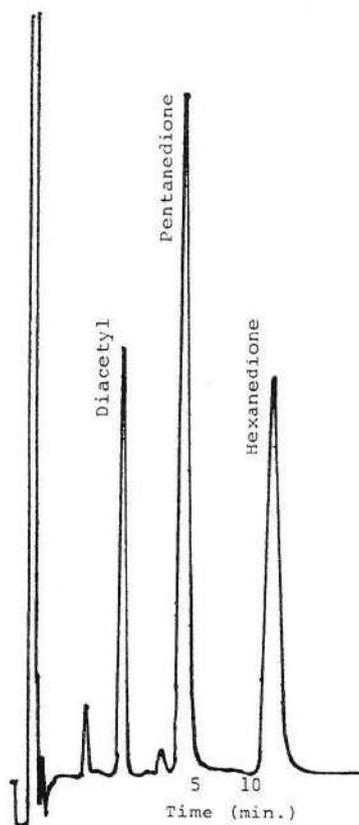


Fig. 2. Sample of a vicinal diketone chromatogram.

In a collaborative study (Ref. 2) using beers with low levels of VDKs, the coefficients of variation (CV), based on combined-laboratory error (S_c), were 33, 32, and 30% for diacetyl, pentanedione, and the combined VDKs, respectively.

Notes

1. For each standard, use the center cut of the distillate. Each standard should be verified by the EBC spectrophotometric method (7.11.1) (Ref. 6). Five mL of each stock solution is diluted to 100 mL with water. A 100- μ L volume is combined with 9.9 mL of water and 0.5 mL of 1% *o*-phenylenediamine in 4N HCl. Let solutions stand in the dark for 20–30 min. Add 2 mL of 4N HCl before obtaining the absorbance at 335 nm vs. a water blank. The following absorbances should be obtained:

Diacetyl: 0.230

2,3-Pentanedione: 0.198

2,3-Hexanedione: 0.174.

2. Aluminum-faced septa can be purchased from Perkin-Elmer, No. 0105-0147. Other septa may cause late eluting peaks.

3. Chlorohydrocarbons may co-elute with the VDKs and cause erroneously high values.

References

1. American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on Determination of Diacetyl in Beer. *Proc.* 1962, p. 183; *Proc.* 1963, p. 205; *Proc.* 1964, p. 269.
2. American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on Vicinal Diketones and Precursors. *Journal* 43:168, 1985.
3. American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on Revised Methods of Diacetyl Analysis. *Journal* 49:172, 1991.
4. American Society of Brewing Chemists. Report of Subcommittee on Revised Methods of Diacetyl Analysis. *Journal* 50:151, 1992.
5. Canales, A. M., and Martinez, M. *Am. Brew.* 1962 (Dec), p. 10.
6. European Brewery Convention. Supplement Method 7.11.1. *Analytica-EBC*, 3rd ed. Schweizer Brauerei-Rundschau: Zurich, Switzerland, 1975.
7. European Brewery Convention. Supplement Method 7.11.2. *Analytica-EBC*, 3rd ed. Schweizer Brauerei-Rundschau: Zurich, Switzerland, 1975.
8. Kato, S., and Nishikawa, N. *Bull. Brew. Sci. (Tokyo)* 6:12, 1960/61.
9. Owades, J. L., and Jakovac, J. A. *Am. Soc. Brew. Chem., Proc.* 1963, p. 22.
10. Owades, J. L., Jakovac, J. A., and Vigilante, C. *Am. Soc. Brew. Chem., Proc.* 1960, p. 63.
11. Prill, E. A., and Hammer, B. W. *Iowa State College J. Sci.* 12:385, 1938.
12. West, D. B., Lautentach, A. L., and Becker, K. *Am. Soc. Brew. Chem., Proc.* 1952, p. 81.

1985



**Certified Reference
Materials
for
UV, Visible, NIR and IR
Molecular Spectroscopy**

RM-HG

Set Serial No: 35334

Customer Details:

RELES s.r.l
Jr. Pomabamba
774 Brena
Lima 05
Peru

The customer information stated on this page number 1, applies to all certificates.

