

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA  
ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

CURSO 2017-2018

**APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MEJORA DE LA FUNCIONALIDAD  
DE LA CERVEZA ARTESANA**



**AUTORA:**

NATALIA VICENTE MONTERO

**TUTOR:**

DANIEL VALERO GARRIDO

## RESUMEN

Debido al creciente interés de los consumidores en los productos artesanos y con propiedades funcionales que resulten beneficiosas para la salud humana, en este proyecto se ha desarrollado un posible producto comercial, al cual se ha bautizado como Brocolipa, que pretende cumplir con las expectativas de este nuevo grupo de consumidores más conscientes de la importancia de la nutrición en la salud.

En este trabajo se ha analizado el efecto de la adición de brócoli en polvo en tres concentraciones, 1%, 5% y 10% (p/p), y en tres fases distintas del proceso de fermentación, sobre las propiedades organolépticas y el contenido de polifenoles totales en la elaboración de cerveza artesana. Para este fin, se han valorado los parámetros de calidad de densidad, color (unidades EBC), amargor (unidades IBU), pH, acidez, porcentaje de alcohol (v/v) y densidad. Asimismo, como indicador de las propiedades funcionales del producto elaborado, se ha determinado la concentración de polifenoles totales de la cerveza obtenida.

**Palabras clave:** cerveza, brócoli, polifenoles, artesana, alimentos funcionales.

## ABSTRACT

Due to the increasing interest of the consumers in the artisan products and with functional properties that turn out to be beneficial for the human health, in this project there has developed a possible commercial product, to which it has been baptized as Brocolipa, that tries to fit with the expectations of this new increasing group of conscious consumers of the importance of the nutrition in health.

This work analyzes the effect of the addition of lyophilized broccoli in three different concentrations, 1 %, 5 % and 10 % (w/w), and in three different phases of the fermentation process, on the organoleptic properties and the content of total polyphenols in the production of artisan beer. Chasing this purpose, quality parameters of density, color (°EBC), bitterness (°IBU), pH, acidity, percentage of alcohol (v/v) and density were valued. Likewise, the total polyphenol content in the beer was also valued as an indicator of the functional properties of the elaborated product.

**Key words:** beer, broccoli, polyphenols, artisan, functional foods.

# APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MEJORA DE LA FUNCIONALIDAD DE LA CERVEZA ARTESANA

---

## ÍNDICE

### 1 INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la cerveza.....	5
1.2 Definición.....	7
1.3 Materias primas.....	7
1.4 Composición nutricional de la cerveza.....	13
1.5 Proceso de elaboración.....	14
1.6 Tipos de cerveza.....	17
1.6.1 India Pale Ale.....	17
1.7 Tendencias de consumo actuales.....	18
1.8 Alimentos funcionales.....	19
1.9 Brócoli.....	20

### 2 OBJETIVOS.....25

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.....	26
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Proceso de elaboración.....	27
3.2.2 Adición del brócoli.....	29
3.2.3 Recogida de muestras.....	30
3.2.4 Adición del licor de tiraje.....	30
3.2.5 Embotellado.....	31
3.3 Determinaciones de laboratorio.....	31
3.3.1 Densidad.....	31
3.3.2 Graduación alcohólica.....	32
3.3.3 pH.....	32
3.3.4 Acidez.....	33
3.3.5 Color.....	34
3.3.6 Amargor.....	35
3.3.7 Polifenoles totales.....	36
3.4 Cata de la cerveza.....	38

<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1	Densidad.....	38
4.2	Graduación alcohólica.....	39
4.3	pH.....	39
4.4	Acidez.....	40
4.5	Color.....	41
4.6	Amargor.....	41
4.7	Polifenoles totales.....	42
4.8	Cata de la cerveza.....	45
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>57</b>



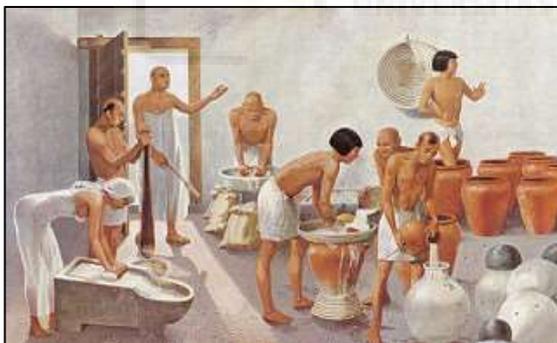
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 HISTORIA DE LA CERVEZA

Con una historia milenaria y en constante evolución, la cerveza es la bebida alcohólica conocida más antigua del mundo. A pesar de que el consumo de alcohol y las actitudes sociales asociadas a este varía de unas culturas a otras, casi todas las civilizaciones han descubierto el proceso de elaboración de la cerveza.

Los orígenes de esta bebida se remontan al menos 5.000 años antes de Cristo, durante el asentamiento de las primeras civilizaciones. En lo que fue Mesopotamia, se hallaron restos arqueológicos de vasijas utilizadas para elaborar cerveza primitiva por parte de la civilización Sumeria, las características físicas de estas vasijas, muescas interiores y cuellos estrechos, revelan el conocimiento de los fundamentos de la fermentación por parte de estas civilizaciones, facilitando la retención de la levadura en las muescas, posibilitando así sucesivas fermentaciones e impidiendo la oxigenación mediante el estrechamiento los cuellos de las vasijas en las que se elaboraba la cerveza (1).

En el antiguo Egipto (Fig.1) la cerveza formaba parte de la dieta diaria de todos los estratos sociales, en una cultura basada en el cultivo de cereales el malteado era un proceso conocido y utilizado como una constante en la elaboración de las primeras cervezas (2).



**Fig.1** Antiguo Egipto (H.M Herget).



**Fig.2** Vasija Azteca para Pulque (Foto de Maunus/Wikimedia Common).

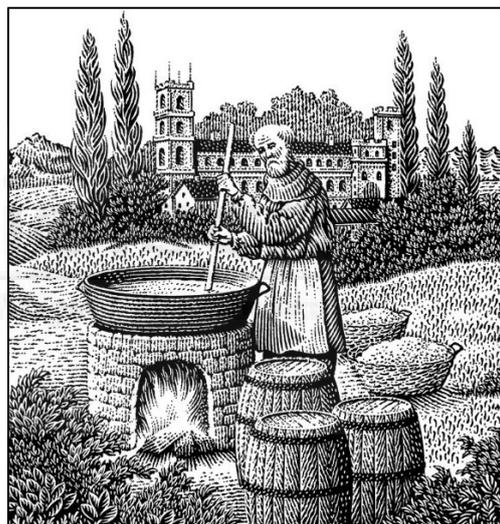
A pesar de que en estas culturas hallamos las primeras evidencias de lo que hoy conocemos como cerveza, su elaboración ha surgido en varios puntos del mundo, en ocasiones de forma simultánea, como consecuencia del cultivo de cereales y otros acontecimientos, dando como resultado distintas versiones de esta bebida. De este modo, los Aztecas tenían el “Pulque” (Fig.2), una bebida a base de granos de maíz fermentados con levaduras salvajes autóctonas de Mesoamérica, de una consistencia más espesa que las anteriores. En China también se han hallado recetas de cerveza que datan de entre

3500-2900 a.C, (3) estas se producían a partir de mijo, cebada y algunos tubérculos (Fig.3). Las diferentes culturas aromatizaban sus elaboraciones con distintos ingredientes, especias y hierbas, el uso de mirto, salvia, menta y miel era habitual, pero fue la introducción del lúpulo con su poder clarificante y aroma característico, lo que marcó el punto de inflexión entre la cerveza primitiva y la moderna.

Si queremos remontarnos al origen de la cerveza en Europa (2, 4) (Fig.4) algunas fuentes apuntan a Grecia, sus redes comerciales con Egipto y otras regiones mediterráneas importaron la cerveza como la bebida de las clases populares, frente al consumo de vino que se consideraba propio de las clases altas. Posteriormente, durante el control del Imperio Romano en Europa, se impuso la elaboración de vino en detrimento de la cerveza, aunque aún era habitual su consumo. En las regiones más frías, en las que era difícil el cultivo de la vid, la cerveza seguía siendo elaborada por parte de los llamados pueblos “bárbaros”, celtas y nórdicos del norte de Europa.



