

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



CURSO 2014-2015

**“EFECTO DE LA MACERACIÓN ESCALONADA Y DE LA
TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN EN LAS
PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA CERVEZA”**

Autor: Vicente Agulló García

Tutores: Daniel Valero Garrido y Juan Miguel Valverde Veracruz

RESUMEN

En este trabajo de investigación se ha estudiado el efecto de dos tipos de maceración (simple y escalonada), dos tipos de levadura (líquida y liofilizada) y dos temperaturas de fermentación (12 y 25°C) en el procesado de la cerveza tipo “Ale” y su repercusión sobre la calidad final de la cerveza. Para ello, se han realizado 8 tipos diferentes de cerveza y se han analizado parámetros de calidad (pH, acidez, densidad, grado alcohólico, color (Cie-Lab y °EBC), amargor (°EBU), contenido de proteínas, concentración de diferentes ácidos orgánicos y azúcares, y aromas). Por otro lado, para evaluar las propiedades funcionales se determinaron los polifenoles totales e individuales por HPLC y la actividad antioxidante en dos fases, la hidrosoluble y la liposoluble.

ABSTRACT

In this research work the effect of two different mashing procedures (normal and gradient), two types of yeasts (liquid and lyophilized) and two fermenting temperatures (12 and 25°C) was studied during the brewing processing of Ale beer, and their impact on the final beer quality attributes. In this sense, 8 different beer types were made and the following parameters were analyzed: pH, acidity, protein content, organic acid and sugars concentration and aroma compounds. In addition, to evaluate the functional properties, the content of both total and individual phenolics by HPLC as well as the total antioxidant activity from both hydrophilic and lipophilic fractions were determined.

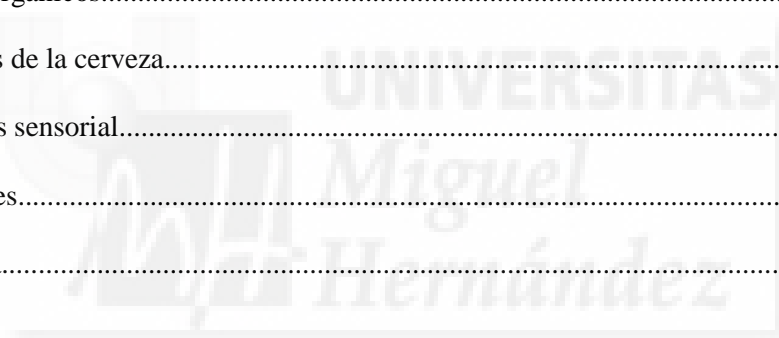
PALABRAS CLAVE: cerveza Ale, *Saccharomyces cerevisiae*, macerado, calidad, fermentación, polifenoles

KEY WORDS: Ale beer, *Saccharomyces cerevisiae*, mashing, quality, fermentation, polyphenols

Contenido

1. Introducción.....	1
1.1. Historia de la Cerveza.....	1
1.2. Importancia económica de la industria cervecera en la actualidad.....	1
1.3. Definición de la cerveza.....	2
1.4. Tipos de cerveza.....	3
1.5. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la cerveza	4
1.6. Propiedades funcionales de la cerveza.....	5
2. Objetivos.....	7
3. Materiales y métodos.....	8
3.1. Materiales.....	8
3.2. Métodos.....	8
3.3. Cervezas elaboradas.....	10
3.4. Determinaciones analíticas.....	11
3.4.1. Contenido de proteínas.....	11
3.4.2. Recuento de levaduras.....	11
3.4.3. Densidad.....	12
3.4.4. pH.....	12
3.4.5. Grado alcohólico.....	12
3.4.6. Color: °EBC.....	12
3.4.7. Amargor: °EBU.....	13
3.4.8. Acidez.....	13
3.4.9. Polifenoles totales.....	14
3.4.10. Ácidos y Azúcares por HPLC.....	14
3.4.11. Capacidad Antioxidante Total.....	14
3.4.12. Perfil aromático por GC-MS.....	15
3.4.13. Análisis sensorial.....	16

3.4.14. Análisis estadístico.....	17
4. Resultados y discusión.....	18
4.1. Contenido de proteínas.....	18
4.2. Recuento de levaduras.....	19
4.3. Densidad.....	20
4.4. pH y acidez titulable.....	20
4.5. Grado alcohólico.....	21
4.6. Color y Polifenoles.....	22
4.7. Amargor.....	25
4.8. Actividad antioxidante.....	27
4.9. Ácidos orgánicos.....	28
4.10. Aromas de la cerveza.....	29
4.11. Análisis sensorial.....	31
5. Conclusiones.....	32
6. Bibliografía.....	33





1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de la Cerveza

El surgimiento de la cerveza no se conoce completamente, sin embargo, los restos de cerveza más antiguos datan alrededor del año 9000 AC, 3000 años antes de los primeros restos que evidencian la fabricación de pan, dos alimentos responsables de que el ser humano pasase a ser sedentario, al dominar los cultivos de cebada y trigo respectivamente para su fabricación, creando así las primeras civilizaciones. Las primeras evidencias escritas sobre la elaboración de cerveza fueron encontradas en Mesopotamia, donde varios registros sumerios la mencionan, donde destaca el Código de Hammurabi, donde se recogen normas sobre la fabricación de la cerveza, el precio del producto, la concentración adecuada y las sanciones a quienes adulteraran la bebida. También cabe destacar el Papiro de Zosimo, en el que se encuentra la receta de cerveza más antigua conocida.

El conocimiento de la elaboración de cerveza pasó de los egipcios a los griegos y luego de éstos a los romanos, británicos, anglos y sajones. En España la cerveza en esta época no llegó a las cotas de los pueblos nórdicos, ya que es un país que respalda una gran tradición vinícola, aunque hay datos arqueológicos que avalan su consumo en las tribus locales, sobre todo en el norte de España. Los restos arqueológicos más antiguos de producción de cerveza en Europa fueron descubiertos en el yacimiento del valle de Ambrona (Soria, España) y datan de alrededor de 2400 A.C., según el trabajo arqueológico del equipo dirigido por Miguel Ángel Rojo Guerra. En el siglo XVIII, la Revolución Industrial estaba transformando el mundo y la cerveza no fue una excepción. La introducción del termómetro, del densímetro y la refrigeración generaron grandes avances en su producción, que terminaron por definir la forma de hacer cerveza industrialmente y de darle un aspecto similar al que posee en la actualidad, además de permitir su elaboración en cualquier época del año, abaratando el producto y popularizándolo todavía más. La culminación del proceso de fabricación de cerveza llegó tras el conocimiento de los mecanismos de desarrollo microbiano y de la fermentación, propiciados por Pasteur, que permitieron un mayor control sobre el proceso de fermentación y conservación de la cerveza. A partir de 1950, la industria cervecera entró en un periodo de intensa competencia, reduciendo todavía más el número de cervecerías y deteriorando aún más la calidad de la cerveza. Un siglo antes comenzó lo que se puede considerar como la producción industrial de cerveza en España.

Actualmente, el mundo está presenciando una revolución gracias al Renacimiento de la Cerveza Artesanal, que comenzó en la década de 1970 en Estados Unidos y se ha ido extendiendo con el tiempo por el resto del mundo. Por todos los países están surgiendo cada vez más cervecerías independientes que tratan de procurar la calidad de este producto y siguen métodos tradicionales de elaboración además de usar materias primas.

1.2. Importancia económica de la industria cervecera en la actualidad

En éste apartado se muestra la importancia del sector cervecero, respaldado por los datos obtenidos a partir del Convenio entre el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, la Asociación de Cerveceros de España y la de Malteros de España.

El sector cervecero español es un referente dentro del panorama agroalimentario nacional por su contribución a la economía, gracias fundamentalmente al vínculo del consumo de cerveza con la hostelería y el turismo. De hecho, la cerveza es la bebida con contenido alcohólico con mayor impacto económico a través de los empleos que genera directa e indirectamente y los ingresos recaudados por el Estado mediante los impuestos que gravan su consumo. El valor de la cerveza en el mercado supera los 14600 millones de euros, que representan un 1,4% del PIB.

La cerveza contribuye a la creación de más de 257000 puestos de trabajo, de los cuales 224300 se encuentran en el sector hostelero y 20900 en los sectores abastecedores (el 22% en la agricultura). Además, 6000 empleos se crean directamente en las propias compañías cerveceras.

Mediante los impuestos que gravan el consumo de cerveza, las arcas del Estado ingresan cerca de 3400 millones de euros, un 44% por encima de la recaudación de las bebidas destiladas. Más de 2600 millones del total de ingresos proceden del consumo en bares y restaurantes, en su mayor parte gracias a las cotizaciones a la Seguridad Social e IRPF (58%) derivadas del empleo que crea el sector hostelero y el IVA en hostelería (36%).

La aportación de la cerveza vía impuestos está determinada por la fiscalidad que soporta la cerveza que, tras la última reforma del IVA, ya alcanza el 21% (incluso en su variedad sin alcohol), frente a la tasa reducida del 10% de otras bebidas.

Además de empleos y recaudación, la cerveza aporta 7000 millones de euros a la economía en concepto de valor añadido a través de su cadena de valor. Si bien esta cifra representa un 0,8% menos respecto a 2008, el valor añadido generado por las propias compañías cerveceras, el sector minorista y los proveedores sí aumentó, debido a las innovaciones adoptadas por las compañías para conseguir una mayor productividad.

La facturación del sector, por su parte, se suavizó en 2012 (último dato disponible) con respecto al año anterior: un 6% menos frente al descenso próximo al 7% en 2011.

1.3. Definición de la cerveza

La cerveza es una bebida natural obtenida por fermentación alcohólica de un extracto acuoso de cebada malteada. Las materias primas necesarias para la fabricación de cerveza son sólo cuatro: malta de cebada, agua, levadura y lúpulo (Código Alimentario Español), aunque la mayoría de las cervezas comerciales utilizan, además, otra fuente de hidratos de carbono (habitualmente un cereal no malteado), un antioxidante, un estabilizante de espuma, y un colorante, que permite intensificar y uniformizar el color del producto final. El proceso de fabricación de la cerveza se basa esencialmente en el malteado controlado del grano de cebada para permitir la posterior extracción acuosa de un mosto azucarado; este mosto, al que se le adiciona el lúpulo, se somete a un proceso de fermentación alcohólica con la levadura cervecera (Hough, 2001), y finalmente se acondiciona para su envasado y expedición (Ferrán-Lamich, 2002).

1.4. Tipos de cerveza

A la hora de elaborar una cerveza existen numerosas variables a tener en cuenta, lo que hace que sea un producto de difícil clasificación. De este modo, una cerveza se puede clasificar según los siguientes criterios: fermentación, ingredientes, aspecto, procedimientos de elaboración, procedencia o denominación de origen y otros aspectos menos importantes.

En este trabajo, al realizar cervezas Ale, nos centraremos en el tipo de fermentación para tipificar las diferentes cervezas. Esta clasificación es la más sencilla, ya que encontramos solo dos grandes grupos: Lager, de baja fermentación, y Ale, de alta fermentación, en las que se incluyen también las de fermentación espontánea.

Dicho esto, en primer lugar encontramos las cervezas tipo Ale, palabra inglesa que describe al grupo de cervezas que utilizan levaduras de fermentación alta y no tiene nada que ver con el color, estilo o cuerpo. Estos otros parámetros pueden presentar variaciones y seguir formando parte de una cerveza tipo Ale, y dependen entre otras cosas, de la cantidad y tipo de malta que se utilice, del lúpulo y de la maduración que experimente. La levadura que se usa para este tipo de fermentación son cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La mayoría de estas levaduras se conocen como “altas” pues durante el proceso de fermentación suben a la superficie junto con la espuma que se crea. También tienen la tendencia de producir más ésteres lo cual produce más aromas y sabores complejos en la cerveza. En lo referente al rango de temperaturas, va desde los 15°C hasta los 25°C, temperatura a la que la levadura está viva y puede llevar a cabo el proceso de fermentación, que dura no más de unas semanas, siendo un proceso corto.

Por otro lado tenemos las cervezas tipo Lager, cervezas de baja fermentación. Estas tienen que dejarse fermentar entre los 6°C y 13°C, y se denominan levaduras bajas, por quedarse en la parte de debajo de los botes durante el proceso. El tiempo de fermentación normalmente va de semanas a meses, por la temperatura más fría. Las levaduras bajas también producen menos sub-productos de la fermentación que son los que dan sabor. Por esto se considera que los aromas y sabores de los lagers son más limpios y frescos que las Ales.

DIFERENCIAS SENSORIALES	
Ale	Lager
Sabor más robusto	Sabor más ligero
Afrutadas y aromáticas	Carbonatadas o crujientes
Sabor y aroma complejos	Sabor y aroma más sutil, equilibrado y limpio
Se sirve entre 7 y 12 °C	Se sirve entre 3 y 7 °C
Más amargas	Más suaves

1.5. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la cerveza

En este apartado se explicará el proceso general de elaboración de cerveza, aunque siempre puede haber modificaciones teniendo en cuenta las características que cada productor quiera darle a su cerveza.

De este modo tenemos:

1. Malteado → Corresponde a las primeras etapas de la germinación y su objetivo es la germinación controlada del grano de cebada mediante la cual se producen enzimas (amilasas, β -glucanasas y proteasas) que sirven para hidrolizar materiales de reserva del grano. Para ello, la cebada se empapa en agua durante 2 días a 10-16°C, aumentando su contenido en agua hasta un 45%. Posteriormente la cebada germina parcialmente durante 3-5 días bajo condiciones controladas de temperatura y aireación.

2. Secado-Horneado → Este proceso suele durar dos días y conlleva la disminución de la humedad hasta un 1-5%. Tiene como objetivo detener las transformaciones bioquímicas para que el grano sea estable para almacenarse.