UKAS accreditation applies to all
Wavelength,
Transmission/Absorbance, Stray
Light references, and those used for
Resolution measurements.





Calibration Lab.
Starna Scientific Ltd
 52/54 Fowler Rd
 HAINAULT
 Essex IG6 3UT
 England
 Tel: +44 (0) 20 8501 5550

Email: sales@starna.com

Reference Material Certificate of Calibration and Traceability

Holmium glass filter for use as a wavelength accuracy reference in the UV and visible spectrum

Certificate Number: **94141**
 Certificate Date: **4 August 2021**
 Expiration Date: **4 August 2023**
 Analysis Number: **HG03120801**
 Set Serial Number: **35334**
 Cell Serial Number: **103456**



0659
 Page Number 2 of 3

Description of Reference Material:

This reference material consists of an optical glass filter containing holmium oxide which has distinct absorption bands. The reference material is designed for the verification and calibration of the wavelength scales of visible and ultraviolet spectrophotometers having nominal spectral bandwidths of 5 nm or less.

At higher spectral bandwidths (> 4.0 nm) peaks identified with '00' will not be listed as they cannot be resolved by the instrument.

All procedures are implemented in accordance with ISO/IEC 17025 and ISO 17034. Additional information can be found on the Starna web site at www.starna.com

Certified Values of Reference Material:

The holmium glass filter is measured in the absorbance mode against an air blank, over the wavelength range of 640 to 240 nm. For each spectral bandwidth, a baseline correction is performed with an empty cell holder.

The 11 peak maxima are identified and certified to be within the expected wavelength range tolerance for each spectral bandwidth (SBW).

The combined analytical and instrument uncertainties at the 95% confidence level is 0.11 nm.

The reported expanded uncertainty is based on a standard uncertainty multiplied by a coverage factor k=2, providing a coverage probability of approximately 95%. The uncertainty evaluation has been carried out in accordance with UKAS requirements

SBW	Wavelengths in nanometers of peak maxima as referenced to air, +/- 0.11 nm										
0.10	637.98	536.42	460.01	453.70	445.78	418.49	360.90	333.95	287.60	279.43	241.65
0.25	638.00	536.45	460.02	453.68	445.78	418.51	360.91	333.96	287.61	279.43	241.66
0.50	638.05	536.44	460.02	453.70	445.78	418.51	360.89	333.98	287.64	279.44	241.67
1.00	638.00	536.52	459.99	453.67	445.82	418.53	360.89	334.02	287.71	279.44	241.70
1.50	637.98	536.59	460.02	453.66	445.94	418.59	360.93	334.06	287.81	279.45	241.72
2.00	637.98	536.66	460.05	453.63	446.10	418.61	361.00	334.10	287.98	279.44	241.74
3.00	637.95	536.76	460.15	453.57	446.39	418.59	361.11	334.16	288.41	279.43	241.66
4.00	637.94	536.90	460.06	453.20	446.70	418.48	361.26	334.22	288.70	279.40	241.54
5.00	638.00	537.00	459.30	.00	447.20	418.40	361.40	334.50	288.90	279.30	241.00

This certification is issued in accordance with the laboratory accreditation requirements of the United Kingdom Accreditation Service. It provides traceability of measurement to recognised national standards, and to units of measurement realised at the National Physical Laboratory or other recognised standards laboratories.

Stama Cell Serial Number: **103456**
Certificate Number: **94141**
Certificate Date: **4 August 2021**
Verification Date: **4 August 2021**

Page Number 3 of 3

UKAS Accredited Calibration Laboratory No. 0659

Certifying Instrument Qualification:

All calibration is performed on one of a series of high performance reference spectrophotometers. The instruments are tested and qualified to the manufacturer's published specification over the analytical range used for the reference material certification.