**Fig.3. Restos arqueológicos hallados en la provincia china de Shaanxi.**



**Fig. 4. Monje europeo elaborando cerveza. (Ilustración de Michael Halbert)**

Sin embargo, el origen de esta bebida en las distintas regiones del viejo continente no está claro, se han descubierto restos arqueológicos que datan de 2.400 a.C que situaban el origen de la cerveza más antigua de Europa en el Valle de Ambrona, Soria (5), pero actualmente se sitúa en 3.800 a.C en el período Neolítico gracias al hallazgo de restos de utensilios usados en la elaboración de cerveza en la cueva de Can Sadurní en Begues, Barcelona (6). Todos estos datos confirman la relación milenaria que poseen las distintas civilizaciones con la elaboración de la cerveza, y más allá de la relevancia que cada uno le otorgue a sus orígenes, no se puede negar la importancia económica y social que la cerveza ha representado para ellas.

## 1.2 DEFINICIÓN

La normativa que regula en España la producción de la cerveza y las bebidas de malta se recoge en el *Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*. Este texto define la cerveza como “Alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales.”

Por otro lado, es necesario hacer una distinción especial a la cerveza de fabricación artesana, la cual es aquella cuyo proceso de elaboración ha de desarrollarse íntegramente en la misma instalación y en el que la intervención personal constituye el factor predominante, siempre y cuando se haga bajo la supervisión de un maestro cervecero o artesano, prevaleciendo en su fabricación el factor humano sobre el mecánico, obteniéndose un resultado final único y, por tanto, que no puede elaborarse en grandes cantidades (7).

## 1.3 MATERIAS PRIMAS EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA

### 1.3.1 Malta

Hay muchos cereales que pueden ser malteados, entre ellos la cebada es el más empleado, ya que su uso se ha impuesto frente al uso de otros granos como el maíz, trigo, sorgo, etc. La cebada que se usa en la producción de la malta destinada a la elaboración de cerveza es rica en almidón, el cual se hidroliza para dar lugar al sustrato fermentable por las levaduras, y también es rica en proteínas, por lo que aporta la concentración necesaria de aminoácidos para asegurar el correcto desarrollo de la población microbiana.

La cebada, *Hordeum vulgare*, pertenece a la Familia *Poaceae*, se trata de una planta anual de entre 20 y 120 cm de altura con inflorescencias en espiga, con tres espiguillas en cada nudo del raquis, endémica de las regiones de Oriente Próximo y del Mediterráneo, donde se domesticó durante el Neolítico. La cebada puede crecer en una gran amplitud climática, tolera las bajas temperaturas y es resistente a la escasez hídrica, aunque sí requiere agua al inicio de su desarrollo, también presenta una resistencia variable a la salinidad y la acidez de los suelos.

Las especies de cebada se distinguen por el número de espiguillas, existen dos tipos de cebada: la cebada de dos carreras (*Hordeum distichon* L.) que es la que se usa para la obtención de cerveza principalmente porque contiene mayor cantidad de almidón y menos proteínas, y la cebada de seis carreras (*H. hexastichon*), la cual se emplea principalmente como forraje en alimentación animal. (8)

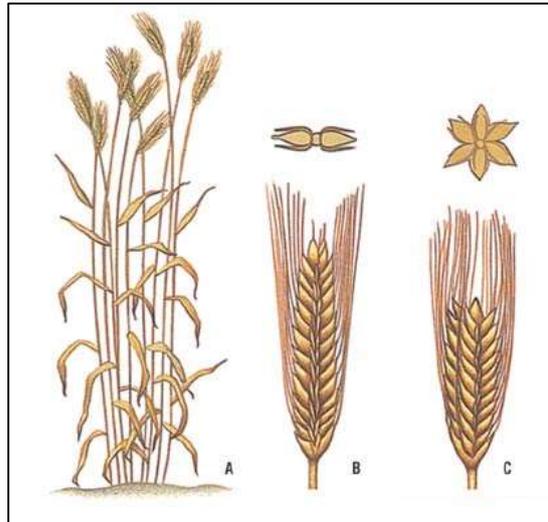


Fig. 5. A: *H. vulgare* L. B: *H. distichon* L. C: *H. hexastichon*.

El almidón contenido en los granos de cereal, constituye la reserva energética principal de las semillas de cereal y puede encontrarse en dos formas: formando una estructura lineal denominada amilosa y que constituye aproximadamente el 20% del total de almidón, y otra que se encuentra ramificada y que recibe el nombre de amilopectina y que constituye el resto de las reservas de almidón del grano.

La amilosa está constituida por cadenas largas formadas por alrededor de 1.000-2.000 unidades de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos de tipo 1,4, mientras que la amilopectina está formada por cadenas cortas de entre 24 y 30 moléculas de glucosa, las cuales forman un esqueleto principal del cual parten ramificaciones constituidas por otras cadenas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos de tipo 1,6. (9)

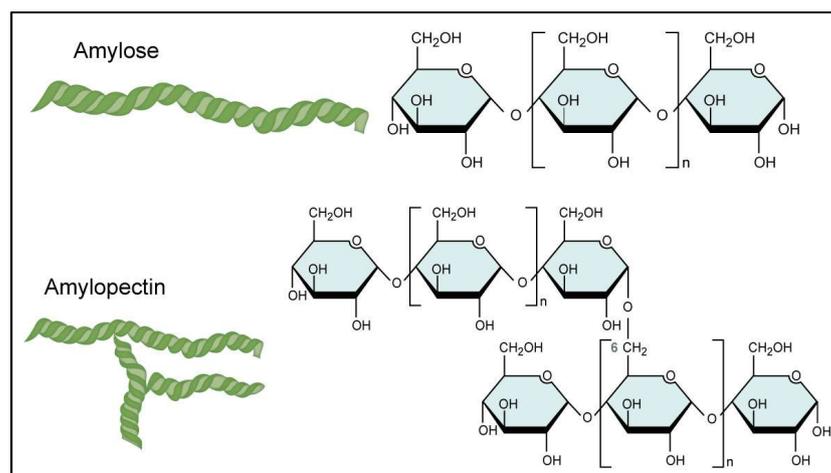


Fig.6. Estructura química de las moléculas de Amilosa y Amilopectina.

Los hidratos de carbono más simples, como los disacáridos y monosacáridos, son la principal fuente de energía de la mayor parte de los seres vivos, estas moléculas, como ya se ha mencionado, pueden encontrarse en forma de monómeros o unidas entre sí, o a otras moléculas, para formar cadenas o polímeros. Los azúcares simples más relevantes que se encuentran en los granos de cereal usados en la elaboración de cerveza, y, por tanto, que son susceptibles de ser fermentados por las levaduras son: la maltosa, disacárido formado por dos moléculas de glucosa, la sacarosa, formada por una molécula de glucosa unida a una molécula de fructosa, y la maltotriosa, que es un trisacárido formado por tres moléculas de glucosa. Tanto la glucosa, como la maltosa y la maltotriosa son productos generados por la escisión enzimática de los enlaces de las cadenas de almidón que tiene lugar durante el proceso del malteado.

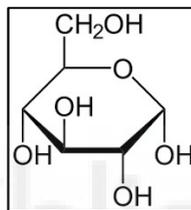


Fig. 7. Glucosa.

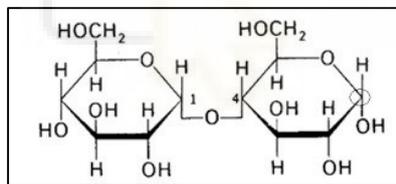


Fig.8. Maltosa.

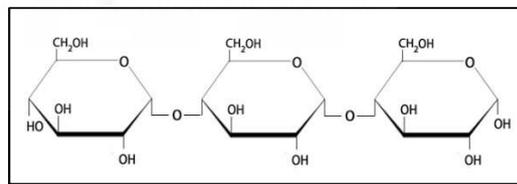


Fig.9. Maltotriosa.

### 1.3.2 Lúpulo

El *Humulus lupulus*, es una enredadera perenne y trepadora de la Familia *Cannabaceae* originaria del hemisferio norte. Es una planta muy resistente a las bajas temperaturas, su crecimiento es óptimo en climas frescos y húmedos con veranos templados con temperaturas entre 16 y 18°C. En estado silvestre crece a orillas de los ríos y el borde de los caminos.