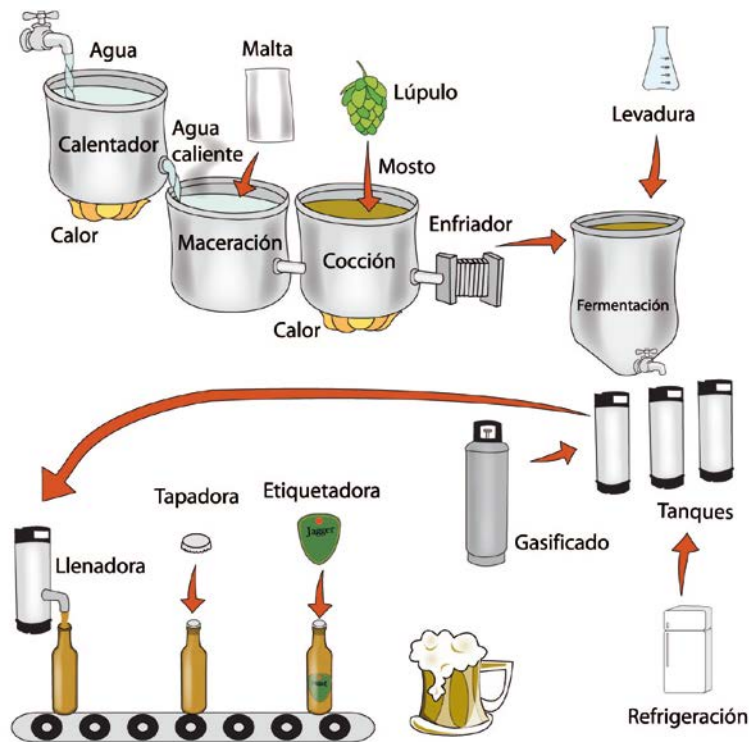
3. Maceración → Ahora, la cebada malteada se tritura y se mezcla con agua a temperatura controlada para lograr la hidrólisis de almidón por las amilasas y también de las proteínas por proteasas activadas durante la germinación. De este modo se prepara un extracto con azúcares fermentables, aminoácidos, vitaminas etc., a partir de la cebada malteada, dando lugar a lo que se conoce como mosto.

En nuestro caso incidimos en este apartado ya que utilizaremos dos tipos diferentes de maceración. Por un lado, la maceración simple que consiste en mezclar la totalidad de la malta o las maltas molidas con agua caliente, para lograr una temperatura del macerado de 65,5°C-70°C, dependiendo la temperatura en todo momento del estilo de cerveza que se vaya a fabricar. Por el otro lado, la maceración escalonada consiste en emplear diferentes rangos de temperatura para que el proceso enzimático sea completo y sacar el máximo rendimiento a nuestra malta, ya que hay muchos tipos de encimas y cada una trabaja a una temperatura.

4. Ebullición con lúpulo → El mosto limpio, separado del grano, se hierva junto con el lúpulo, que le dará el amargor y aroma típico de la cerveza.

5. Fermentación → Una vez clarificado y enfriado el mosto, se añade la levadura para que comience el proceso de la fermentación, que consiste en la transformación de los azúcares del mosto en alcohol y anhídrido carbónico.

6. Acabado → Tras la maduración, la cerveza se puede filtrar para eliminar los residuos sólidos, además de gasificarse con CO₂ una vez almacenada en tanques. Posteriormente se procederá al embotellado.



<http://cerveceriajagger.com.ar/wordpress/wp-content/uploads/2011/03/proceso.jpg>

1.6. Propiedades funcionales de la cerveza

La cerveza es una bebida fermentada tradicional que está presente en la dieta desde hace miles de años. Es una bebida de baja graduación alcohólica y se produce industrialmente a partir de ingredientes que apenas han cambiado en el transcurso de los siglos: agua, malta y lúpulo. Su posible relación con la salud no ha sido estudiada hasta tiempos muy recientes y sus efectos se achacan, sobre todo, a la presencia en la misma de sustancias antioxidantes como los polifenoles y las melanoidinas, además de otras sustancias nutritivas (folatos, carbohidratos, magnesio, etc.) y no nutritivas (fibra).

Dentro de las bebidas que contienen polifenoles destaca la cerveza, cuya actividad antioxidante global oscila entre unos valores mínimos y máximos comprendidos en el intervalo 2 - 56 mg según la capacidad antioxidante equivalente de vitamina C (CEAC). Estos datos indican que se trata de una bebida con una capacidad antioxidante global significativa, ya que posee valores similares a otras bebidas alcohólicas, como el vino, y no alcohólicas, como el mosto. De los estudios realizados se desprende que el tipo de cerveza no influye en el poder antioxidante, ya que cervezas negras, rubias y sin alcohol presentan valores similares (González San José et al., 2001). Los compuestos fenólicos protegen de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñando un papel clave en la prevención de la aterosclerosis. También pueden prevenir la trombosis, inhibiendo la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar (Mazza, 2000). Este efecto se ha demostrado mediante experimentos con animales in vitro e in vivo. En muchos casos se inhibe la AMP cíclico fosfodiesterasa y como resultado se incrementan los niveles de cAMP. Asimismo, se reduce el nivel de calcio, se inhibe el “factor de

activación plaquetario”, se promueve la captación de los radicales libres y se reduce la liberación de enzimas que favorecen la agregación plaquetaria (Meltzer y Malterud, 1997; Craig, 1996).

Los compuestos fenólicos también son considerados como reguladores del sistema inmune y como antiinflamatorios, probablemente debido a la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, reduciendo los niveles de tromboxano. También modulan la actividad enzimática de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, fosfolipasa A2, hialuronidasa, e inhiben la acción de la angiotensina convertasa, mieloperoxidasa (que produce el hipoclorito y otros prooxidantes) y xantinoxidasa (que produce los radicales superóxido), entre otras. Dichos efectos les otorgan un amplio potencial para su utilización con fines médicos (Craig, 1996). Son numerosos los estudios que han mostrado que este tipo de compuestos poseen propiedades antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica y captando radicales libres como hidroxilo, superóxido y alcoxi radical (Sichel et al., 1991). En los alimentos ricos en compuestos fenólicos (cerveza, fresas, espinacas, vino tinto, etc.) se pueden evaluar a corto plazo ya que aumentan la capacidad antioxidante en suero (Cao et al., 1998; Velioglu et al., 1998; Kähkönen et al., 1999), lo que avala el creciente interés por el consumo de alimentos ricos en estos compuestos (Hertog et al., 1995).

Los compuestos fenólicos también tienen un especial interés debido a su potencial anticarcinógeno, bien estimulando el bombeo de ciertos agentes cancerígenos hacia el exterior de las células o bien mediante la inducción de enzimas de detoxificación (Mazza, 2000). En la bibliografía científica son múltiples las referencias que demuestran que los flavonoides tienen efectos citostáticos en varios sistemas in vitro y que son capaces de regular ciertos procesos importantes en el desarrollo del cáncer. Los flavonoides tienen actividad antipromotora, efecto antiinvasivo, e inhiben enzimas como la tirosina proteinkinasa, la ornitina descarboxilasa ATP-dependiente y la DNA topoisomerasa. Los isoflavonoides de la soja, especialmente la genisteína, pueden tener efecto protector frente a diferentes tipos de cáncer (mama, colon y piel). Este hecho, se ha relacionado con el efecto estrogénico de los isoflavonoides, mediante diferentes mecanismos bioquímicos (Barnes, 1995; Herman et al., 1995). En lo que respecta al lúpulo, existen numerosos estudios sobre su papel en diferentes patologías. Así, según los resultados obtenidos por Milligan (Milligan et al., 2002), se encuentra que la humulona del lúpulo inhibe la resorción ósea, lo que produce una elevada protección frente a la osteoporosis, y posee una pronunciada actividad antiinflamatoria. La humulona inhibe además la angiogénesis, es decir, reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso clave en la proliferación de tumores, así como en el crecimiento descontrolado de células endoteliales, un marcador de riesgo cardiovascular.

En cuanto al valor nutritivo de la cerveza, su valor calórico se debe a su contenido en alcohol etílico (7 Kcal/g), y a su extracto seco residual, constituido fundamentalmente por maltodextrinas (4 Kcal/g) procedentes de la hidrólisis del almidón y que la levadura no pudo metabolizar. Una cerveza de 5° aportaría aproximadamente 450 Kcal/L, de las que dos terceras partes corresponden al alcohol contenido y el resto a las maltodextrinas. La ingesta de un litro diario de cerveza aportaría un 17% de las necesidades energéticas diarias de un hombre y el 22% en el caso de la mujer. La cerveza sin alcohol tiene obviamente un valor calórico mucho más bajo, del orden de 140 Kcal/L (Hughes, 2003).



2. OBJETIVOS

La cerveza artesanal es un alimento muy consumido en España. Este producto ha incrementado su producción en los últimos años propiciando el surgimiento de pequeños cerveceros que pretenden competir con las grandes industrias cerveceras al ofrecer cervezas con matices diferentes que cautivan al consumidor.

De este modo, el objetivo general de este trabajo ha sido elaborar cervezas artesanas realizando una serie de investigaciones encaminadas a realizar variaciones en el proceso de elaboración, modificando diferentes parámetros tales como el tipo de maceración, la temperatura de fermentación y el tipo de levadura empleada, con el fin de observar cómo afectan dichos parámetros a sus características fisico-químicas y a sus propiedades funcionales.

Por un lado, para la caracterización fisico-química se determinaron los siguientes parámetros: contenido de proteínas, pH, acidez, densidad, grado alcohólico, color (Cie-Lab y °EBC), amargor (°EBU), concentración de diferentes ácidos y azúcares, y aromas.

Por otro lado, para evaluar las propiedades funcionales se determinaron los polifenoles (por absorbancia y por HPLC) y la actividad antioxidante en dos fases, la hidrosoluble y la liposoluble.





3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para la realización de este trabajo seguimos dos recetas, una por cada tipo de maceración, elaboradas con el software BeerSmith. Para ello utilizamos tres maltas diferentes: Chocolate Malt, Pale Ale Malt y Caramel/Crystal Malt, y dos tipos de lúpulo: Centennial y Saaz. Por otro lado, para realizar la fermentación se han empleado levaduras liofilizadas y levaduras líquidas.

En lo que respecta a los diferentes tipos de malta que se utilizaron para la elaboración:

Chocolate Malt: Tal y como su nombre indica, esta malta con un alto grado de tostado, aporta un intenso color marrón y presenta aromas que recuerdan al chocolate, pero, en el producto final, resaltan los aromas y sabores acafetados y a frutos secos tostados.

Pale Ale Malt: Esta malta es la base de la fórmula. Contiene suficiente carga enzimática para realizar la conversión de azúcares en el macerado, a pesar de contener casi un 30% de maltas tostadas, con menor o nula capacidad enzimática.

Caramel/Crystal Malt: Este tipo de malta, de baja capacidad enzimática, aporta color y mejora la capacidad de retención de espuma en el producto final.

Respecto a los dos tipos de lúpulo empleados:

Centennial: Tiene un sabor medio con tonos florales y cítricos. Su contenido en α -ácidos es de un 11%

Saaz: Aporta un gusto resinoso y suavemente especiado y un delicado aroma. Su contenido en α -ácidos es de un 3,6%.

3.2. Métodos

A continuación se explicará cómo se llevó a cabo el proceso de elaboración de nuestras cervezas:

Limpieza

Antes de empezar debemos asegurarnos de que todos los utensilios que utilizaremos están limpios, tales como maceradores, ollas, fermentadores, etc. Para ello utilizamos Chemipro Oxi, un esterilizador basado en oxígeno activo muy utilizado en la elaboración de cervezas, ya que además de ser muy eficaz no deja restos que puedan perjudicar nuestro producto.

Maceración

En primer lugar, procedimos al llenado de nuestro macerador casero con la cantidad correspondiente de malta, siendo la misma cantidad en ambos tipos de maceración: simple o escalonada. Posteriormente calentamos agua y la adicionamos al macerador según la fórmula.

Para el caso de la maceración simple añadimos primero 10,70 L de agua a 75,7°C, para alcanzar una temperatura de macerado de 68,9°C y lo mantuvimos durante 45 minutos. Transcurrido el tiempo de

macerado anterior, se adicionaron 4.28 L de agua a 94,6 °C para elevar la temperatura de macerado a 75,6°C por 15 minutos para completar la sacarificación.

En cuanto a la maceración escalonada, normalmente, utilizada para macerado de granos poco desagregados, para, evitar un contenido proteico elevado en el producto final, que con seguridad, proporcionaría turbidez y una escasa estabilidad de la espuma del producto final, se procedió de la siguiente manera. En primer lugar, se añadieron 10,7 L de agua a 54 °C para elevar la temperatura del grano a 50 °C (esta temperatura es óptima para el funcionamiento de las proteasas “rango”) y se mantuvo durante 30 minutos. Transcurridos éstos, se calentó el agua de macerado hasta los 68,9 °C y se mantuvo durante 30 minutos. En estos últimos 30 minutos se completó la sacarificación.

Finalmente, se hizo un lavado con 14,76 y 19,04 L de agua a 75,6 °C, respectivamente, para detener el proceso enzimático y agotar al máximo los azúcares del bagazo.

En ambos casos, realizamos previamente a la cocción, un recirculado del mosto en el propio macerador, sacando 3 litros de mosto y volviéndolos a añadir, para, clarificarlo gracias al efecto filtrante de la cama de grano.