The following primary references and fundamental procedures are used in the qualification of the reference spectrophotometers:

Absorbance: NIST SRM 2031, 1930 & 930e, Double aperture method
Wavelength: NIST SRM 2034, Emission lines of Hg & deuterium
Stray Light: NIST SRM 2032, ECL XI & lithium carbonate
Resolution: Benzene vapor, half width of D2 656.1 nm line

Calibration Method:

The conditions of analysis used to generate the certified values on this certificate are as listed in the chart below:

Filter Material: Holmium oxide glass
Reference: Air
Scale: Absorbance
Range: 640 to 240 nm
Band width: Multiple
Temperature: 23.5° C +/- 1.0 °C

Instructions for Use:

Remove the sliding window covers from both sides of each filter to be used. Place the filter in the sample compartment as you would for any sample. Leave the reference cell holder empty as all measurements are to be made against air. Measurements should be made within the temperature range of 20° to 30° C. In the absorbance mode scan the filter over the required range. Find the absorbance maxima and compare them to the certified wavelengths on this certificate as indicated for the spectral bandwidth (SBW) used by your instrument. If you find any significant differences, it is recommended that a service technician inspect your instrument to determine the source of the discrepancy.

Instrument Dependencies:

The instrument to be tested should have a SBW not exceeding 5 nm. Consult the instrument owners handbook for this information.

Duration of Certificate:

This certificate is valid for a maximum period of two years from the date of issue or sooner if specified by the user's own protocols. Although the references are covered by a lifetime guarantee this is subject to certain conditions, see guidance notes.

Re-certification Procedure:

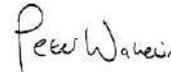
All reference materials are certified and supplied in a useable condition. There is no warranty for fitness beyond receipt by the customer. When references need to be re-certified or inspected for any reason, customers should return them to the Stama ISO/IEC 17025 & ISO 17034 accredited calibration laboratory, where all original data is collated.

On receipt by Stama Scientific the references are measured "As received", before cleaning under the re-certification procedure. "As received" data is available on request.

Storage and Care:

References should always be stored in the box provided and handled with extreme care. Filters are fragile and should be inserted and removed from the instrument taking care not to twist or apply leverage against the cell holder, as this may crack the filter. Damage in the form of scratches or contamination may alter the certified values significantly such that they need re-certifying or even complete replacement. For cleaning see guidance notes.

Calibration performed by:



Calibration Technician - P. Wakelin

Approved Signatory:



Calibration Manager - A. Wakelin CSci CChem MRSC

All rights reserved. This certificate may not be reproduced other than in full, except with the prior written approval of the issuing laboratory. This certification must not be used by a third party to claim product endorsement by the accreditation body or any agency of the U.S. or U.K. governments.

This certification is issued in accordance with the laboratory accreditation requirements of the United Kingdom Accreditation Service. It provides traceability of measurement to recognised national standards, and to units of measurement realised at the National Physical Laboratory or other recognised standards laboratories.