**Fig.10.** *Humulus lupulus*. Ilustración de Debra Cooper.

El lúpulo se cultiva por sus inflorescencias femeninas, denominadas conos, los cuales contienen la lupulina que es un polvo aromático y resinoso que se utiliza principalmente en la industria cervecera (10). La lupulina contiene entre un 12% y un 14% de ácidos amargos ( $\alpha$ -ácidos y  $\beta$ -ácidos), muy apreciados en la elaboración de cerveza porque limitan el crecimiento de microorganismos, aportan amargor y contribuyen a la formación de espuma, entre estos los más conocidos son la humulona y la lupulona. Entre sus componentes también se encuentran los aceites esenciales volátiles, monoterpenos y sesquiterpenos que confieren aroma a la cerveza y taninos, que contribuyen a la estabilización, al igual que los ácidos, a la clarificación y a la formación de espuma (11). Aunque se cultiva principalmente para la industria cervecera, el lúpulo también se utiliza en la industria farmacéutica y cosmética, y también en la alimentación animal.

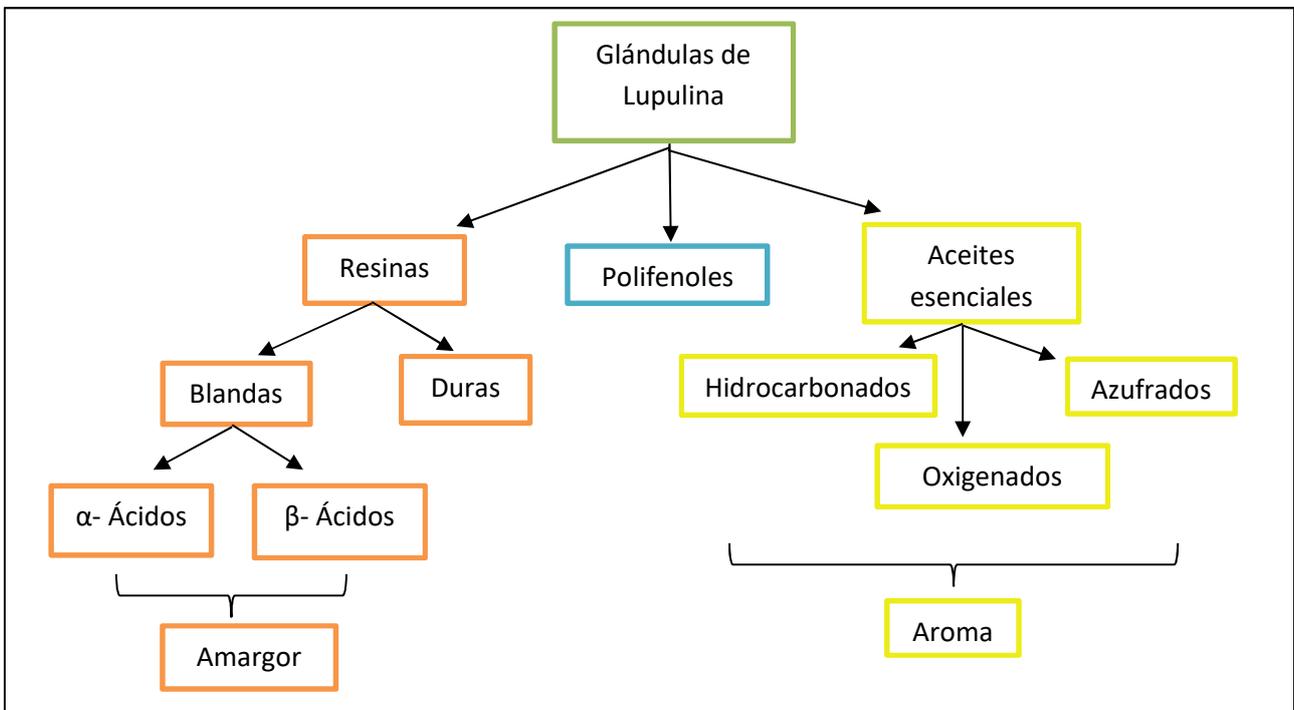


Fig. 11. Esquema de la composición de la secreción de las glándulas de lupulina presentes en las plantas de *H. lupulus*.

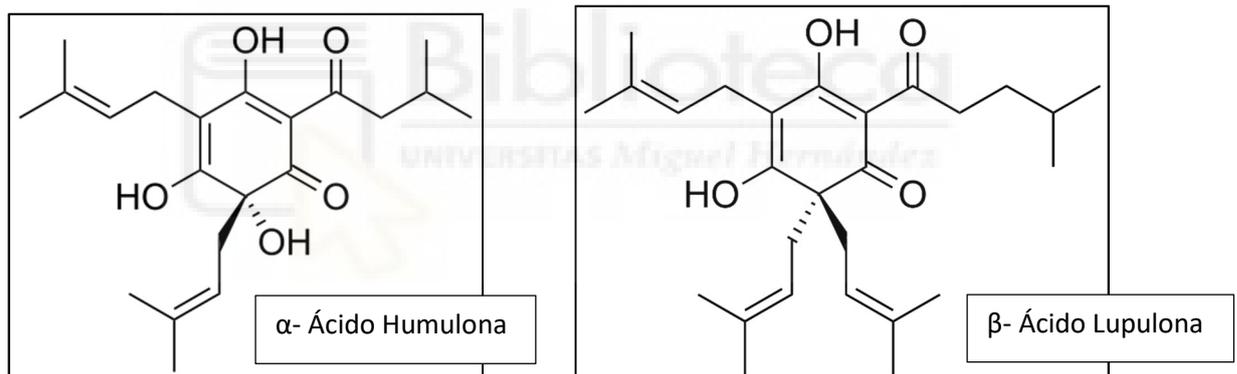


Fig. 12. Estructura química de los principales ácidos amargos del lúpulo, Humulona y Lupulona.

### 1.3.3 Levadura

La levadura es la responsable del proceso de fermentación del mosto y su transformación en cerveza. El género de levadura que se utiliza en la elaboración de cerveza es *Saccharomyces spp.*, tradicionalmente se conocen dos tipos de *Saccharomyces* para este propósito: *Saccharomyces carlsbergensis* empleada para las cervezas de baja fermentación, y *Saccharomyces cerevisiae* para las de alta fermentación. En la actualidad ambas están clasificadas como *S. cerevisiae*, sin embargo, aquellas levaduras que se utilizan para la fermentación baja se las denomina *S. cerevisiae uvarum*.

Las levaduras son hongos unicelulares, por lo que se clasifican como células eucariotas y abarcan multitud de géneros y especies distintas, desde simbioses de

plantas hasta comensales, comensales y patógenos oportunistas de animales y plantas.

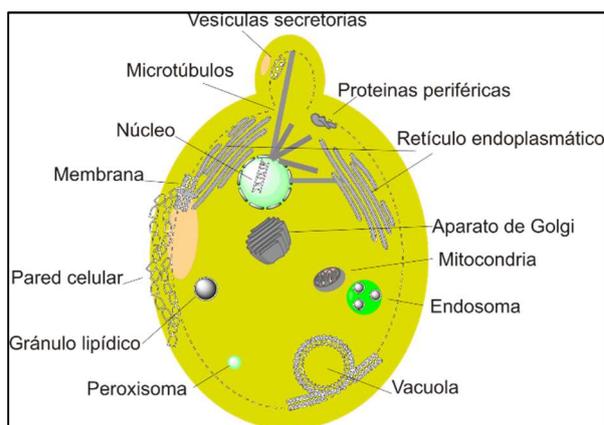
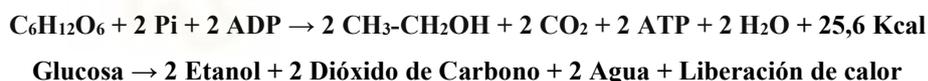


Fig. 13. Morfología general de una célula de levadura.

Las levaduras utilizan los hidratos de carbono presentes en el medio como fuente de energía a través de distintas rutas metabólicas que los transforman en distintos productos tales como etanol, dióxido de carbono y energía en forma de ATP.

La fermentación alcohólica es un proceso metabólico anaerobio en el que las levaduras descarboxilan el piruvato obtenido durante la ruta de Embden-Meyerhof o glucolisis, dando como producto acetaldehído, el cual se reduce a etanol produciendo también dióxido de carbono. La reacción global se resume a continuación:



El crecimiento de la población de levaduras también genera otros metabolitos como el ácido láctico, el ácido succínico o el glicerol, además de otros productos del metabolismo como ésteres, aldehídos y alcoholes secundarios.