Cocción

Una vez concluido el proceso de maceración, traspasamos el mosto a una olla donde se llevó a cabo la cocción de éste durante 60 minutos. Es durante éste proceso cuando añadimos los pellets de lúpulo dentro de una malla de tela en el mosto. La adición de los diferentes lúpulos se hace según se explica en la receta donde: a los 15 y 30 minutos de finalizar la cocción se añaden diferentes cantidades de Centennial, y nada más empezar el proceso se añade Saaz. Las adiciones de lúpulo al inicio de la cocción, proporcionan el amargor mientras que, las adiciones a mitad y finalización de ésta proporcionan sabor y aroma, respectivamente.

Enfriado del mosto

Tras la cocción del mosto procedemos a transferir éste desde la olla de cocción hasta otra olla en la que se realizó el enfriado, sumergiéndola en un baño de hielo para bajar la temperatura del mosto. Una vez alcanzada una temperatura cercana a los 20°C, tiene lugar el llenado de fermentadores que anteriormente limpiamos y desinfectamos dando lugar a cuatro fermentadores por cada tipo de maceración llevada a cabo.

Inicio de la fermentación

En primer lugar nos aseguramos de que la temperatura dentro de los fermentadores no supere los 25°C. Posteriormente añadimos la levadura líquida (5 mL) o la liofilizada (2,75 g) en los diferentes fermentadores y removemos el mosto para que se oxigene la mezcla y la levadura pueda actuar correctamente.

Una vez añadida la levadura tapamos el fermentador y colocamos la válvula de fermentación en la tapa con un poco de agua con Chemipro Oxi en el interior (la mitad más o menos). Después dejaremos los fermentadores a 12 y 25°C según corresponda para que tenga lugar el inicio del proceso.

Fermentación

Transcurridas 24 horas después de haber añadido la levadura, el mosto comenzó a fermentar. Se notará porque aparecerá una capa de espuma en la parte superior del mosto (es una cerveza de fermentación alta) y la válvula de fermentación empezará a burbujear. Durante los dos primeros días la fermentación será bastante intensa, se formará una capa gruesa de espuma y el agua burbujeará con mucha frecuencia. Después la fermentación será más lenta y disminuirá la acción de la válvula.

Trasiego de la cerveza

Una vez concluido el proceso de fermentación, el cual se puede comprobar viendo el burbujeo de la válvula, procedimos a transferir la cerveza de un fermentador a otro con el fin de eliminar el poso de levadura muerta que se forma durante la fermentación. Para ello deberemos de tener cuidado de no mover el cubo donde está la cerveza, para no agitar el sedimento. El trasvase lo realizamos dentro de la campana de extracción para evitar cualquier posible contaminación de nuestra cerveza.

Desarrollo de CO₂

Con el fin de que la cerveza desarrolle gas y espuma en un corto periodo de tiempo añadimos azúcar a nuestra cerveza. Dado que cada fermentador tiene un total de 3 litros aproximadamente, añadimos 18 gramos de azúcar a cada uno (6g/L) y removemos cuidadosamente para que el azúcar se reparta uniformemente.

Embotellado

En este último paso, debemos colocar el cubo de fermentación en un lugar elevado. En este paso utilizamos un llenador de goma que se engancha al grifo del cubo y facilita el llenado de botellas. No debemos llenar las botellas hasta arriba, sino que hay que dejar cierto espacio de cabeza para que la botella no reviente con el desarrollo de gas. Una vez llena la botella, le colocamos una chapa en el cuello y la cerramos mediante una chapadora manual. Cabe decir que la cerveza sigue madurando una vez embotellada, por lo que es aconsejable dejarlas reposar por un tiempo antes de consumirlas. Éste tiempo de reposo, corresponde a la segunda fermentación, que se realiza, básicamente, para carbonatar y madurar la cerveza verde.

3.3. Cervezas elaboradas

En este trabajo hemos elaborado un total de 8 tipos diferentes de cerveza con la variación de los tres parámetros comentados anteriormente (tipo de maceración, tipo de levadura y temperatura de fermentación). De este modo tenemos las siguientes cervezas, que enumeraremos del 1 al 8:

- 1- Maceración escalonada, levadura liofilizada y fermentación a 25°C.
- 2- Maceración simple, levadura liofilizada y fermentación a 25°C.
- 3- Maceración escalonada, levadura líquida y fermentación a 25°C.
- 4- Maceración simple, levadura líquida y fermentación a 25°C.
- 5- Maceración escalonada, levadura liofilizada y fermentación a 12°C.
- 6- Maceración simple, levadura liofilizada y fermentación a 12°C.
- 7- Maceración escalonada, levadura líquida y fermentación a 12°C.
- 8- Maceración simple, levadura líquida y fermentación a 12°C.

3.4. Determinaciones analíticas

3.4.1. Contenido de proteínas

Para la extracción de proteínas totales el protocolo de extracción seguido fue: A 5 mL de cerveza se le añadió 0,1 gramos de PVP con el fin de retener sustancias polifenólicas que interfieren en la determinación de las proteínas totales. A continuación se le añadió 10 ml de tampón de extracción compuesto por: Tampón Fosfato 50 mM pH= 7,8, EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,2 %, Cisteína 5 mM.

La extracción y homogeneización se realizó mediante el uso de un homogeneizador Polytron® durante 5 minutos a 4000 rpm. El extracto obtenido se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante, que se mantenía en cámara frigorífica hasta su posterior utilización. La determinación cuantitativa de proteínas totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Bradford (1976). La intensidad de absorbancia a 595 nm de la disolución coloreada fue medida en espectrofotómetro, tras la adición de 5 ml de la solución del colorante Azul de Comassie a una alícuota de la muestra problema. Asimismo, se obtuvo una recta de calibrado con concentraciones conocidas de Albúmina de suero bovino, suministrada por Sigma, que se comprendían entre 10 y 60 µg/ml.

3.4.2. Recuento de levaduras

Para llevar a cabo el conteo de levaduras, hicimos uso de la técnica de diluciones seriadas que consiste en la reducción progresiva, paso a paso, de la concentración de una sustancia en disolución. Las diluciones en serie se utilizan para crear disoluciones muy diluidas con precisión, así como disoluciones para experimentos en los que se pretenda estudiar curvas de concentración con una escala logarítmica.

De este modo, en primer lugar preparamos agua peptonada que servirá como solución para esta técnica. Esta solución proporciona un medio de enriquecimiento no selectivo, en el cual la peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Después dispondremos de 7 tubos por cada tipo de levadura, los cuales llenaremos el primero con 10 mL de agua peptonada, y el resto con 9 mL.

Una vez preparados los tubos, diluimos en el primero 100 µL de levadura líquida, por un lado, y 100 mg de levadura liofilizada por otro, para conseguir así una dilución a la -2. Posteriormente se cogerá 1 mL de este tubo y se transferirá al siguiente para volver a diluirlo. Repetimos este proceso hasta llegar a una dilución a la -8.

Por último, transferimos el contenido de estos tubos a diferentes PetriFilms, y dejamos que la levadura crezca para llevar a cabo posteriormente el conteo.

3.4.3. Densidad

En este apartado hacemos uso del densímetro. Para ello procedemos al llenado de una probeta con 200ml aproximadamente de cerveza e introducimos dentro el densímetro que nos dará la medida de la densidad. En este punto, la cerveza se atemperó previamente a 20°C y se desgasificó por completo.

3.4.4. pH

El análisis del pH se basó en la determinación de la concentración de iones hidrogeno con un medidor de pH ajustado a 4,0 y a 7,0 con una solución tampón, según la Asociación oficial de análisis químicos (AOAC). Para llevar a cabo esta determinación, se introdujeron los electrodos, previamente lavados, en la muestra de cerveza, y se midió el pH, haciendo uso de un pH-metro Metrohm 760 Sample Changer. Como en la medida anterior, la cerveza se atemperó previamente a 20°C y se desgasificó por completo.

3.4.5. Grado alcohólico

Para calcular de forma teórica el porcentaje de alcohol de la cerveza, es necesario conocer la densidad inicial del mosto antes de la fermentación y la densidad final que hemos obtenido. Después aplicamos la siguiente formula:

$$\frac{\text{Densidad inicial} - \text{Densidad final}}{7,45} = \text{alcohol \%}$$

3.4.6. Color: °EBC

Para determinar el color según la AOAC se utilizó el método Espectrofotométrico. El método se basó en medir la absorbancia a una longitud de onda de 430nm y 700nm a 20°C de cerveza previamente desgasificada.

Cuando el cociente entre los valores obtenidos de absorbancia a 430 y 700 nm, es mayor o igual a 25, la muestra está libre de turbidez visible y se realizará el cálculo para la determinación de color. Posteriormente, obtenemos el color en unidades °EBC aplicando la siguiente fórmula:

$$^{\circ}\text{EBC} = 25 \times \text{Abs}_{430\text{nm}}$$

La medida de color también se realizó mediante colorímetro Minolta Konica CR-400 con aplicación para elementos líquidos usando el sistema CIE Lab (L*, a* y b*). Se determinó el color de cada una de las cervezas, obteniendo un valor representativo de la muestra. Este sistema de determinación de color es el

modelo cromático usado para describir los colores que puede percibir el ojo humano. Aporta tres parámetros relacionados con dos conceptos básicos en la apreciación del color: luminosidad (parámetro L*) y cromaticidad (tono y croma; parámetros a* y b*). Dichos parámetros son los siguientes:

- Parámetro L* → Indica la luminosidad. Varía de 0 (negro) a 100 (blanco).
- Parámetro a* → De -60 a 0 corresponde con los colores verdes, mientras que desde el 0 a 60 corresponde a los rojos.
- Parámetro b* → De -60 a 0 corresponde con los colores azules, mientras que desde el 0 a 60 corresponde a los amarillos.

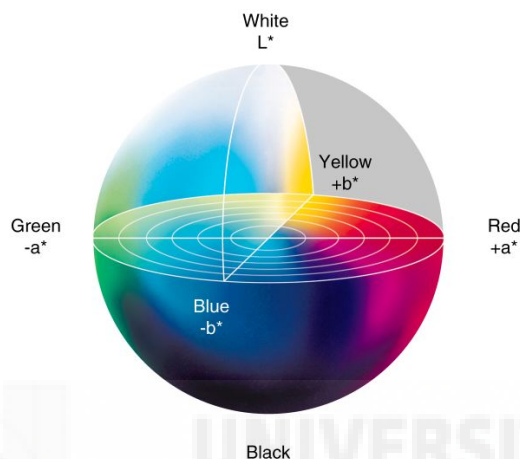


Diagrama de color CIE Lab. (Fuente: www.colorinstrument.cn)

Tras realizar la medida con nuestro colorímetro, se muestran los valores de los diferentes parámetros. Estos valores de coordenadas muestran un punto en el espacio tridimensional que representa CIE Lab.

3.4.7. Amargor: °EBU

Para llevar a cabo la determinación del amargor transferimos 10 mL de cerveza a un tubo de centrifuga. Añadimos además 20mL de etil acetato en un medio acidificado con 1mL de HCL 3N, que servirá para extraer las sustancias más amargas mediante una centrifugación a una velocidad de 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se mide la absorbancia del sobrenadante, la fase orgánica que contiene el etil acetato junto con las sustancias que proporcionan amargor, a 275nm. Finalmente obtenemos las unidades de amargor °EBU aplicando la siguiente fórmula:

$$^{\circ}\text{EBU}=50 \times \text{Abs}_{275\text{nm}}$$

3.4.8. Acidez

La acidez titulable se determinó por valoración potenciométrica mediante un pHmetro Metrohm 760 Sample Changer, de sensibilidad $\pm 0,01$ complementado con una impresora modelo DP40-24N. Se valoró con hidróxido sódico a 0,1 N hasta alcanzar un pH de 8,1 (AOAC, 1990). El análisis se realizó en un 1 mL de cerveza desgasificada y se disolvió en 25 mL de agua destilada. Los resultados se expresaron en gramos del ácido mayoritario/ 100 gramos de muestra (en la cerveza el ácido mayoritario es el ácido cítrico). Las medidas se analizaron por duplicado en cada muestra, siendo los resultados la media \pm E.S.

ACIDEZ TOTAL (% ácido cítrico)= (Volumen de NaOH x Normalidad de NaOH x meq. Ácido láctico x 100) / Volumen de muestra

3.4.9. Polifenoles totales

Los fenoles totales se extrajeron de acuerdo con el protocolo descrito por Tomás-Barberán et al. (2001). A 20 µL de cerveza se añadió agua: metanol (20:80) que contiene 2 mM NaF (para inactivar la actividad polifenoloxidasas y prevenir la degradación fenólica). Tras la centrifugación se tomó el sobrenadante y se cuantificó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y los resultados (media ± DE) se expresaron como mg ácido gálico equivalentes 100 mL⁻¹.

Los compuestos fenólicos individuales se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución junto con detector de diodos (HPLC-DAD) como se ha descrito previamente (Tomás-Barberán et al., 2001). Un ml de los extractos obtenidos para los fenoles totales se filtró a través de un filtro Millipore de 0,45 micras y se inyectó en un HPLC Hewlett-Packard Serie 1100 equipado con una columna Supelco C18 (Supelcogel C-610H, 30 cm x 7,8 mm, Supelco Parque, Bellefonte, EE.UU.) y se detectaron mediante absorbancia a 280 o 340 nm. Los picos se eluyeron por un gradiente usando las siguientes fases móviles: 95% de agua + 5% de metanol (A); 88% de agua + 12% de MeOH (B); 20% de agua + 80% de MeOH (C); y MeOH (D) a una velocidad de 1 ml min⁻¹. Los picos se identificaron utilizando patrones auténticos por la comparación de los tiempos de retención y análisis espectral pico.