Anexo 8. Rango de aceptación de absorbancias

VERIFICACION DE ABSORBANCIAS

RANGO DE ACEPTACIÓN DE ABSORBANCIAS

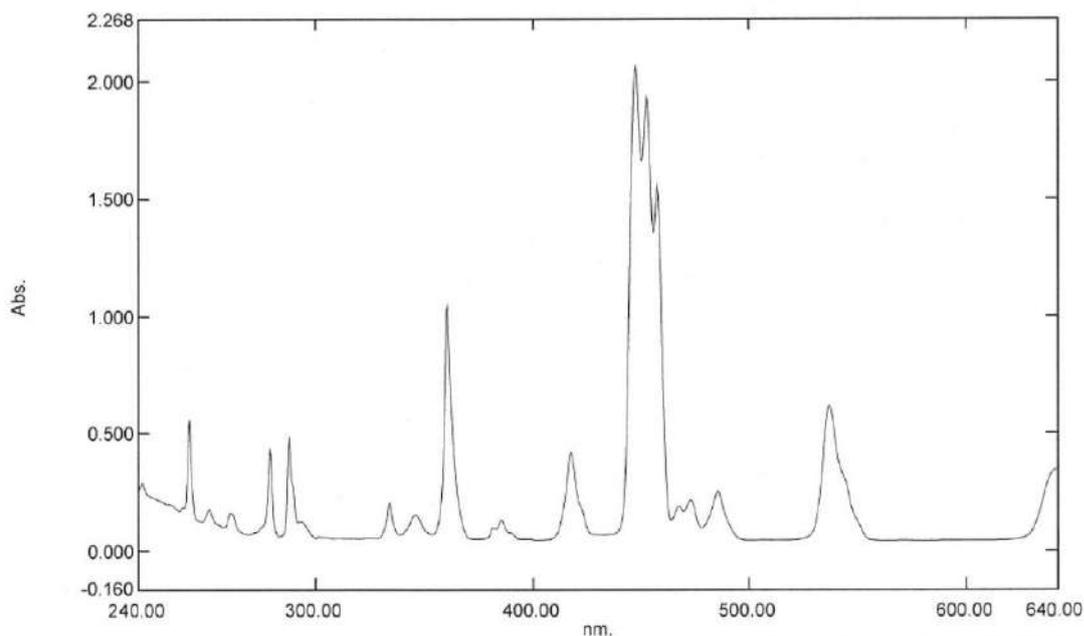
Ancho de Banda:	1 nm
Holmium Glass Filter:	RM HG - Set Serial: 35334
Tolerancia del Filtro:	±0.11 nm
Tolerancia del Equipo:	±0.50 nm
Tolerancia Final:	±0.61 nm (Tolerancia de Filtro + Tolerancia del Equipo)
Fecha del Certificado:	04 Agosto 2021
Fecha de Expiración:	04 Agosto 2023

Tolerancia	Longitudes de Onda características de Filtro RM-HG Rango de medida (240nm a 640nm) (SBW) de 1nm										
	638.00	536.52	459.99	453.67	445.82	418.53	360.89	334.02	287.71	279.44	241.70
Mínimo	637.39	535.91	459.38	453.06	445.21	417.92	360.28	333.41	287.10	278.83	241.09
Máximo	638.61	537.13	460.60	454.28	446.43	419.14	361.50	334.63	288.32	280.05	242.31

Spectrum Peak Pick Report

08/08/2022 08:47:34 a.m.

RM HG - RawData



[Measurement Properties]
 Wavelength Range (nm.): 240.00 to 640.00
 Scan Speed: Medium
 Sampling Interval: 0.5
 Auto Sampling Interval: Disabled
 Scan Mode: Auto

[Instrument Properties]
 Instrument Type: UV-Vis
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 1.0
 Accumulation time: 0.1 sec.
 Light Source Change Wavelength: 323.0 nm
 Detector Unit: Direct
 S/R Exchange: Normal
 Stair Correction: OFF

[Attachment Properties]
 Attachment: None

[Operation]
 Threshold: 0.0010000
 Points: 11
 InterPolate: Enabled
 Interval: 0.010000
 Average: Disabled

[Sample Preparation Properties]
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	Ⓢ	638.36	0.344	
2	Ⓢ	536.94	0.617	
3	Ⓢ	485.46	0.253	
4	Ⓢ	472.67	0.214	
5	Ⓢ	467.32	0.189	
6	Ⓢ	459.50	1.558	
7	Ⓢ	453.59	1.937	
8	Ⓢ	446.38	2.068	
9	Ⓢ	417.95	0.420	
10	Ⓢ	399.32	0.050	
11	Ⓢ	385.50	0.131	
12	Ⓢ	381.66	0.098	
13	Ⓢ	360.31	1.068	
14	Ⓢ	345.62	0.152	
15	Ⓢ	333.81	0.205	
16	Ⓢ	304.86	0.056	
17	Ⓢ	300.65	0.061	
18	Ⓢ	292.86	0.125	
19	Ⓢ	287.42	0.490	
20	Ⓢ	278.87	0.438	
21	Ⓢ	260.52	0.161	
22	Ⓢ	250.55	0.177	
23	Ⓢ	241.33	0.573	
24	Ⓢ	238.37	0.185	