En la elaboración de cerveza se pueden distinguir dos tipos de fermentación en función del tiempo, temperatura y especie de levadura empleada:

- **Alta fermentación:** la fermentación principal se desarrolla a una temperatura de entre 18° y 24 °C durante 3 o 4 días, las elevadas temperaturas favorecen la producción de ésteres deseables porque pueden aportar notas frutales, pero también se producen alcoholes secundarios no deseables. Transcurridos los tres días, el mosto se enfría gradualmente, por lo que al final, el metabolismo de la levadura es muy bajo y las células tienden a flotar en la parte superior de la cerveza. Este tipo de cervezas incluye las cervezas Ale, Stout y Porter entre otras.

- **Baja Fermentación:** La fermentación principal tiene lugar entre los 7° y los 14°C y se desarrolla a lo largo de 3 a 5 días, después se disminuye la temperatura hasta alcanzar los 0°C, por lo que la fermentación secundaria se torna un proceso mucho más lento que en el caso anterior. Este tipo de fermentación a bajas temperaturas favorecen la producción de diacetilo que es apreciable en el sabor a caramelo o mantequilla, aceptable si se encuentra a bajas concentraciones. Entre las cervezas de baja fermentación se encuentran las Lager, Pilsener y Bock (12).

### 1.3.4 Agua

El agua constituye elemento más abundante de la cerveza y su calidad influirá en el resultado obtenido. Las distintas aguas, dependiendo de la zona geográfica, tienen características físicoquímicas distintas en función de su composición y la concentración de las diferentes especies químicas que contengan tales como sulfatos, cloruros, bicarbonatos, fosfatos, etc. Por tanto, no todas las aguas serán igualmente adecuadas para la elaboración de los distintos tipos de cerveza.

## 1.4 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA CERVEZA

La cerveza es una bebida con un elevado valor nutricional y que puede utilizarse como base ideal para la elaboración de nuevos alimentos funcionales. Las principales características nutricionales de la cerveza se recogen en las siguientes tablas (13):

	Litro de cerveza		Litro de cerveza
<b>Energía (kcal)</b>	150-450	<b>Biotina (µg)</b>	2-15
<b>Proteínas (g)</b>	3-5	<b>Calcio (mg)</b>	40-140
<b>Carbohidratos(g)</b>	0-61	<b>Fósforo (mg)</b>	90-400
<b>Vitamina C (mg)</b>	30	<b>Magnesio (mg)</b>	60-200
<b>Tiamina (mg)</b>	0,003-0,08	<b>Potasio (mg)</b>	330-1.100
<b>Riboflavina (mg)</b>	0,02-0,8	<b>Sodio (mg)</b>	40-230
<b>Niacina (mg)</b>	3-8	<b>Hierro (mg)</b>	0,1-0,5
<b>Vitamina B6 (mg)</b>	0,07-1,7	<b>Zinc (mg)</b>	0,01-1,48
<b>Folatos (µg)</b>	40-600	<b>Selenio (mg)</b>	0,4-7,2
<b>Vitamina B12(µg)</b>	3-30		

Tabla 1. Composición nutricional de la cerveza.

El contenido de algunos de los componentes funcionales más importantes de la cerveza, como son los distintos compuestos fenólicos varía notablemente entre los distintos tipos de cervezas, tal y como se indica en la siguiente tabla (14):

	RUBIAS	SIN	NEGRAS	ESPECIALES
<b>Polifenoles Totales (mg/L)</b>	482,2	263,2	610,1	620,0
<b>Proantocianidinas (mg/L)</b>	93,54	95,46	113,65	162,63
<b>Catequinas (mg/L)</b>	21,85	12,60	30,99	22,18
<b>Azúcares reductores (mg/L)</b>	8,63	17,52	8,23	12,40

**Tabla 2. Valores medios de las familias fenólicas indicadas y de los azúcares reductores totales por grupos de cervezas.**

## 1.5 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

Para elaborar esta bebida se requieren cuatro ingredientes básicos, que son: el agua, la malta de cebada y/u otros cereales, la levadura y el lúpulo. Son las variaciones del tratamiento, las variedades y concentraciones de estos cuatro ingredientes las que permiten la elaboración de una enorme variedad de cervezas.

Los pasos básicos que deben seguirse para producir cerveza son los que se detallan a continuación:

1. **Malteado:** los cereales seleccionados para la elaboración de la cerveza han de seguir un procesado denominado malteado, que consiste en la limpieza, remojo y germinación de los granos y, posteriormente desecación y tostado de los mismos. El principal objetivo del malteado es aumentar la actividad enzimática de los granos, principalmente amilolítica. Antes del malteado, los granos de cebada poseen pocos azúcares fermentables, los cuales aumentan tras el malteado. Las enzimas que se sintetizan principalmente durante este proceso y que tienen mayor interés son las amilasas, alfa-glucosidasas, glucanasas, proteasas y las pentosanasas.
2. **Molturado:** La materia prima utilizada ha sido grano entero de cebada malteada, por lo que ha sido necesario un proceso de molturado para disgregar mecánicamente la estructura del grano y permitir el mejor acceso a los componentes fermentables.

- 3. Obtención del mosto:** a partir de la malta previamente molida se obtiene el mosto mediante un proceso de extracción por sacarificación enzimática, el cambio más importante que tiene lugar durante el proceso de macerado es la transformación del almidón en azúcares fermentables, las enzimas más relevantes en este proceso son las alfa y beta amilasas que convierten el 80% del almidón disponible en maltosa y maltotriosa (15). El siguiente paso es la filtración y después, la adición del lúpulo en esta fase y/o en fases posteriores, prosiguiendo con el proceso de cocción. Tras la extracción de los componentes de interés del lúpulo y los componentes aromáticos, se procede a refrigerar el mosto.
- 4. Clarificación, enfriamiento y aireación del mosto:** para clarificar el mosto de forma artesanal se realiza un movimiento circular rápido con una pala o instrumento similar, esto se conoce como “Whirpooling”, lo que permite que las partículas en suspensión precipiten en el centro del tanque o cuba disminuyendo la turbidez del mosto. Tras la clarificación, es muy importante el enfriamiento rápido del mosto para evitar el crecimiento bacteriano y su aireación, para que se den las condiciones ambientales ideales para la fermentación por parte de las levaduras.
- 5. Fermentación del mosto:** al mosto cervecero ha de adicionársele levadura seleccionada del género *Sacharomyces*, las especies seleccionadas variarán en función del producto final que se quiera conseguir, así como las condiciones ambientales a las que vaya a estar sometido el mosto durante el proceso de fermentación. Por ejemplo, tradicionalmente se ha usado la especie *S. cerevisiae* en la elaboración de cervezas tipo Ale, mientras que la especie *S. pastorianus* suele emplearse en la producción de cervezas tipo Lager. Tras la adición de la levadura el mosto se somete al proceso de fermentación, el cual puede ser fermentación alta o fermentación baja.
- 6. Maduración y Clarificación:** la cerveza obtenida tras el proceso de fermentación se someterá a un período de maduración en bodega que permite la modificación del sabor y el aroma y, si se requiere, también puede someterse a un segundo proceso de clarificación.
- 7. Envasado:** el embotellado de la cerveza se realiza, a gran escala, después de un proceso de pasteurización, aunque también puede realizarse después, una vez dentro del envase (16).

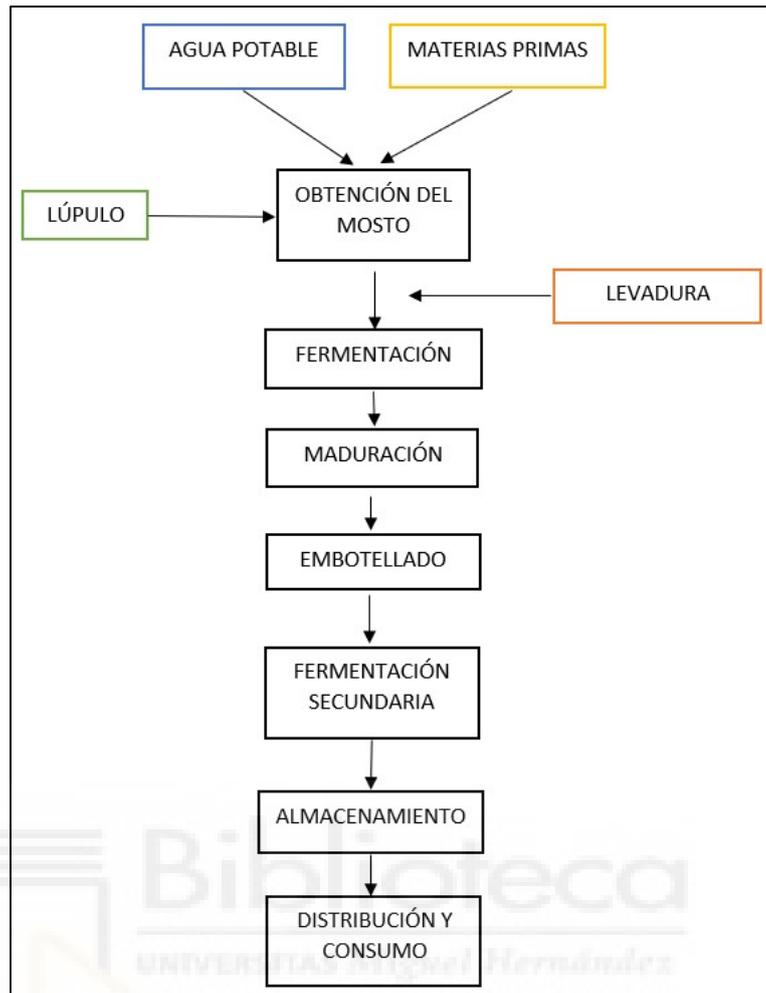


Figura 14.. Proceso de elaboración de cerveza artesana.