3.4.10. Ácidos y Azúcares por HPLC

Para la cuantificación de ácidos y azúcares se tomaron 10 mL de cerveza de cada muestra en tubos de centrifuga. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 14.000 rpm. y a una temperatura de 4°C en una centrifuga modelo C30P CENTRIFUGE, B.Braun, Biotech. Se tomaron 2 mL de sobrenadante de cada muestra, que se microfiltraron con filtros Albet de celulosa (0,45 µm) y se pasaron a viales de HPLC de 1 mL cada uno. Las determinaciones se llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido de alta precisión (HPLC) Hewlett Packard Serie 1000, empleando como fase móvil ácido fosfórico al 0,1%. La detección se llevó a cabo por índice de refracción para el caso de los azúcares y ultravioleta (280 nm) para los ácidos orgánicos. La cuantificación se realizó comparando las áreas de los picos obtenidos en las muestras con las correspondientes a patrones de cada ácido y azúcar de concentración conocida. Los resultados obtenidos son la media ± ES de las determinaciones realizadas, realizándose dos repeticiones por muestra.

3.4.11. Capacidad Antioxidante Total

La determinación de la capacidad antioxidante total se llevó a cabo según el método de Arnao et al. (2001), adecuado posteriormente para determinar la AAT en la fase hidrosoluble FH y en la liposoluble FL.

En primer lugar se prepararon los extractos a razón de 3 extracciones por tratamiento y por duplicado. En un tubo de centrifuga se pesaba 5 mL de muestra y se le añadían 15 ml de Tampón Fosfato y 10 ml de Etil Acetato. Los tubos permanecían en el interior de una bandeja con hielo picado para evitar que las

muestras se degradaran. Las muestras se homogenizaban en un Polytron® a 4000 r.p.m. durante 40 segundos. Se colocaban los tubos en la centrifuga modelo C30P CENTRIFUGE, B. Braun, Biotech a 20.000 r.p.m. durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Una vez centrifugadas las muestras se separaban las dos fases para su posterior análisis. En la muestra la fase liposoluble se encontraba en la parte superior y la hidrosoluble en la inferior. Se extraían mediante micro pipeta tres tubos eppendorf® de 1,5 ml de la FH y uno de la FL.

Para la determinación de la AAT en la FH se introdujeron, en dos cubetas desechables, los siguientes compuestos: en primer lugar 890 µL de tampón Glicina, HCl 50 mM de pH 4,5; a continuación 25 µL de ABTS 5 mM y por último 25 µL de H2O2 0,5 mM. Una vez preparadas las dos cubetas, se realizó el cero en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 730 nm. A continuación, se añadió en una de las cubetas 25 µL de peroxidada “horse radish sigma” 5 µM y se midió la absorbancia en ese primer instante cuando la lectura se estabilizaba. Por último, se añadió, en la cubeta que ya contenía la peroxidada, 25 µL de muestra y se midió igualmente la absorbancia a los 30, 60 y 90 segundos desde la adición de la muestra. Con la adición de los antioxidantes que contiene la muestra, disminuyen los radicales ABTS que se habían generado previamente, por lo que se produce un descenso de la absorbancia que es proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro modelo Uvikon XS, Bio- Tek Instruments.

La AAT de la FL, se cuantificó de manera similar, pero usando etanol en lugar de Tampón Glicina, para que pudieran solubilizarse los compuestos presentes en la fracción liposoluble de los extractos. Variaron sensiblemente los volúmenes adicionados de muestra y etanol por lo que para una mejor comprensión se resume en un cuadro a continuación.

	T. Glicina	Etanol	ABTS	H2O2	Peroxidasa	Muestra
AAT. FH	890		25	25	25	25
AAT. FL		890	25	25	25	50

Tabla: Cantidad de los componentes (µL) para calcular la actividad antioxidante.

En ambos casos la AAT se expresó como equivalentes de Trolox, por 100 mL de muestra, ya que este compuesto, un análogo estructural de la vitamina E, es soluble tanto en disolventes orgánicos como inorgánicos. Para ello se realizaron rectas de calibrado con cantidades conocidas de Trolox, tanto en medio de Tampón Glicina como en medio etanólico y que se usaron para cuantificar la AAT en la FH y FL, respectivamente. Para cada una de las extracciones (tres por cada tratamiento) la cuantificación se realizó por duplicado y los datos son la media ± ES.

3.4.12. Perfil aromático por GC-MS

Para la extracción de los volátiles se utilizó la fibra SPME 65 µm PDMS/DVB (StableFlex/SS), se introduce en el espacio de cabeza de un vial con 10 mL de cerveza+1 g de sal+ 1 µL de 1-butanol, y se deja al baño maría de 40°C y en agitación durante 30 min. Se extrae la jeringa y se inyecta en el cromatógrafo; la desorción transcurrió durante 3 minutos. Los compuestos volátiles fueron separados, identificados y cuantificados mediante un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A (Shimadzu

Corporation, Kyoto, Japón), acoplado a un detector de espectrofotometría de masas Shimadzu QP-5050A. El sistema CG-EM fue equipado con una columna Tracsil Meta.X5 (Tecknokroma, Barcelona) de 60 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de grosor de film. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 0,7 mL/min en modo split y un cociente 1:5. El programa de temperatura fue: 35°C durante 5 minutos, una rampa de 5°C/min hasta llegar a los 100°C, una rampa de 3°C/min hasta llegar a 220°C, mantenimiento a 220°C durante 1 minuto, una rampa de 20°C/min hasta 300°C, mantenimiento a 300°C durante 5 minutos. La temperatura del inyector fue 250°C y la del detector 300°C. El espectro de masas fue obtenido por ionización electrónica (EI), con un potencial de ionización de 70 eV y el rango de masas osciló entre 45-450 m/z. La mayoría de los compuestos fueron identificados usando tres métodos analíticos diferentes:

- (i) Índice de Kovats o de Retención. Para el cálculo del índice de retención se ha utilizado el mix de alcanos de Sigma ref. 04070 C8-C20 en hexano (<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>).
- (ii) tiempos de retención de patrones auténticos
- (iii) espectros de masas de la librería Wiley

3.4.13. Análisis sensorial

Para realizar este estudio participaron 6 panelistas entrenados (hombres y mujeres, con edades comprendidas entre 21 y 55 años) miembros de los grupos de investigación de Calidad y Seguridad Alimentaria y Post-recolección (Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España). Las muestras (cervezas) se sirvieron en jarras de cristal a una temperatura de 12°C. Las cervezas de fermentación alta deben servirse a una temperatura entre 12 y 16°C, de esta manera se puede apreciar su rico aroma y su exquisito bouquet. Primero se valoraba la cervezas de referencia, la cerveza 2 en nuestro caso, y posteriormente el resto de cervezas elaboradas.

Los panelistas, sentados en una mesa redonda, evaluaron individualmente cada una de las muestras y seleccionaron los atributos de aroma y flavor presentes, sus intensidades, orden de aparición y post-gusto. Estos resultados se ponían en común y se discutían hasta llegar a un “consenso” sobre cada muestra. Entre cada una de las muestras se puso a la disposición de los panelistas agua osmotizada y galletas sin sal, para limpiar el paladar. La sala de pruebas disponía de una combinación de luz natural y luz no natural (fluorescente), y se fijó una temperatura de 24°C. Para la evaluación de las muestras (8 muestras en total) se realizó una única sesión de una hora aproximadamente. El panel utilizó una escala numérica para cuantificar la intensidad de los atributos estudiados, donde 0 representa una intensidad extremadamente baja, y 10 representa extremadamente alta, con incrementos de 1 unidad. Los atributos analizados se clasifican según las diferentes fases sensoriales:

Fase visual:

Se recomienda utilizar un fondo blanco, ya sea un papel o un mantel de dicho color.

- Color: sujeta el vaso de cara a la luz y fijate si el color es claro, o más bien turbio. El color puede oscilar desde blanco a negro, pasando por rojizo y tostado/caramelo.

Fase olfativa:

Valoraremos el tipo de aroma así como su intensidad, en función del tipo de levadura, y de la fermentación y/o evolución de la cerveza (tiempo en cada fase de la elaboración, a mayor tiempo, mayor complejidad e integración del aroma).

- Aroma a cereal (malta o trigo) y a lúpulo: nos fijaremos en el tipo de aroma marcado por el tipo y cantidad de ingrediente empleado. El lúpulo es un mundo aparte ya que, debido a la gran variedad de lúpulos existentes, la cerveza puede tomar diversos aromas como herbáceos, florales, terrosos o resinosos. Además en función de la cantidad, puede otorgar notas más o menos amargas. Normalmente, las cervezas doradas olerán más a lúpulo, mientras que las oscuras tienden a tener un olor más pronunciado a malta tostada, chocolate o café, según el grado de tostado.

- Aromas a frutales y/o especias: aquellos como consecuencia de la fermentación, estabilizados durante el proceso de maduración, que otorgan notas picantes o afrutadas comunes en cervezas Ale, o con segunda fermentación en botella, que suelen ser difíciles de precisar.

Fase gustativa:

Primero, damos un primer sorbo para impregnar la boca de cerveza y estimular las papilas gustativas. Será en el segundo sorbo cuando identifiquemos las notas gustativas. La clasificación de las notas será muy similar a la de la fase olfativa.

- Gusto a cereales: ya sea trigo o malta, reconoceremos en un primer momento notas a pan o galleta tostados. Con cervezas Ale, con malta tostada, percibiremos notas a chocolate o caramelo dependiendo de la cantidad y del grado de tostado.

- Gusto a lúpulo: si se encuentra en grandes cantidades, la sensación será de amargor e invadirá toda la boca, tapando otros sabores. Si en cambio hay poco, será poco amarga y podremos percibir los azúcares residuales de la cerveza. Las de trigo suelen ser más dulces.

- Gusto a frutas y/o especias: apreciaremos en este caso si han sido añadidos a la receta de la cerveza, o han surgido también como resultado del proceso de maduración. Tendremos notas como cilantro, canela, clavo, y diversas frutas (en ocasiones ácidas a la par que refrescante). Al igual que con el aroma, deberemos decir si estas notas están balanceadas con otros sabores de la cerveza.

3.4.14. Análisis estadístico

Las variables dependientes (parámetros analíticos) fueron sometidas a análisis de la varianza (ANOVA) para establecer si existían diferencias estadísticas significativas entre los 8 tipos de cerveza, siendo la variable independiente el tipo de cerveza. Posteriormente se realizó el análisis de Tukey para determinar qué tipos de elaboración resultaban diferentes entre sí. Se ha utilizado el software estadístico SPSS 11.0.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Contenido de proteínas

Las proteínas de la cerveza poseen un tamaño molecular entre 10-40 kDa (Silva et al., 2008) y la mayoría de ellas son proteínas modificadas de la cebada que se crean durante la elaboración de la cerveza mediante acción de reacciones proteolíticas y químicas (Curioni et al., 1995). Las proteínas más comunes de la cebada son hordeínas y suponen un 40-50% del total de las proteínas. Otras proteínas presentes en la cebada son, por ejemplo albúminas, glutelinas, globulinas, etc. Algunas proteínas en la cerveza parece que no tienen función, excepto su participación en la textura, color, sensación en la boca y el sabor, pero algunas se han asociado con la formación de espuma y turbidez, por lo que pueden tener un impacto en los consumidores.

En este trabajo, se ha determinado el contenido de proteínas totales tras diferentes etapas del procesado. Se puede comprobar que tras el proceso de maceración se obtiene la mayor concentración de proteínas (Figura 2, Etapa 1).

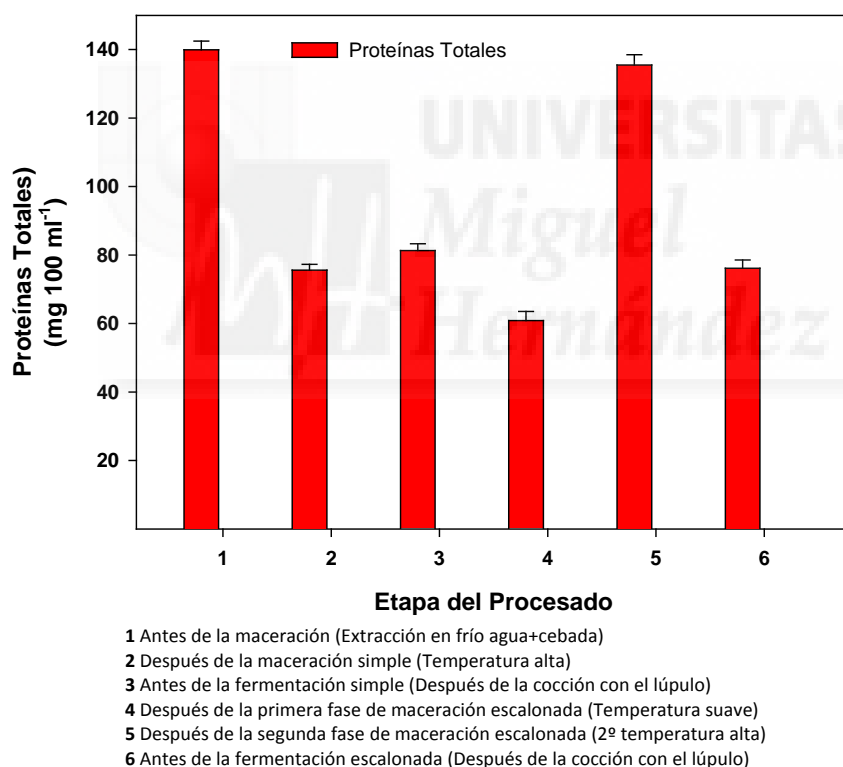


Figura 2. Concentración de proteínas totales a lo largo del procesado y variables en la elaboración de la cerveza.