Según la normativa vigente (7), en función de las características que presente en cuanto al contenido de malta de cebada y alcohol, la cerveza puede clasificarse en los siguientes tipos:

- a. **Cerveza de cereales:** es aquella elaborada a partir de mosto cervecero cuyo contenido en malta de cebada es inferior al 50% respecto al total de malta. Este tipo de cerveza se denominará “Cerveza de” seguido del nombre del cereal con mayor contenido en peso.
- b. **Cerveza extra:** es aquella cerveza que posee un contenido de extracto seco primitivo superior al 15% en masa. Siendo éste el conjunto de ingredientes orgánicos que componen el mosto antes de la fermentación, a excepción del agua.
- c. **Cerveza especial:** es aquella cerveza cuyo contenido en extracto primitivo seco oscila entre el 13-15% en masa.

- d. **Cerveza negra:** se considera cerveza negra a aquella que presente un valor superior a 50 en unidades de color determinado mediante el método analítico EBC (European Brewery Convention).
- e. **Cerveza de bajo contenido en alcohol:** se considera que una cerveza es baja en alcohol cuando el porcentaje en volumen de éste está comprendido entre el 1 y el 3%.
- f. **Cerveza sin alcohol:** es toda cerveza cuya graduación alcohólica sea inferior al 1% en volumen.

## 1.6 TIPOS DE CERVEZA

La cerveza puede clasificarse fundamentalmente en 3 grandes tipos o grupos atendiendo al proceso de fermentación al que se someten y a las especies de levadura que se emplean en su elaboración. Estos 3 grupos son *Ale*, *Lager* y *Lambic*.

- **Ale:** es la palabra inglesa que describe las cervezas que emplean levaduras de fermentación alta, por lo que el nombre se refiere exclusivamente al tipo de fermentación y no está relacionado con el color, estilo o cuerpo.
- **Lager:** las cervezas Lager son aquellas que se elaboran mediante fermentación baja. Actualmente es la forma más común de elaborar cerveza, y entre las cervezas de este grupo destacan las de estilo Pilsen, aunque también existen otras variedades como las Bock, Dortmunder y Doppelbock.
- **Lambic:** las cervezas tipo Lambic son aquellas de fermentación espontánea, originarias de Bélgica. La fermentación ocurre por las levaduras silvestres contenidas en las materias primas, por lo que no es necesario la adición de levadura. Se caracterizan por contener entre un 30 y un 40% de trigo, siendo el resto grano de cebada, y por ser ácidas y poco amargas.

### 1.6.1 India Pale Ale

A través de los siglos, las distintas regiones han perfeccionado sus métodos de elaboración de cerveza generando un amplio abanico de fórmulas que difieren tanto en los ingredientes, ya sea el tipo de granos usados, variedades de trigo, cebada, adjuntos, aromatizantes, lúpulo, cepas de levadura... establecidos tradicionalmente por la localización geográfica y el clima, como en las técnicas de elaboración, y que generan la gran variedad de productos que hoy en día podemos encontrar en el mercado.

La cerveza conocida como India Pale Ale surgió en Inglaterra alrededor del año 1.800 d.C como consecuencia de la demanda de la Compañía de las Indias Orientales al cervecero George Hodgson, ya que otras cervezas como la Porter o Pale Ale no

mantenían su calidad tras las largas travesías de la Compañía y no eran aptas para comerciar. Parece ser que para evitar las pérdidas Hodgson aumentó la concentración de lúpulo para asegurar que su cerveza llegaba en buen estado desde Inglaterra hasta la India. Lo cierto es, que no se conocen los detalles de la elaboración de esta primera India Pale Ale, ni la variedad de los granos o el lúpulo utilizados, ni las proporciones o el proceso de elaboración, y sí hay registros de que otros cerveceros exportaron con éxito sus cervezas a la India, pero no se asocia el nombre de India Pale Ale a ninguno de ellos (17).

La India Pale Ale (IPA) pertenece al grupo Ale, son cervezas de alta fermentación y se caracteriza por elaborarse con aguas de mineralización alta y tener mucho cuerpo (Cervemur). También suele ser bastante espumosa y con un sabor amargo marcado por la presencia del lúpulo y un alto grado alcohólico, superior a 6. (18).

### **1.7 TENDENCIAS DE CONSUMO ACTUALES**

La cerveza es un producto que goza de gran aceptación y popularidad, en el último año, 2016, su consumo ha aumentado en parte gracias a la recuperación económica, sobre todo en la hostelería. Según los datos económicos extraídos del Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España de 2016, la cerveza es la bebida alcohólica con mayor impacto económico a través de la generación de empleo y la recaudación de impuestos. En 2016 las compañías cerveceras aumentaron sus ventas en un 3,4% situando a España en el cuarto puesto de producción de cerveza en Europa, se estima que su valor en el mercado alcanza los 15.000 millones de euros, suponiendo el 1,4% del PIB nacional. En este sector se mantienen a la cabeza de la producción y las ventas las grandes compañías cerveceras como el Grupo Mahou-San Miguel, Heineken España o Damm, pero se ha visto incrementado considerablemente el número de pequeñas empresas cerveceras de todo el territorio nacional y que elaboran cervezas artesanales apostando por la personalización, el carácter y la calidad y que han tenido una gran acogida en el mercado, sobre todo entre los adultos jóvenes de entre 25 y 35 años.

A pesar de este aumento de las ventas, si hacemos una comparativa con el resto de países europeos, los españoles consumen una media de 46 litros de cerveza al año, una cifra muy por debajo de la media europea situada en los 70 litros anuales, lo que coloca a España en un perfil de consumo moderado de esta bebida, asimismo, el 14% de la cerveza consumida es de la variedad sin alcohol (Informe Socioeconómico del Sector de la Cerveza en España 2016. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente y Cerveceros de España (43) ) de esta tendencia se extrae el interés creciente de la población por la adopción

de un estilo de vida saludable, cada vez son más aquellos que se preocupan por los ingredientes y procesos de producción de los alimentos que consumen, lo que a su vez ha generado que las empresas evolucionen y cuiden su imagen vendiéndose como marcas “naturales” o “artesanales” esquivando la asociación negativa que se hace de las bebidas alcohólicas y los monopolios empresariales, esquivando también la estandarización y generando interés por los nuevos productos entre aquellos consumidores que opinan que la cerveza se ha ido degradando por la tecnología y la automatización y pretenden volver a lo “auténtico”.

## **1.8 ALIMENTOS FUNCIONALES**

Desde la antigüedad se han atribuido propiedades terapéuticas y curativas a las plantas y alimentos, y se conoce la importancia que tiene la alimentación en la salud. En las últimas décadas la industria alimentaria ha evolucionado desde asegurar la productividad, en la década de los setenta, obtener calidad en los años ochenta y pasando por la seguridad alimentaria en los noventa, hasta llegar al siglo XXI en el que el actual objetivo es asegurar la salud y promoverla a través de la nutrición. La alimentación y nutrición han sido objeto constante de investigación, en la actualidad las investigaciones se centran en la relación existente entre la alimentación y las enfermedades crónicas no transmisibles tales como la diabetes, el cáncer, enfermedades cardiovasculares o degenerativas, y los efectos de la nutrición sobre las funciones cognitivas e inmunitarias. A estos avances científicos se suman los cambiantes estilos de vida y los diferentes hábitos alimentarios, que si bien pueden diferir por motivos culturales, religiosos o geográficos generan nuevas necesidades en el consumidor moderno cada vez más consciente de su responsabilidad en su propia salud. En este contexto surgen los alimentos funcionales.

El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (International Life Science Institute, ILSI) propone la siguiente definición: Puede considerarse que un alimento es funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad o ambas cosas.

Un alimento funcional puede ser aquel que reúna una o varias de las siguientes características:

1. Un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado.
2. Un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios.

3. Un alimento del cual se ha eliminado un componente y producirá menos efectos adversos sobre la salud.
4. Un alimento en el cual alguno de sus componentes ha sido modificado químicamente para mejorar la salud.
5. Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más componentes ha sido aumentada.
6. Combinaciones de las anteriores.

No se especifica en el marco legal europeo si los alimentos funcionales son alimentos necesariamente modificados, por lo que el ILSI incluye tanto alimentos modificados como no modificados. No ocurre así con la legislación de otros países como Estados Unidos, en el que sí se define como alimento funcional a aquellos alimentos modificados para ejercer un efecto beneficioso en la salud.

## 1.9 BRÓCOLI

El brócoli es una hortaliza perteneciente a la Familia *Brassicaceae* (Crucíferas) a la que también pertenecen entre otros, el repollo, la coliflor, coles de Bruselas, colinabo... Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Reino: *Plantae*
- Phylum: *Spermatophyta*
- División: *Magnoliophyta*
- Subdivisión: Angiosperma
- Clase: *Magnoliopsida* (dicotiledónea)
- Subclase: *Dilleniidae*
- Orden: *Caprales* o *Brassicales*
- Familia: *Cruciferaeae* o *Brassicaceae*
- Género: *Brassica*
- Especie: *oleracea*
- Grupo o variedad: *itálica* Plenck
- Nombre común: Brócoli

Su origen se asienta en países de climas templados situados alrededor del mar Mediterráneo oriental y en Oriente próximo como Líbano o Siria, países en los que se cultivaron los primeros ejemplares procedentes de una especie silvestre común con las coliflores y las coles. Durante la expansión del Imperio Romano a través de Europa y el Mediterráneo el brócoli llegó a Italia donde se cultivó extensamente para el consumo, llegando a ser muy popular. Sin embargo, su producción a nivel europeo se desarrolló mucho más tarde,

durante la segunda mitad del siglo XX. En la actualidad el cultivo de brócoli es mayoritario en Europa, Asia y Estados Unidos, en regiones de climas templados principalmente.

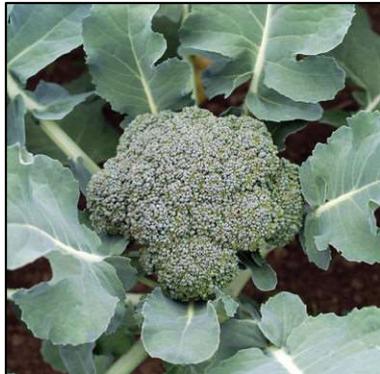


Fig.15. Pella de brócoli en la planta.



Fig. 16. Brócoli cortado para el consumo.

En cuanto a sus características físicas, el brócoli posee una forma similar a la coliflor pero con unos pedúnculos florales menos compactos, conformando un ramillete irregular y abierto denominado pella. Sus hojas permanecen erguidas, con peciolo desnudos y limbos de bordes ondulados. El cogollo del brócoli puede llegar a desarrollar unos 20 centímetros de diámetro y pesar alrededor de 2 kilogramos, suele presentar una coloración verde oscura en el tallo y verde azulada en los extremos de las inflorescencias. Su parte comestible son los tallos más finos y las inflorescencias antes de florecer. Las cualidades de la planta del brócoli tienen su mayor interés en la inflorescencia, cuyas características deben ser: forma de parasol, grano fino, y con uniformidad en su desarrollo, tallo recto y no hueco, y pella principal firme de 150 a 250 gramos de peso. Todo ello, sin importar el ciclo de cultivo en la cual se haya obtenido (Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de Murcia, 1987).

- **Fases del cultivo del brócoli**

Las 5 fases principales del cultivo son: etapa de crecimiento, seguido de la inducción floral, formación de pellas o inflorescencia, floración y fructificación. Las variedades de brócoli se clasifican dependiendo del ciclo de desarrollo de la pella, dividiéndose en variedades tempranas o precoces cuando se recolectan en menos de 90 días tras su siembra, intermedias al ser cosechadas entre 90 y 110 días tras su siembra y tardías cuando requieren más de 110 días para su óptimo desarrollo.

En España se dedican unas 30.000 hectáreas al cultivo de Brócoli que producen anualmente alrededor de 375.000 toneladas de este producto de las cuales se exportan 230.000, convirtiendo a España en el principal país exportador de Brócoli del mundo, según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

### ▪ **Propiedades y usos del brócoli**

En gran parte del mundo existe la necesidad de coordinar los esfuerzos científicos, políticos y médicos para mejorar la calidad de vida y la salud de los habitantes, en este aspecto, las hortalizas y las frutas presentan un gran potencial para el tratamiento y el control de enfermedades gracias a los métodos de extracción de los principios activos que contienen o por su incorporación directa en la dieta.

Las crucíferas son calificadas como hortalizas de elevado valor nutritivo, además en varios estudios se han demostrado sus propiedades terapéuticas. La especie *Brassica oleracea* L. var. *itálica*, contiene componentes a los que se confieren propiedades anticancerígenas, entre ellos, el sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) compuesto que ha demostrado tener efectos antimicrobianos y anticarcinogénicos (19), se trata de un isotiocianato, al que algunos autores denominan vitamina U o vitamina antiulcerosa y que se encuentra en una amplia variedad de vegetales del género *Brassica oleracea*, considerándose las fuentes más importantes el brócoli y el repollo (20).

El brócoli está considerado un alimento funcional natural no modificado, está compuesto principalmente por agua, siendo su contenido calórico muy reducido. También es rico en vitaminas B1, A, C y E y minerales como el calcio, magnesio, zinc y hierro, se trata por tanto, de una hortaliza de gran valor nutricional cuyo consumo ha aumentado considerablemente en los últimos años (21) debido a su elevado contenido en compuestos fitoquímicos, como los glucosinolatos e isotiocianatos, que con su actividad antioxidante poseen efectos potenciales en la prevención de varios tipos de cáncer y otras enfermedades (22, 23, 24, 25, 26), así como por su contenido en fibra y otros grupos de metabolitos secundarios (27, 28). Existen estudios que demuestran que los componentes del brócoli previenen diferentes tipos de cáncer: mama, pulmón y colon, además de disminuir el riesgo de sufrir cardiopatías y apoplejías y cataratas gracias a su elevado contenido en vitaminas B2, C, E, A, betacaroteno y flavonoles como la quercetina y el kaempferol (29, 30,31).

Uno de los componentes presentes en el brócoli, la quercetina, ha demostrado tener un efecto protector frente a la oxidación de los lípidos eritrocitarios tales como el colesterol y fosfolípidos, y otros componentes como la hemoglobina y el glutatión (32).

El consumo de brócoli fresco ha ido en aumento durante los últimos años, debido en gran parte a su elevado contenido en compuestos bioactivos, sin embargo, tiene una vida útil corta tras haber sido cosechado. La pérdida de la calidad se debe principalmente a la deshidratación y al amarilleamiento debido a la degradación de

la clorofila. También se ha demostrado que durante la poscosecha se produce una reducción de los componentes bioactivos (33).