Se han ensayado 2 tipos de maceración: simple y escalonada. Tras la aplicación de temperatura alta, se observa un descenso en la concentración de proteínas (Etapas 2 y 4) pero tras la adición del lúpulo (Etapas 3 y 6) experimentan un ligero incremento, lo que puede atribuirse a las proteínas presentes en el

lúpulo. La composición del lúpulo varía con la variedad, año de cultivo y localización, pero posee como valor medio un 22% de proteínas (Sharp et al., 2014). En la etapa 5 (maceración escalonada) se origina un incremento de proteínas, alcanzando niveles similares a los obtenidos tras la maceración en frío. Este incremento se puede atribuir a que en este tipo de extracción se está favoreciendo la obtención de proteína extractable. Se sabe que durante la maceración se produce la extracción de proteínas, pero existe un alto porcentaje de proteínas no-extraíbles (Silva et al., 2008; Treimo et al., 2008), las cuales en la maceración escalonada estas proteínas poliméricas podrían transformarse en otras proteínas más sencillas y extraíbles, lo que justificaría el incremento obtenido en la Etapa 5 (Steiner et al., 2011).

4.2. Recuento de levaduras

Tras una semana de crecimiento de la levadura en los diferentes PetriFilm™ procedimos a un conteo de las mismas. Los resultados obtenidos se agrupan en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Recuento de levaduras teniendo en cuenta la dilución y tipo de levadura empleada

Dilución	Levadura Líquida	Levadura Liofilizada
-9	1-2	1-1
-8	82-81	18-19
-7	130-127	111-99
-6	825-817	778-727

Como podemos ver los valores más representativos son aquellos que corresponden a la dilución -8. Tras hacer la media de los valores de interés obtuvimos:

Para levadura líquida $\rightarrow 8,15 \times 10^9$ ufc/mL

Para levadura liofilizada $\rightarrow 1,85 \times 10^9$ ufc/g

En la elaboración de cerveza se utilizan principalmente dos especies de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (cerveza tipo “Ale”) y *Saccharomyces carlsbergensis* conocida también como *Saccharomyces uvarum* o *pastorianus* (cerveza tipo “Lager”). *Saccharomyces* se encarga de fermentar los azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa presentes en el mosto y en ausencia de oxígeno produce como productos principales etanol y CO₂ (Varnan y Sutherland, 1997). En este trabajo se ha utilizado *S. cerevisiae* para obtener cerveza tipo “Ale”. El recuento obtenido está dentro de los rangos recomendados para estos tipos de levadura que debe ser superior a $4-6 \times 10^6$ ufc/mL (López et al., 2002). En nuestro trabajo hemos inoculado 4×10^{11} y 5×10^{10} para la levadura líquida y liofilizada, respectivamente. Una tasa de inoculación baja provoca un retraso en el inicio de la fermentación y aumentará la competencia de tipo bacteriana o por levaduras salvajes, que están siempre presentes en los tanques de fermentación. También se han relacionado los bajos niveles de inoculación con incrementos de algunos aromas indeseados, como el acetaldehído, que revela aromas a pasto y manzanas verdes, y un tipo ésteres que se caracterizan por producir sabores a banana. Por el contrario, una tasa de inoculación elevada, desprende mucho calor e influye en la rapidez con la que se da inicio a la fermentación. Adicionalmente disminuye el pH rápidamente y ayuda a reducir la proliferación bacteriana (Erlend et al., 2006).

4.3. Densidad

Respecto a la densidad de nuestras cervezas tenemos en primer lugar la misma densidad inicial para todas ellas, 1042. Sin embargo, al medir la densidad final vemos como existen variaciones entre ellas que van desde 1010 a 1014, siendo mínimas y por tanto no significativas. La disminución de la densidad se produce por un fenómeno denominado atenuación. Durante la fermentación primaria se consumen la mayoría de los azúcares contenidos en el mosto provocando el descenso de la densidad. La atenuación se mide mediante el porcentaje de la densidad final con respecto a la densidad inicial. Estos descensos de densidad se consideran dentro de los valores normales en la elaboración de este tipo de cerveza, si bien se ha observado que la temperatura a la cual se realiza la fermentación es un factor a tener en cuenta (Hoche et al., 2014).

4.4. pH y acidez titulable

El pH es un factor de importancia para las reacciones bioquímicas que se desarrollan durante el proceso; en todos los pasos de la fabricación hay disminución del pH y los amortiguadores minerales del agua contrarrestan en parte este cambio. Un pH elevado es desfavorable para reacciones importantes como la sacarificación, ya que provoca un trabajo deficiente de las enzimas generándose menos azúcares, la coagulación de proteínas durante la ebullición es menos intensa, el amargor es más astringente por mayor extracción de taninos (polifenoles) desde la cáscara del grano en el proceso de maceración y filtración. Además un elevado pH conlleva un mayor riesgo desde el punto de vista microbiológico. (Alejandro Rodríguez. 2003.).

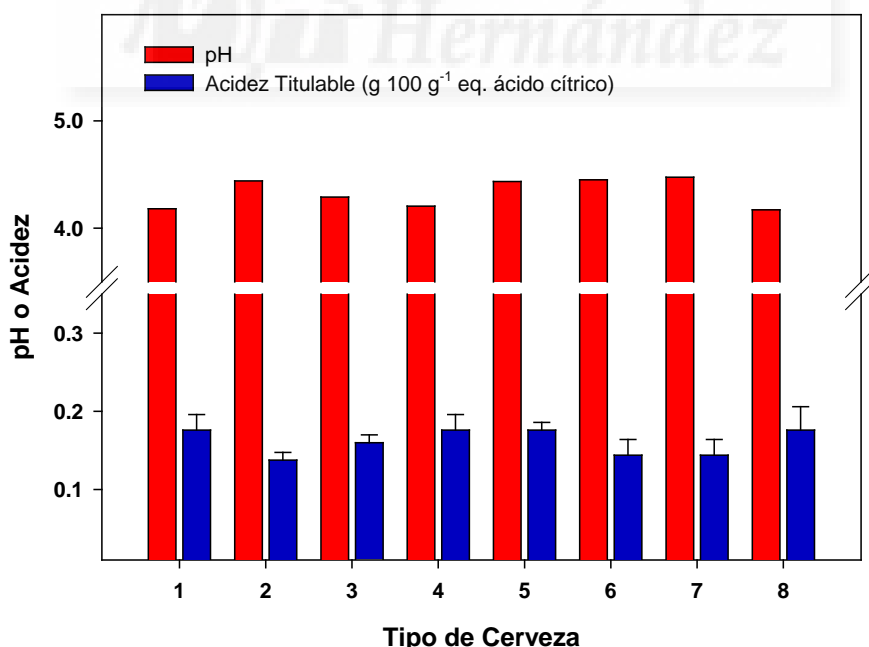


Figura 3. Valores de pH y acidez en los distintos tipos de cervezas elaboradas.

Según el Real Decreto 53/1995, de 20 enero, por el que se aprueba la reglamentación Técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta líquida, establece que el pH debe

estar comprendido entre 3,5 y 5. Además, este decreto establece que la acidez total, previa eliminación del anhídrido carbónico, expresada en ácido cítrico, no será superior al 0,3%. El anhídrido carbónico contenido no será inferior a tres gramos por litro. Como podemos observar todas nuestras cervezas tienen un pH y una acidez similar (**Figura 3**), siendo estos valores próximos a 4,2 y 0,16 respectivamente. Dicho esto, nuestra cerveza se encuentra dentro de los valores permitidos respecto a estos dos parámetros.

4.5. Grado alcohólico

Se forma durante la etapa de fermentación del mosto (proceso anaeróbico), mediante el cual la levadura convierte la glucosa en etanol y dióxido de carbono (Knudsen, 1977):



Los principales productos de fermentación son etanol y CO₂, aunque también se forman numerosos subproductos del crecimiento de levaduras, que contribuyen de forma importante al perfume y aroma de la cerveza (Brown et al., 1989). El porcentaje de azúcares fermentables en el extracto total determina el límite de atenuación, que establece el alcohol que contendrá la cerveza final. Y en el extracto soluble, que se denomina mosto, el 60% de las sustancias son fermentables (maltosa, maltotriosa, sacarosa, glucosa y fructosa), que serán utilizadas por la levadura para producir el alcohol y el CO₂ durante la fermentación (Briggs et al., 1981). La mayoría de los enlaces químicos del almidón son α 1 - 4, pero también existen puntos de ramificación, en donde son α 1 - 6. Ambas moléculas poseen en sus extremos, un solo grupo reductor, lo que las iguala como si fueran un azúcar simple como la glucosa en poder reductor.

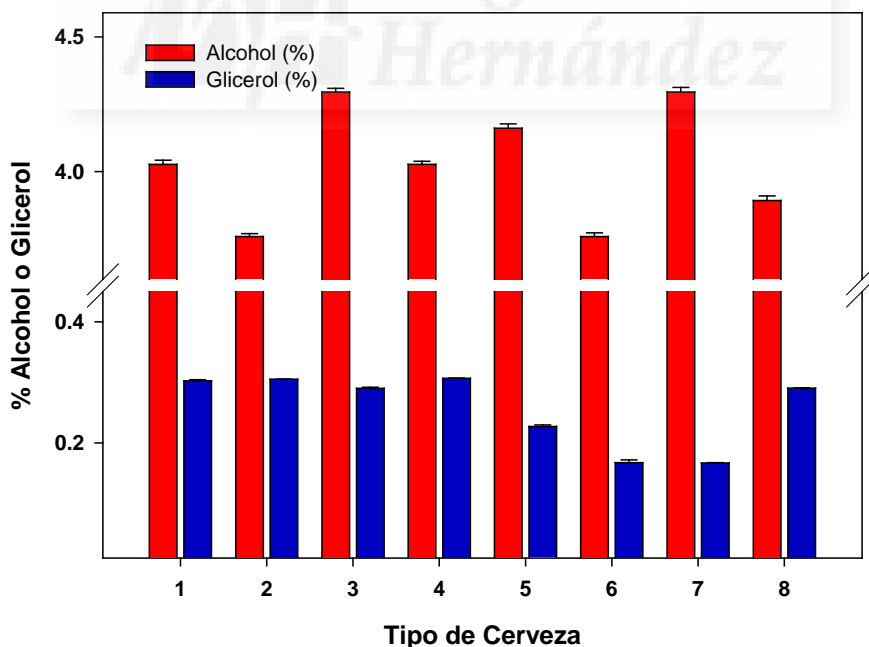


Figura 4. Grado alcohólico y contenido de glicerol en los distintos tipos de cervezas elaboradas.

La enzima α -amilasa ataca a la amilopectina y a la amilosa al azar, en cualquier punto de la molécula, menos cerca de los puntos de ramificación y tampoco cerca de los extremos no reductores. Por lo tanto, origina carbohidratos complejos llamados dextrinas. La enzima β -amilasa, en cambio ataca a las dextrinas, amilopectinas, amilosas por sus extremos no reductores, cortando dos unidades de glucosa que se denominan maltosa. Por lo tanto, se la denomina enzima sacarificante y a la α amilasa enzima dextrinificante se denomina maltosa. O sea, que la enzima α amilasa actúa generando lugares (extremos no reductores) para que corte la enzima β amilasa y se produzcan moléculas de maltosa.

En la **Figura 4** se representan los resultados sobre el porcentaje de alcohol de nuestras cervezas, y se puede concluir que la temperatura de fermentación no tiene mucha relevancia en este parámetro, ya que las cervezas en las que solo varía dicha temperatura tienen un grado de alcohol muy similar (2 y 6, 3 y 7, por ejemplo). Por otro lado, podemos decir que la maceración escalonada tiene mayor contribución al grado alcohólico que la simple (1 y 2) al igual que la levadura líquida frente a la liofilizada (1 y 3). La cantidad y actividad de la los 2 tipos de levadura inoculada y la diferente maceración antes de la etapa de fermentación son parámetros que pueden influir en el porcentaje de alcohol obtenido en cada una de las elaboraciones, de acuerdo con estudios previos (Kunze, 1996).

4.6. Color y Polifenoles

La aplicación de calor puede ser la causa de muchas reacciones complejas que comprometen a los carbohidratos. La actividad del agua y los protones regulan el grado de liberación de azúcares reductores por hidrólisis a partir de sus conjugados glicosídicos en los alimentos. Después de la liberación ocurren muy pocas reacciones de los azúcares en medio acuoso a pH 4.0 aproximadamente. Sin embargo, si el medio vuelve a ser neutro o débilmente alcalino, los hemiacetales pasan más rápidamente a la forma carbonilo de los azúcares reductores. De este modo ocurre la reacción entre el grupo amino de la proteína y el grupo del azúcar, conocida como reacción de Maillard (Kunze, 1996).

Cuando no participan compuestos amino en las reacciones de descomposición inducidas por el calor, reciben el nombre de reacciones de caramelización. Los dos tipos de reacciones tienen lugar al mismo tiempo y reciben el nombre de reacciones de pardeamiento no enzimático, formando polímeros pardos a negros llamados melanoidinas. (Alejandro Rodríguez. 2003.) El color es uno de los atributos más destacados de la cerveza, siendo el atributo principal del aspecto de ésta, nos da idea del estilo de la misma y a diferencia de otras bebidas, su espectro es mucho más amplio. El color de la cerveza se debe principalmente a las maltas utilizadas: las maltas denominadas base (como la Pilsner y la Pale, entre otras) que aportan el color amarillo pálido base y las maltas coloreadas (Cristal, Chocolate y Negra, entre otras) que son las encargadas de dar cuerpo, carácter y color. El color de las mismas viene determinado por la temperatura de secado durante el malteado, de forma que temperaturas más altas producen maltas más oscuras.