▪ **Clasificación de los compuestos fenólicos:**

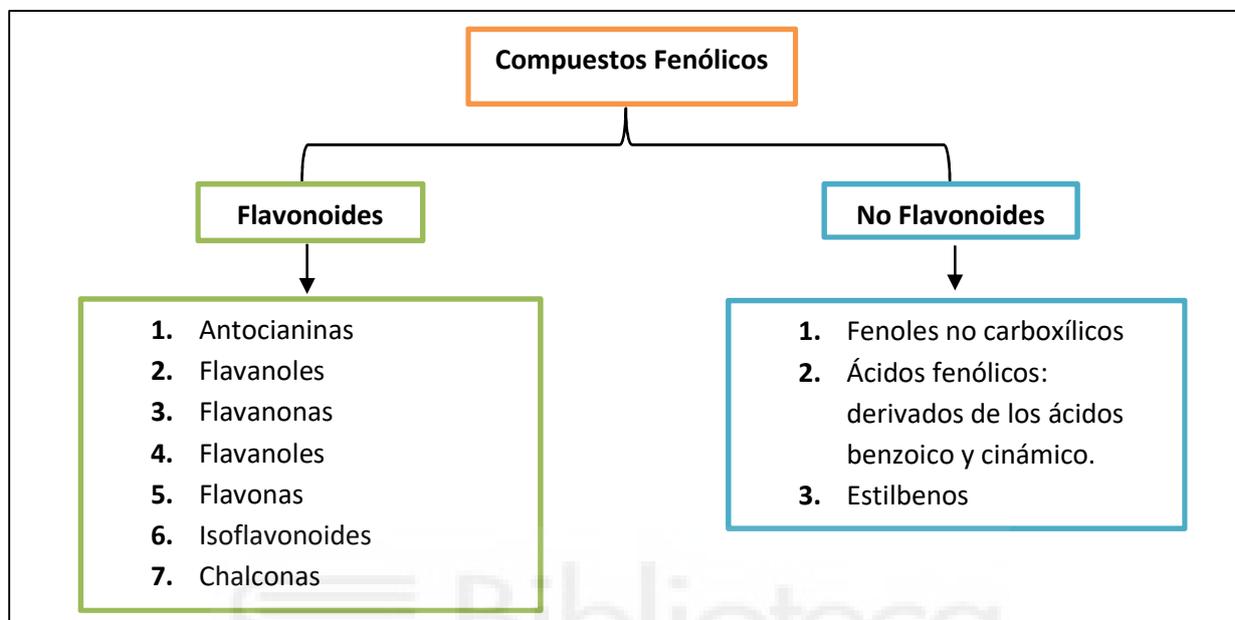


Fig. 17. Esquema de Clasificación de compuestos fenólicos.

Quizá, el grupo de sustancias químicas con propiedades funcionales más estudiadas y, también, conocidas por los consumidores son los flavonoides. Los flavonoides son sustancias químicas que derivan de la 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona), se caracterizan por poseer un número variable de grupos hidroxilo gracias a los cuales presentan capacidad antioxidante (34, 35).

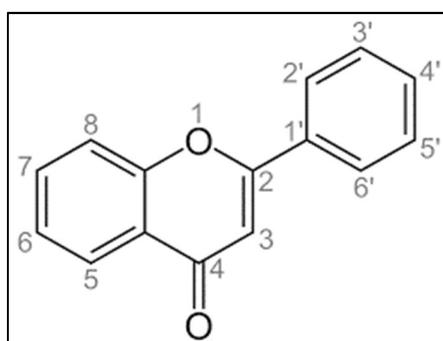


Fig. 18. Estructura química de la 2-fenil-1,4-benzopirona.

En función de las posiciones que ocupen los distintos sustituyentes en los anillos de la estructura básica anterior, los flavonoides se pueden clasificar en 14 grupos distintos, de los cuales los mejor estudiados son los siguientes:

1. **Flavonoles:** Su estructura se caracteriza por un doble enlace situado entre los carbonos C2 y C3 y por poseer un grupo hidroxilo en el carbono 3. A este grupo pertenece la quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona)

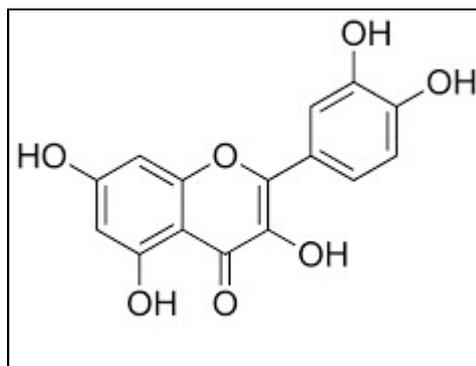


Fig. 19. Quercetina.

2. **Flavonas:** Su estructura química presenta un doble enlace entre los carbonos C2 y C3, los distintos compuestos clasificados como flavonas difieren entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilo enlazados a la estructura básica.

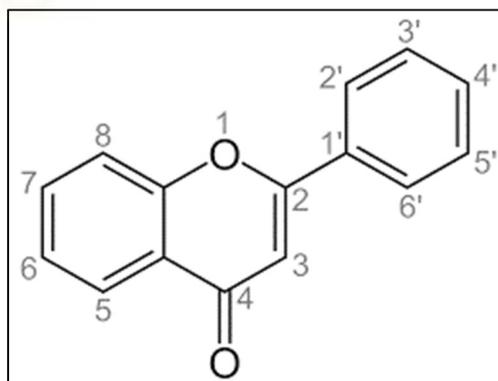


Fig. 20. Estructura común de las Flavonas.

3. **Flavanonas:** a diferencia de los casos anteriores, en su estructura química no se observa un doble enlace entre los carbonos C2 y C3, sin embargo sí posee un átomo de oxígeno en el carbono C4.
4. **Flavonoles:** Este grupo tampoco presenta un doble enlace entre los carbonos C2 y C3. En su estructura se encuentra un grupo hidroxilo en el C3. Estos compuestos se

pueden encontrar tanto como monómeros (catequinas) como formando polímeros (proantocianidinas).

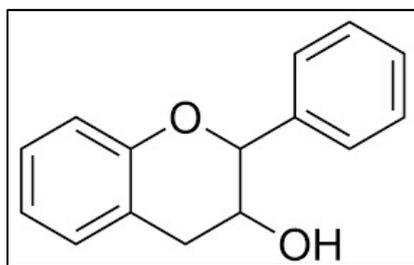


Fig. 21. Estructura química de los Flavanoles.

5. **Antocianinas:** Se caracterizan por presentar dobles enlaces conjugados en el anillo central en cuya posición 3 se encuentra un grupo hidroxilo y un grupo cetónico situado en la posición 4. Otra característica es que se encuentran glicosilados en muchos casos, denominándose entonces antocianidinas. La glicosilación se produce con mayor frecuencia en la posición 3 del anillo central.

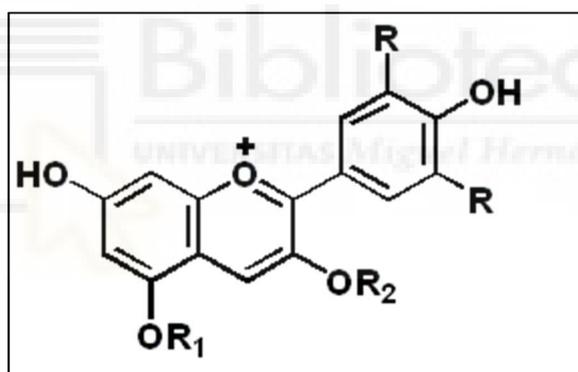


Fig. 22. Estructura general de las antocianinas. R1 y R2 representan tanto H como cadenas glucídicas. R representa tanto H como grupos OH.

## 2 OBJETIVOS

Este proyecto tiene como finalidad comprobar la relevancia del momento de la adición del brócoli en polvo durante el proceso de fermentación de la cerveza artesana en relación a la concentración de fenoles totales presentes en el producto final y, por tanto, en sus propiedades funcionales.

Debido a la tendencia actual que existe entre los consumidores de buscar productos naturales de calidad y que contengan propiedades beneficiosas para la salud, y al creciente interés que se está generando por la elaboración de cerveza artesanal, este trabajo plantea el objetivo de

elaborar un alimento funcional, una cerveza India Pale Ale con brócoli, cuya finalidad es la obtención de un producto nuevo que recopile los beneficios conocidos de la cerveza tradicional e incorpore, además, las propiedades beneficiosas para la salud atribuidas al brócoli. A este nuevo producto se le ha denominado Brocolipa.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

Para realizar este proyecto se ha usado la siguiente fórmula, obtenida mediante el programa informático *BeerSmith*, para la elaboración de la cerveza Brocolipa:

- a. Pale Ale Malta 18 kg
- b. Caramel/Crystal Malta 0,5 kg
- c. Chocolate Malta 0,3 kg
- d. Lúpulo Chinook 13% 0,3 kg
- e. Levadura: *Saccharomyces cerevisiae* 11 g
- f. Brócoli en polvo: el brócoli empleado en este trabajo se obtuvo mediante un proceso de deshidratación del material vegetal siguiendo una técnica patentada de rampa de temperaturas que permite el mantenimiento de las características funcionales del brócoli.
- g. Sal Epsom ( $MgSO_4$ ) 15,85 g
- h. Sulfato de calcio 31,70 g
- i. Sacarosa 184 g
- j. Agua
- k. Equipo: el equipo ha sido facilitado por el grupo de Post-recolección de Frutas y Hortalizas de la UMH en la Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO)