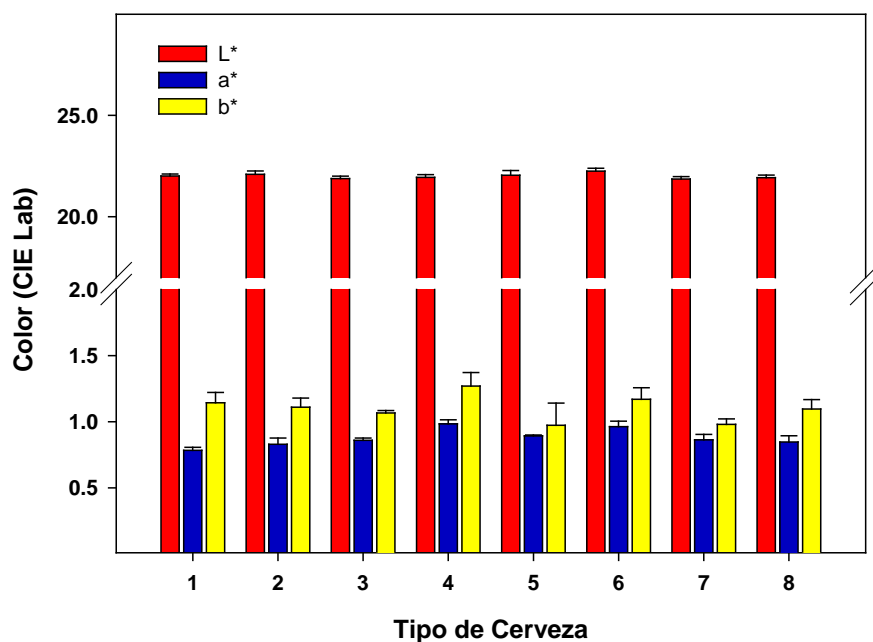


Figura 5. Parámetros de color (L^* , a^* y b^*) en los distintos tipos de cervezas elaboradas.

Cuando observamos los gráficos que nos proporcionan información sobre el color de nuestra cerveza (Figura 5), podemos apreciar que las 8 cervezas son muy oscuras. Por un lado, mediante el análisis CIE-Lab vemos como el parámetro predominante es el “L”, que como comentamos anteriormente es el que nos proporciona una idea sobre la luminosidad, con unos valores de 22 aproximadamente (el valor 0 es negro mientras que el 100 es blanco). Además, los °EBC corroboran los resultados obtenidos con CIE-Lab, obteniendo valores muy elevados también (Figura 6).

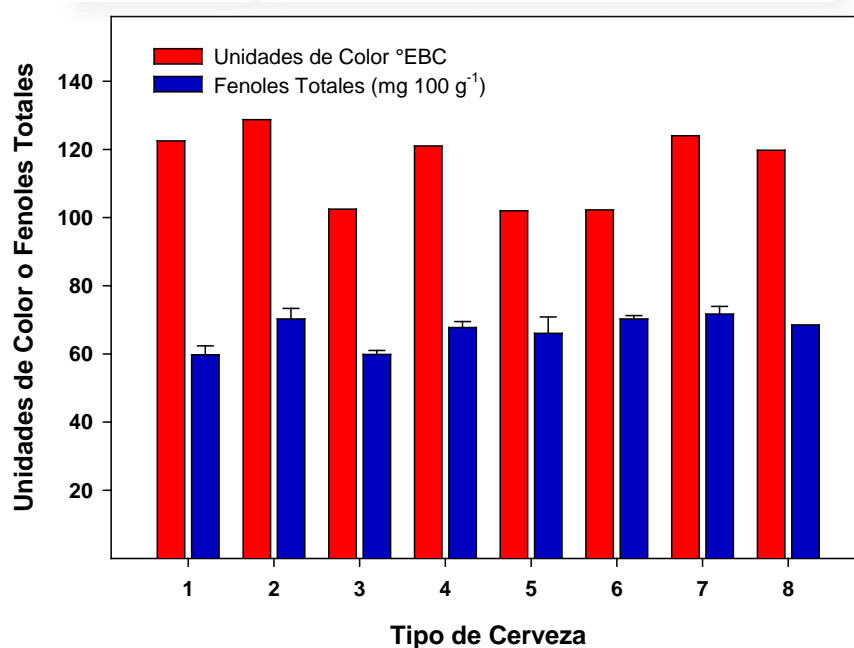


Figura 6. Unidades de Color y concentración de polifenoles en los distintos tipos de cervezas elaboradas.

Los polifenoles son un amplio grupo de compuestos presentes de forma extensiva en la naturaleza, y desde el punto de vista del estrés oxidativo resultan de gran interés ya que su estructura química les confiere en general potentes capacidades antioxidantes. Estos compuestos abundan en los alimentos vegetales, especialmente en frutos rojos, y también en los productos derivados como té, vino y cerveza.

Los flavonoides son un grupo o familia de compuestos fenólicos que en los últimos años ha cobrado una importancia significativa debido a que es el grupo probablemente más activo o con mayor capacidad antioxidante. Se calcula que en la dieta mediterránea su ingesta oscila entre 20 y 80 mg/día. Son en muchos casos los polifenoles mayoritarios presentes en los alimentos y bebidas. Estructuralmente se caracterizan por estar formado por dos bencénicos unidos entre sí por un heterociclo oxigenado. Se diferencian unos de otros por el número y posición de los grupos hidroxilos, así como por el grado de oxidación. En general se encuentran normalmente como glicosidos, lo que les hace más estables. Además de su acción como antioxidantes, los flavonoides ejercen numerosos efectos bioquímicos, aparentemente beneficiosos. Poseen actividad antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica. Sin embargo su acción in vivo depende de la biodisponibilidad. (González-Sanjosé, 2010)

Los compuestos fenólicos juegan un importante papel en las características sensoriales de la cerveza, así contribuyen a su sabor, astringencia, color y aroma, además de ser responsables, al menos parcialmente de la turbidez de las mismas. El contenido final de compuestos fenólicos en una cerveza no depende exclusivamente de las materias primas empleadas en su elaboración, sino que las prácticas de elaboración también inducen importantes cambios en la composición fenólica de las cervezas.

En el caso de nuestras cervezas, la cantidad de polifenoles varía entre 60 y 70 mg/100 g de cerveza (**Figura 6**). Dicha cantidad de estos compuestos es bastante considerable, lo que resulta un buen valor muy positivo para las cervezas. Este rango en el contenido de polifenoles es similar al encontrado en otros trabajos (Dvořáková et al., 2008; Siqueira et al., 2011). Se han realizado diferentes estudios sobre el contenido de polifenoles de la cerveza, y se ha comprobado que el lúpulo contribuye de forma muy importante al contenido total de compuestos fenólicos (Stevens et al., 1999), junto con el aportado por la cebada.

Con el objetivo de profundizar en el campo de los compuestos fenólicos, se realizó un análisis por HPLC-DAD para la cuantificación de polifenoles individuales. Los resultados mostraron un perfil polifenólico muy similar, por lo que se muestra un cromatograma a modo de ejemplo (**Figura 7**).

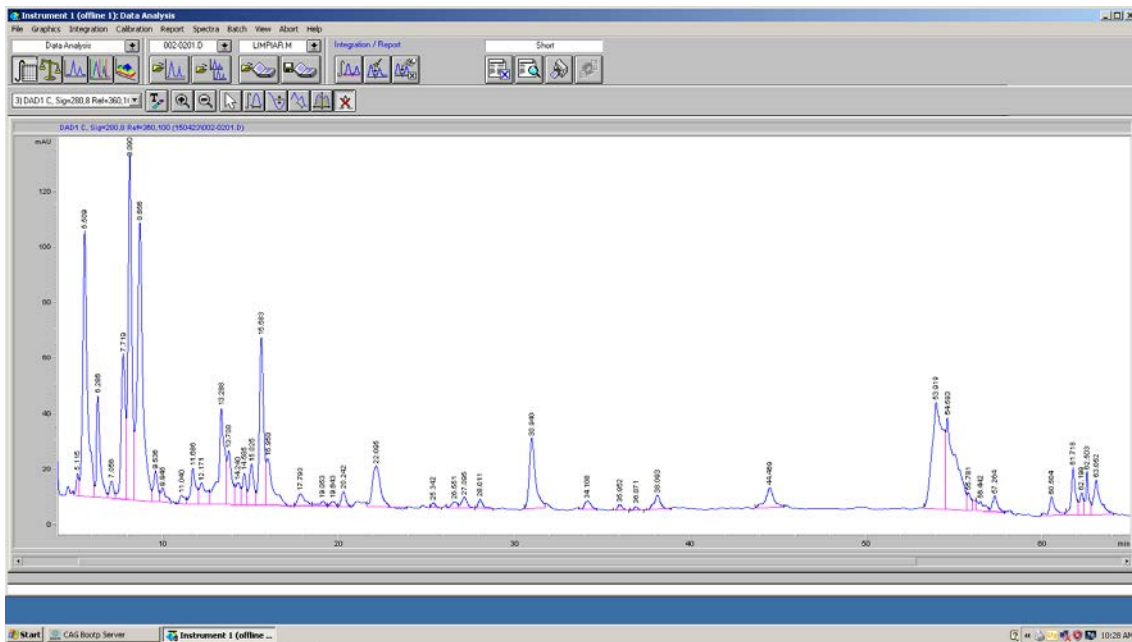


Figura 7. Cromatograma de HPLC-DAD de los polifenoles individuales de una de las cervezas elaboradas.

Se han detectado y podido cuantificar 14 picos diferentes, expresados como derivados de catequina, junto con ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzóicos, flavonoles y flavanoides. Sin embargo, en un estudio reciente (Quifer-Rada et al., 2015) se han identificado 47 compuestos fenólicos, detectado por espectrometría de masas, incluyendo ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinamoilquínicos, flavanoles, flavonoles, flavonas, aalquilmtoxifenoles, ácidos alfa e hidroxifenilacéticos iso-alfa-ácidos, y prenilflavonoides.

4.7. Amargor

En el caso de nuestras cervezas observamos como presentan unas unidades de amargor muy elevadas tras la primera semana de embotellado, alcanzando unos valores medios de 150, excepto en la cerveza 3 y 6 que oscilan los 100, y en las dos últimas (7 y 8) que son más próximas a 200 (**Figura 1**).

Sin embargo, después de un mes de embotellado las unidades de amargor de todas las cervezas se normalizan, presentando todas ellas valores cercanos a 75. Este hecho nos indica una degradación de los compuestos que otorgan amargor a la cerveza gracias a la maduración en botella. No obstante, los valores obtenidos de °BU están de acuerdo con los citados en la bibliografía y que oscilan entre 50-100 °BU

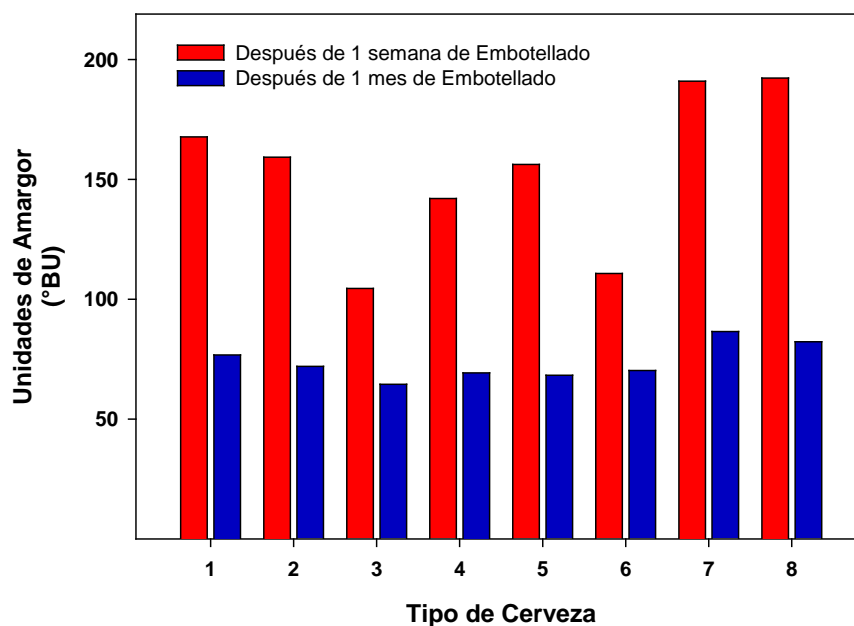


Figura 1. Valores de amargor de los distintos tipos de cervezas elaborados tras 1 semana y 1 mes en botella.

En el caso de nuestras cervezas observamos como presentan unas unidades de amargor muy elevadas tras la primera semana de embotellado, alcanzando unos valores medios de 150, excepto en la cerveza 3 y 6 que rondan los 100, y en las dos últimas (7 y 8) que son más próximas a 200.

Sin embargo, después de un mes de embotellado las unidades de amargor de todas las cervezas se normalizan, presentando todas ellas valores cercanos a 75. Este hecho nos indica una degradación de los compuestos que otorgan amargor a la cerveza gracias a la maduración en botella. No obstante, los valores obtenidos de °BU están de acuerdo con los citados en la bibliografía y que oscilan entre 50-100 °BU (Vanderhaegen et al., 2006).

Se ha comprobado que durante el envejecimiento de la cerveza en botella se produce una disminución constante en el amargor, lo que tiene influencia en sus características organolépticas ya que se incrementa el sabor dulce (Vanderhaegen et al., 2006). El lúpulo imparte el sabor típico a la cerveza debido a su contenido de aceites esenciales y resinas amargas. Además, contiene taninos y compuestos fenólicos los cuales coayudan en el proceso de clarificación (Rojas y Serna, 2000). El sabor amargo característico de la cerveza, proviene de la secreción glandular de las flores femeninas no fecundadas del lúpulo, la cual contiene dos compuestos clasificados como resinas: las humulonas o ácidos α -lupulínico y las lupulonas o ácidos β -lupulínico (Schmidt-Hebbel, 1966). Las resinas del lúpulo pueden dividirse en blandas y duras. Dentro de las blandas se encuentran los α -ácidos que son las de mayor importancia, ya que a partir de ellos se forman los compuestos que otorgan el tenor amargo. Durante la ebullición al que es sometido el mosto dulce, etapa en que se agrega el lúpulo, los α -ácidos sufren un cambio estructural llamado isomerización, originando los compuestos solubles amargos, los que se denominan genéricamente iso- α -ácidos. Los β -ácidos, considerados resinas blandas, pueden también isomerizarse durante la ebullición para crear compuestos amargos, aunque, debido a que la solubilidad de los iso- β -ácidos en el mosto es

muy baja, la contribución de éstos al sabor amargo es casi despreciable (Cerdan, 2000). Para determinar el amargor se mide la cantidad de α -ácidos extraídos del lúpulo y convertidos en sustancias amargas solubles durante la ebullición del mosto. (Swistowicz, 1977). Caballero et al. (2012) han postulado recientemente que la degradación de los iso- α -ácidos puede minimizarse evitando la acción de la luz, o mediante la adición de compuestos fenólicos con actividad antioxidante o la adición de esteroisómeros puros de cis-iso- α -ácidos.

4.8. Actividad antioxidante

Durante años en el ámbito de los alimentos se ha definido a los agentes “antioxidantes” como aquellas sustancias que en bajas cantidades actúan previniendo o retardando la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas. Basados en esta capacidad se han desarrollado distintos métodos de evaluación de la que se denomina actividad antioxidante global, generalmente basados en la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres o en la evaluación de su capacidad reductora, constituyendo el grupo de “métodos químicos”. Estos métodos aportan información muy diversa a la que aportan aquellos basados en medidas biológicas o metabólicas que determinan o evalúan capacidades antioxidantes específicas. La información que aportan ambos métodos es complementaria. De hecho, los métodos “químicos” permiten, en general, obtener buenas correlaciones entre la actividad antioxidante y la vida media de los productos, pero sólo permiten ligeras aproximaciones a sus efectos protectores de la salud, que son evaluados por los métodos biológicos. Las sustancias con actividad antioxidante presentes en la cerveza provienen esencialmente de las materias primas empleadas en su elaboración, estando ya presentes en aquellas u obteniéndose por modificación y transformación de sus constituyentes. Entre estas sustancias destacan los polifenoles, que provienen esencialmente de la cáscara de la cebada malteada y del lúpulo. (González-San José, 2010).

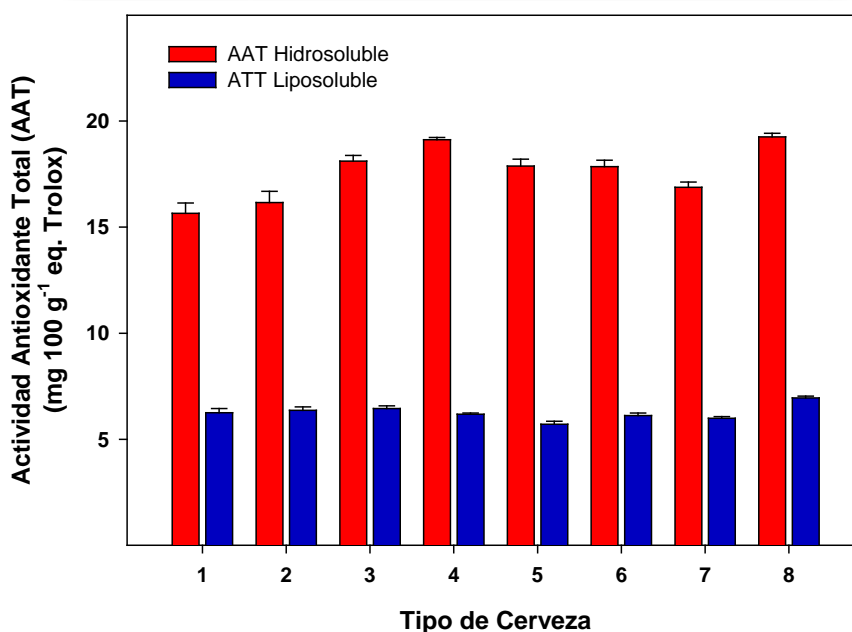


Figura 8. Actividad antioxidante (hidrosoluble y liposoluble) en los distintos tipos de cervezas elaboradas.

Las ocho muestras de cerveza realizadas para este estudio presentan una gran actividad antioxidante en la fase liposoluble, y no se aprecian diferencias significativas entre ellas (**Figura 8**). La cerveza es una mezcla compleja de sustancias bioactivas, cuyas moléculas están sometidos a muchas reacciones durante almacenamiento en botella. No obstante, se ha comprobado que el almacenamiento prolongado apenas modifica el contenido de fenoles y la actividad antioxidante (Siquiera et al., 2011).

4.9. Ácidos orgánicos

En la siguiente tabla se muestran los diferentes ácidos presentes en nuestras cervezas. Además hemos marcado en amarillo el tipo de cerveza en la que hay una diferencia considerable frente a las demás, respecto a un determinado ácido (**Tabla 2**).

Tabla 2. Concentración de ácidos orgánicos en los distintos tipos de elaboración de cerveza

Tipo ¹	Ácido orgánico (g 100 g ⁻¹)				
	Fítico	Oxálico	Cítrico	Málico	
1	0,04 ± 0,01a	0,02 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a	0,15 ± 0,01a	
2	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a	0,16 ± 0,01a	
3	0,04 ± 0,01a	0,02 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a	0,15 ± 0,01a	
4	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01a	0,10 ± 0,01b	0,18 ± 0,01a	
5	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01a	0,09 ± 0,01a	0,20 ± 0,03b	
6	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a	0,16 ± 0,01a	
7	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01a	0,07 ± 0,01a	0,15 ± 0,01a	
8	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a	0,15 ± 0,01a	
	Ácido orgánico (mg 100 g ⁻¹)				
	Pirúvico	Láctico	Fumárico	Propiónico	Isobutírico
1	133,25 ± 1,56a	29,21 ± 0,07a	3,43 ± 0,32a	0,61 ± 0,01a	3,67 ± 0,01a
2	116,36 ± 3,38b	27,32 ± 0,22a	2,88 ± 0,03b	0,55 ± 0,01b	3,67 ± 0,01a
3	151,91 ± 6,71c	24,70 ± 0,14b	2,46 ± 0,01c	0,59 ± 0,01b	3,62 ± 0,02a
4	178,67 ± 0,51d	24,96 ± 0,91b	2,06 ± 0,01d	0,53 ± 0,01b	3,78 ± 0,02a
5	85,39 ± 9,52e	32,64 ± 0,01c	3,12 ± 0,01e	0,56 ± 0,01b	3,65 ± 0,09a
6	72,26 ± 3,54e	27,81 ± 2,08a	1,98 ± 0,08f	0,54 ± 0,01b	4,01 ± 0,09b
7	85,76 ± 4,43e	28,12 ± 0,09a	3,29 ± 0,07a	0,50 ± 0,02b	3,62 ± 0,09a
8	215,82 ± 10,38f	26,25 ± 0,01a	2,81 ± 0,03b	0,44 ± 0,01c	3,58 ± 0,02a

¹Para cada ácido orgánico, letras diferentes muestran diferencias significativas a P<0,05 según el tipo de cerveza elaborada

Se puede observar como los ácidos orgánicos mayoritarios en todas las cervezas fueron el ácido málico y el ácido cítrico, cuyas mayores concentraciones se obtuvieron en las cervezas 4 y 5, que se corresponden con las de maceración simple, levadura líquida y fermentación a 25°C (cerveza 4) y maceración escalonada, levadura liofilizada y fermentación a 12°C (cerveza 5). Las concentraciones de ácidos

orgánicos obtenidos en las distintas cervezas están en concordancia con los publicados en la literatura (Montanari et al., 1999). Los 2 ácidos orgánicos mayoritarios proceden de las materias primas, parcialmente para el ácido cítrico y totalmente para el ácido málico, mientras que los ácidos orgánicos minoritarios (ácidos pirúvico, láctico, fumárico, propiónico e isobutírico) son consecuencia del proceso de fermentación.

4.10. Aromas de la cerveza

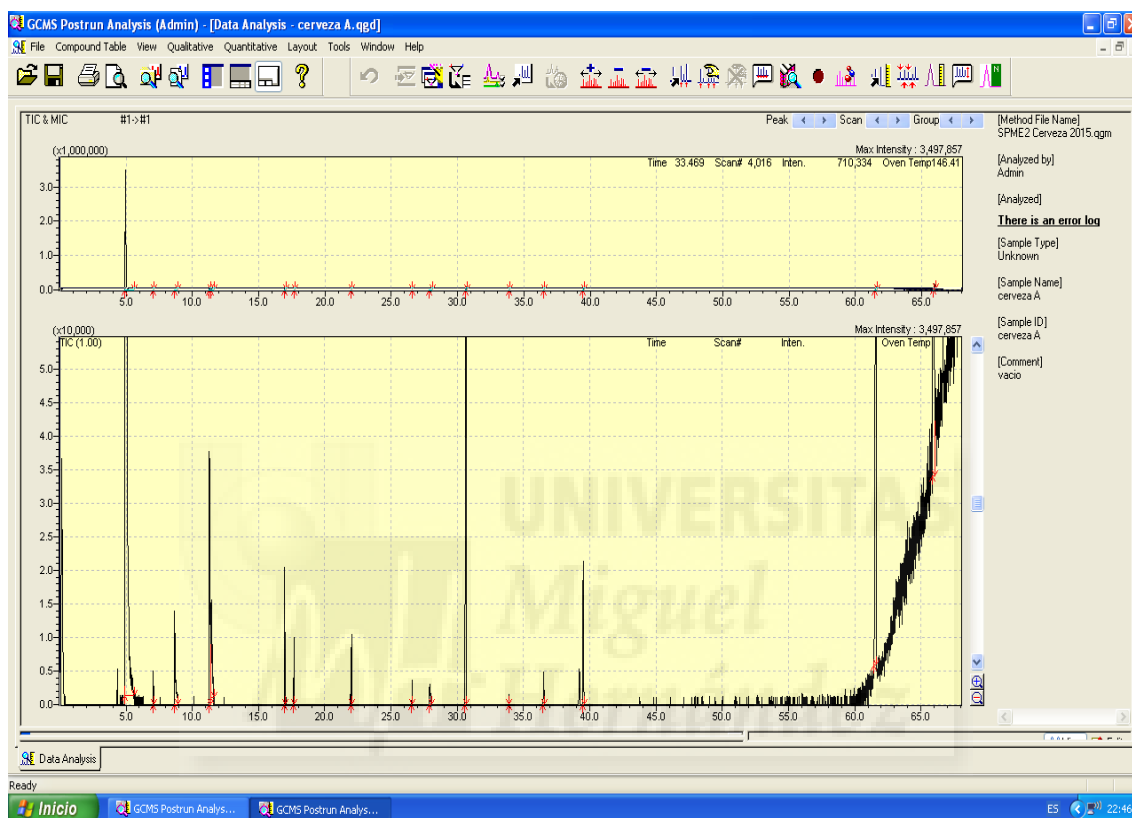


Figura 9. Cromatograma de GC-MS de los volátiles individuales que contribuyen al aroma de una de las cervezas elaboradas.

En la **Figura 9** se presenta un cromatograma con el perfil de aroma obtenido en la cerveza artesanal elaborada. De acuerdo con el cromatograma, se han identificado los siguientes compuestos (**Figura 10**).

Qualitative Table											
Print Edit View Similarity Search											
Peak#	Ret. Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	4.979	4.875	5.658	TIC	13867660	87.23	3496565	88.15	3.97	MI	etanol
2	7.055	7.033	7.092	TIC	9551	0.06	5065	0.13	1.89	MI	ethyl acetato
3	8.657	8.625	8.900	TIC	71383	0.45	13876	0.35	5.14	MI	1-butanol
4	11.294	11.258	11.400	TIC	162703	1.02	37747	0.95	4.31	MI	isoamyl alcohol
5	11.435	11.400	11.642	TIC	84342	0.53	14623	0.37	5.77	MI	amyl alcohol
6	16.964	16.925	17.042	TIC	58387	0.37	20377	0.51	2.87	MI	isoamyl acetate
7	17.682	17.650	17.717	TIC	21727	0.14	9949	0.25	2.18	MI	amyl acetate
8	22.016	21.983	22.050	TIC	16048	0.10	10423	0.26	1.54	MI	ethyl caproate
9	26.599	26.567	26.608	TIC	4701	0.03	3701	0.09	1.27	MI	linalool
10	27.952	27.842	28.083	TIC	16455	0.10	3061	0.08	5.38	MI	phenethyl alcohol
11	30.632	30.567	30.708	TIC	329393	2.07	94598	2.38	3.48	MI	ethyl caprylate (ethyl octanoate)
12	33.883	33.875	33.925	TIC	2663	0.02	1567	0.04	1.70	MI	phenethyl acetate
13	36.510	36.475	36.567	TIC	14153	0.09	4850	0.12	2.92	MI	elephantopin
14	39.503	39.450	39.575	TIC	77524	0.49	21412	0.54	3.62	MI	ethyl caprate (ethyl decanoate)
15	61.593	61.458	61.667	TIC	450858	2.84	93951	2.37	4.80	MI	lauric acid (dodecanoic acid)
16	65.948	65.850	66.058	TIC	709377	4.46	135080	3.41	5.25	MI	2,2 dimethyldecanol

Figura 10. Listado de compuestos volátiles identificados en la cerveza según el tiempo de retención.

Tabla 10. Concentración de volátiles según el tipo de cerveza elaborada.

	Simple				Escalonada				maceración levadura temperatura
	liofilizada		líquida		liofilizada		líquida		
	12	25	12	25	12	25	12	25	
	cerveza 1	cerveza 2	cerveza 3	cerveza 4	cerveza 5	cerveza 6	cerveza 7	cerveza 8	
1-butanol (Patrón interno)	116.3	64.2	56.9	84.9	88.8	103.2	57.9	58.3	(µg/L)
ethyl acetato	15.6	0.9	14.2	1.8	2.2	3.6	33.9	4.8	(µg/L)
isoamyl alcohol	265.1	69.1	89.4	48.6	104.0	83.2	68.0	96.0	(µg/L)
amyl alcohol	137.4	72.7	66.4	37.2	61.8	62.2	29.9	65.4	(µg/L)
isoamyl acetate	95.1	37.7	95.8	16.1	80.2	32.4	22.7	14.7	(µg/L)
amyl acetate	35.4	28.7	11.0	4.8	39.2	20.2	14.2	3.6	(µg/L)
ethyl caproate	26.2	60.6	31.2	0.9	29.2	8.0	12.2	3.7	(µg/L)
linalool	7.7	15.6	7.8	0.0	1.9	0.9	0.0	0.9	(µg/L)
phenethyl alcohol	26.8	2.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	(µg/L)
ethyl caprylate (ethyl octanoate)	536.8	613.0	583.6	109.6	254.4	217.4	300.5	139.7	(µg/L)
phenethyl acetate	4.3	0.0	9.7	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	(µg/L)
elephantopin	23.1	55.0	19.7	0.8	9.6	12.9	12.5	3.4	(µg/L)
ethyl caprate (ethyl decanoate)	126.3	30.3	33.2	1.8	51.9	33.2	0.9	11.7	(µg/L)
lauric acid (dodecanoic acid)	734.7	615.5	451.3	4.6	0.9	0.9	31.9	1.8	(µg/L)

Se puede observar que el principal volátil que contribuye al aroma de cerveza es el octanoato de etilo seguido de los alcoholes amílico e isoamílico, siendo el cuarto volátil en importancia el acetato de isoamilo. Este perfil aromático es similar al obtenido por otros investigadores tras la elaboración de cerveza tipo “Ale” (da Silva et al., 2015).

4.11. Análisis sensorial

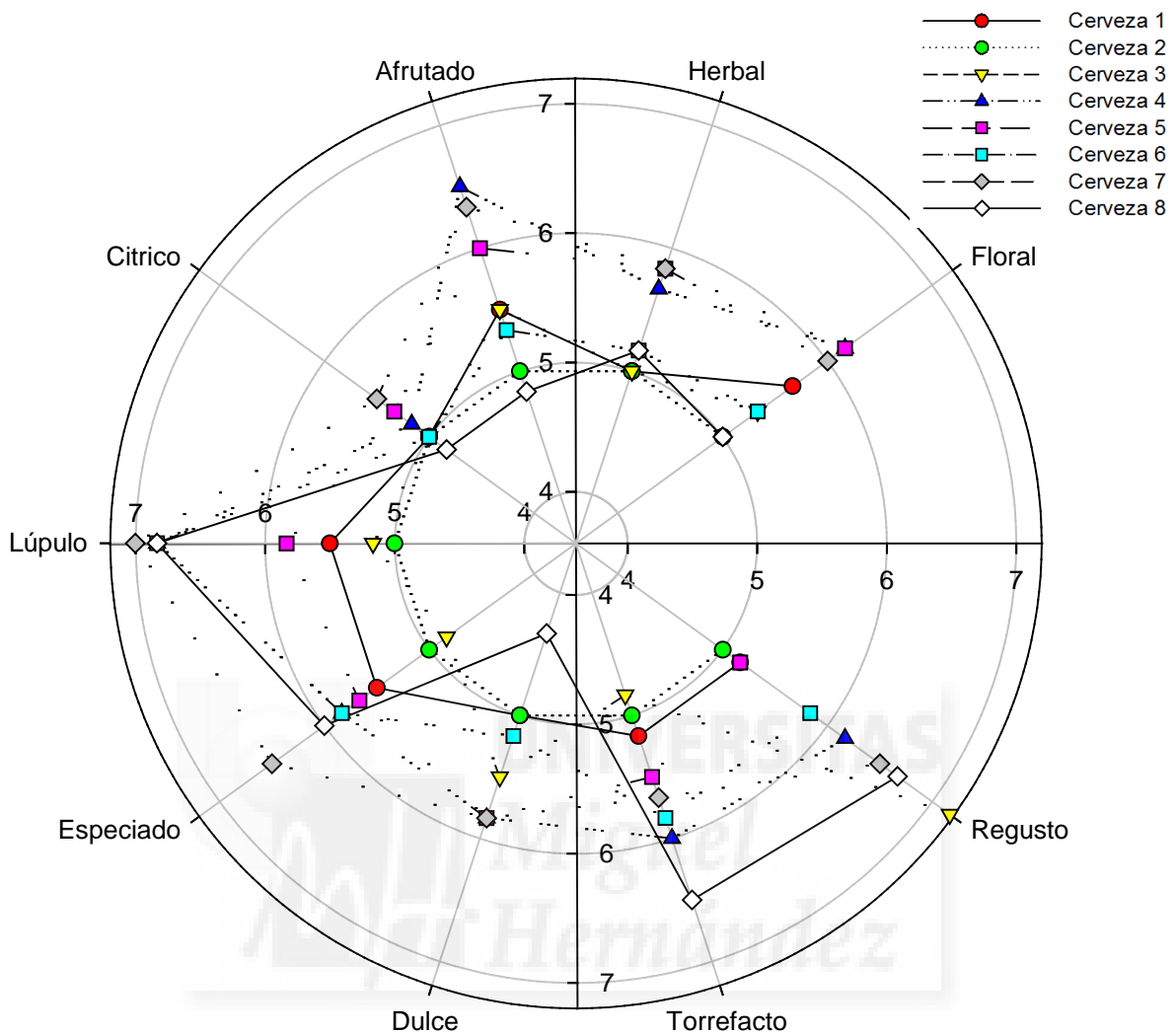
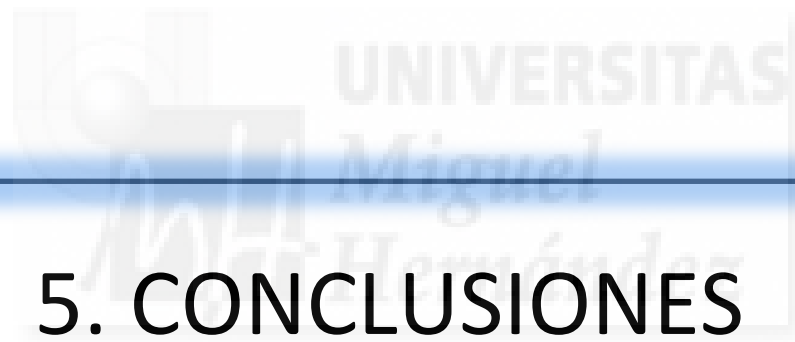


Figura 11. Resultados del análisis sensorial en las distintas cervezas elaboradas.

En este análisis sensorial se tomó como referencia la cerveza número 2, y todos sus atributos se evaluaron con una puntuación de 5. Por lo que respecta a los componentes del aroma, se puede observar como los panelistas evaluaron como mejores las cervezas 4, 5 y 7, siendo ésta última la que presentó mayor sabor a lúpulo, especiado y cítrico. En general, las cervezas peor valoradas fueron la 2 y 3.

El análisis sensorial es el examen de los atributos de la cerveza mediante los sentidos (vista, olfato, gusto y tacto), obteniendo datos cuantificables y objetivos. Es una herramienta útil para medir atributos en cerveza artesanal. En nuestro caso, y debido a la tonalidad oscura de todas las cervezas, no se evaluó el color ya que en todas ellas éste era muy similar.



5. CONCLUSIONES

Primera. Se han elaborado 8 tipos de cerveza teniendo en cuenta 2 tipos de maceración (simple y escalonada), dos tipos de levadura (líquida y liofilizada) y dos temperaturas de fermentación (12 y 25°C).

Segunda. Los valores finales de densidad, pH, acidez, grado alcohólico, color, fenoles totales y actividad antioxidante fueron similares en las 8 cervezas, no existiendo diferencias significativas entre ellas.

Tercera. Las cervezas almacenadas en botella durante un mes perdieron de forma significativa las unidades de amargor (°BU), con unos valores medios de pérdidas del 50%.

Cuarta. Se han analizado los compuestos fenólicos individuales por HPLC-DAD y se han encontrado 14 picos diferentes, que se corresponden con derivados de catequina, ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzóicos, flavonoles y flavanoides.

Quinta. Se han analizado los compuestos volátiles que contribuyen al aroma mediante GC-MS, siendo el octanoato de etilo el mayoritario seguido por los alcoholes amílico e isoamílico y acetato de isoamilo.

Sexta. Teniendo en cuenta los resultados de forma global y especialmente los obtenidos en el análisis sensorial y perfil aromático, la cerveza nº 7 posee la mayor aceptación organoléptica. Por tanto, las condiciones de maceración escalonada, el uso de levadura líquida y una temperatura baja de fermentación ha resultado la combinación óptima para la elaboración de estas cervezas.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro Rodríguez H. 2003. Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager, Elaborada por Compañía Cervecería Kunstmann S.A.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73, 239-244.
- Barnes, S. 1995. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J. Nutr.* 125: 777S-783S.
- Caballero, I., Blanco, C.A., Porrás, M. 2012. Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends Food Sci. Technol.*, 26, 21-30.
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L. 1998. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* 128, 2383-2390.
- Código Alimentario Español. Decreto 2484/1967, modificado en 2012. BOE nº 16485.
- Craig, W.J. 1996. Phytochemicals: guardians of our health. *J. Am. Diet. Assoc.* 97: S199-S204.
- Curioni A., Pressi G., Furegon L., Peruffo A. D. B. 1995. Major proteins of Beer and their precursors in barley: Electrophoretic and immunological studies. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2620-2626.
- Dvořáková, M., Hulín, P., Karabín, M., Dostálek, P. 2008. Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech J. Food Sci.* 25. 182-188.
- Erlend, A., Townsend, J.P., Adams, R.I., Nielsen, K.M., Taylor, J.W. 2006. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS.* 702-715.
- Ferrán-Lamich, J. (2002). Cebada variedades cerveceras y cerveza. Barcelona: Editorial Aedos.
- González-San Jose, M.L., Muñiz, P., Valls, V. 2001. En: *Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo*. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud. Monografía.
- Herman, C., Adlercreutz, H., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Höckerstedt, K.A.V., Watanabe S. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* 125: 757S-770S.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Bucina, R., Fidanza, F. 1995. Flavonoid intake in long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch. Intern. Med.* 155: 381-386.
- Hoche, S., Hussein, M.A., Becker, T. 2014. Critical process parameter of alcoholic yeast fermentation: speed of sound and density in the temperature range 5-30 °C. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49: 2441-2448.
- Hough, S. J. 2001. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Hughes, P. 2003. Cerveza: Calidad, higiene y características nutricionales. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- Kunze, W. 1996. Technology Brewing and Malting. Verlagsabteilung: Editorial VLB Berlín.
- López, A., García, G.M., Quintero, R.R., López-Munguía A., Canales, I. 2002. Biotecnología alimentaria. México: Editorial Limusa. pp. 263-312.
- Mazza, G.A. 2000. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesados. Zaragoza: Ed Acribia.
- Meltzer, H.M., Malterud, K.E. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scan. J. Nutr.* 1997; 41: 50-57.

- Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Heyerick, A., De Cooman, L., Rong, H., De Keukeleire D. 2002. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*. 123: 235-42.
- Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., Fantozzis, P. 1999. Organic and phenolic acids in beer. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 32, 535-539.
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. 2015. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* 169, 336-343.
- Siebert, K. 1999. Effect of protein-polyphenol interactions on beverages haze, stabilisation and analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47, 353 - 362.
- Sharp, D. C., Townsend, M. S., Qian, Y., & Shellhammer, T. H. 2014. Effect of harvest maturity on the chemical composition of Cascade and Willamette Hops. *J. Amer. Soc. Brewing Chem.* 72, 231-238.
- Silva F., Nogueira L. C., Gonçalves C., Ferreira A. A., Ferreira I., Teixeira N. 2008. Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Food Chem.* 106, 820-829.
- Siqueira, P.B., Bolini, H.M.A., Macedo, G.A. 2011. Polyphenols and antioxidant properties in forced and naturally aged Brazilian Beer. *J. Brewing Distil.* 2, 45-50.
- Steiner E, Gastl M, Becker T. 2011. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: A review. *Eur Food Res Technol.* 232, 191-204.
- Stevens, J.J., Taylor, A.W., Deinzer, M.L. 1999. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A* 832, 97-107.
- Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B., Kader A.A. 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4748-4760.
- Treimo J., Aspomo S. I., Eijnsink V. G. H., Horn S. J. 2008. Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grain. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5359-5365
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. 2006. The chemistry of beer aging – A critical review. *Food Chem.* 95, 357-381.
- Varnan, A.H., Sutherland, J.P. 1997. *Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología*. Zaragoza: Editorial Acribia. España. pp. 307-372.
- Weller R. 2006. *Documental: La cerveza, el mundo en un vaso*.

Páginas Web

- Asociación Cerveceros de España. (<http://www.cerveceros.org/>) (Julio, 2015)
- Asociación Española de fomento del Lúpulo. (Julio, 2015)
- Asociación Malteros de España. (Julio, 2015)
- Cerveza y Salud (www.cervezaysalud.es) (Julio 2015)
- Cerveza de Argentina (<http://www.cervezadeargentina.com.ar/>) (Julio, 2015)
- Club de las grandes cervezas del mundo. <http://www.cervezasdelmundo.com> (Julio 2015)
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (Julio, 2015)