Fig. 23. Equipo de elaboración de cerveza de características similares al usado para realizar la Brocolipa.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Proceso de elaboración

El proceso de elaboración de la cerveza Brocolipa se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos a continuación:

- **Limpieza:** antes de comenzar con el proceso de elaboración ha de asegurarse la adecuada limpieza y estado del todo el material que se ha de utilizar. Este proceso se realiza mediante el uso de productos con elevada capacidad higienizante y antiséptica que además no produzcan residuos y con la ventaja añadida de no ser necesario su enjuague. El producto usado en este caso ha sido un enjuague aniónico ácido cuyo nombre comercial es Star San. Se preparó un recipiente con una solución de agua y Star San en la concentración indicada por el fabricante y a continuación se procedió a la esterilización mediante inmersión de los fermentadores, tapas, etc.
- **Molturado:** La materia prima utilizada ha sido grano entero de cebada malteada, por lo que ha sido necesario un proceso de molturado para disgregar mecánicamente la estructura del grano y permitir el mejor acceso a los componentes fermentables.
- **Obtención del mosto:** se empleó una olla de unos 50 litros de capacidad, la mostrada en la imagen del equipo de elaboración de cerveza, y a continuación se siguieron los siguientes pasos:
- **Calentamiento del agua:** se calentó el agua al fuego hasta que la temperatura de la superficie medida con un termómetro fue de 68°C.

- **Maceración:** Una vez alcanzada a la temperatura deseada, se traspasó el agua al recipiente de maceración y se adicionaron las distintas maltas previamente molturadas y pesadas, y dejamos macerar durante 60 minutos.
- **Filtración:** el contenido de la olla se hizo pasar por una malla metálica para retener las partículas más grandes procedentes del molturado del grano.
- **Cocción:** una vez filtrado el líquido, se volvió a poner al fuego durante otros 60 minutos.
- **Infusión del lúpulo:** el lúpulo se adicionó al inicio de la cocción y se dejó infundir durante 60 minutos, para aumentar el amargor de la cerveza.
- **Whirpooling:** como ya se ha explicado, este proceso permite que las partículas sólidas restantes tras la cocción se depositen en el fondo, obteniendo un mosto más limpio.
- **Enfriado:** para bajar la temperatura del mosto rápidamente se empleó un intercambiador de calor que utiliza como líquido refrigerante agua en sentido opuesto al flujo del mosto, por lo que se consigue disminuir la temperatura del líquido rápidamente. Tras su paso por el intercambiador, se midió la temperatura del mosto, marcando el termómetro 25,5°C.

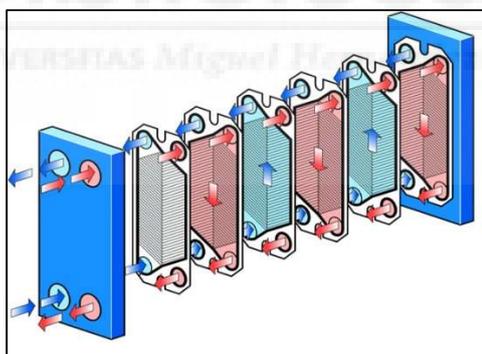


Fig. 24. Intercambiador de calor de placas.

- **Fermentación del mosto:** una vez que el mosto alcanzó una temperatura de unos 20°C, se preparó la levadura, el contenido de un sobre de 11,5 gramos de levadura se dejó caer sobre la superficie de un recipiente con 100 ml de agua. Se dejó reposar sin remover, hasta que toda la levadura quedó hidratada. A continuación, se mezcló y se adicionó al mosto cervecero.
  - Una vez adicionada la levadura, se dejó reposar el mosto 2-4 horas.
  - Transcurridas las 2-4 horas, se procedió a repartir el mosto cervecero en los fermentadores de 5 litros de capacidad, previamente rotulados.

- El volumen total de mosto obtenido fue de 46 litros, por lo que el reparto del mosto se hizo en función del peso, de forma que cada fermentador contuviera 2.300 gramos de mosto.
- Una vez dispensado el mosto, se cerraron todos los dispensadores y se colocaron los airlocks llenos hasta la mitad con una solución de agua y Star San, para permitir el intercambio de gases manteniendo baja la concentración de oxígeno.
- Tras este paso, se procedió a la adición del brócoli en polvo tal y como se detalla en el apartado **3.2.2**

### **3.2.2 Adición del brócoli**

El brócoli en polvo se adicionó en tres concentraciones distintas y en tres momentos distintos del proceso de fermentación. Las concentraciones ensayadas fueron 1%, 5% y 10% (p/p).

Los tiempos de adición del brócoli fueron al inicio de la fermentación (If), a mitad de la fermentación (Mf) y en la fase final de la fermentación (Ff).

El embotellado tuvo lugar 6 días después de la última adición de brócoli. La cerveza elaborada se distribuyó en un total de 20 fermentadores:

- Tres fermentadores por duplicado para cada concentración de brócoli en polvo y para cada momento de aplicación.
- Dos fermentadores control.

En total se obtuvo un volumen de 46 litros de cerveza artesanal, los cuales se distribuyeron en los fermentadores a razón de 2.300 g de cerveza por fermentador, excepto en los controles los cuales contenían 1.900 g de cerveza. Una vez distribuida la cerveza y pesada, se procedió a calcular la masa de brócoli en polvo necesario para cada concentración deseada (1%, 5% y 10%). Teniendo en cuenta que cada gramo de brócoli en polvo equivale a 100 gramos de brócoli fresco (1:100).

$$1\% \text{ de brócoli fresco} = 0,01\% \text{ de brócoli en polvo}$$

<b>Concentración</b>	<b>Gramos de brócoli en polvo adicionado</b>
0,01%	0,23
0,05%	1,15
0,1%	2,3

**Tabla 3. Brócoli en polvo empleado.**

Una vez pesado, se adicionó el brócoli en polvo a los seis fermentadores correspondientes al inicio de la fermentación If (1%, 5% y 10%) y se cerraron.

Se dejó que transcurriera el proceso de fermentación de la cerveza durante los dos días siguientes, tras los cuales se adicionó la cantidad de brócoli correspondiente a los seis fermentadores Mf (1%, 5% y 10%). Se repitió el proceso anterior una vez transcurridos otros 5 días de fermentación, adicionando el brócoli correspondiente a los fermentadores Ff (1%, 5% y 10%). Tras la adición del brócoli al último grupo de fermentadores (Ff), se dejó fermentar a temperatura ambiente durante otros 2 días, tras los cuales se procedió a almacenar en cámara frigorífica todos los fermentadores y los controles.



**Fig. 25. Fermentadores de plástico con tapa de rosca y “Airlock” utilizados. Instalaciones de la UMH en la EPSO.**

### **3.2.3 Recogida de muestras**

Antes de embotellar la cerveza, se tomaron alícuotas de todos los fermentadores y los controles en tubos de 15 ml, los cuales se rotularon y almacenaron adecuadamente en congelador hasta la realización de las determinaciones pertinentes.

### **3.2.4 Licor de tiraje**

Para la obtención de una cantidad adecuada de dióxido de carbono (carbonatación) en el producto final, es necesaria la adición de un jarabe de sacarosa que sirva como sustrato a la levadura para producir más gas tras el embotellado. Para obtener un licor de tiraje que permitiera obtener una concentración de dióxido de carbono satisfactoria se pesaron 4 g de sacarosa por litro de cerveza, como se obtuvieron 46 litros de cerveza se pesaron 184 g de sacarosa que se disolvieron en 100 ml de agua, obteniendo así un licor de tiraje con una concentración de sacarosa de 1,84 g/ml.

### 3.2.5 Embotellado

Tras 3 días en cámara frigorífica, se procedió al embotellado de la cerveza artesana Brocolipa. Una vez se hubieron contado y limpiado todas las botellas de tercio de litro que iban a ser necesarias, se procedió a su llenado mediante un dispositivo que permitía dispensar el mismo volumen de cerveza en cada botellín. Una vez llenos los botellines, se adicionó el licor de tiraje preparado previamente a razón de 1 ml por cada botella de tercio, es decir 1,84 g de sacarosa en cada botellín. A continuación, se cerraron todas las botellas y se conservaron a temperatura ambiente durante 30 días, tras los que se refrigeraron hasta su consumo.

La línea temporal seguida en la elaboración de la cerveza y la determinación de algunos de sus parámetros se simplifica en el siguiente esquema:

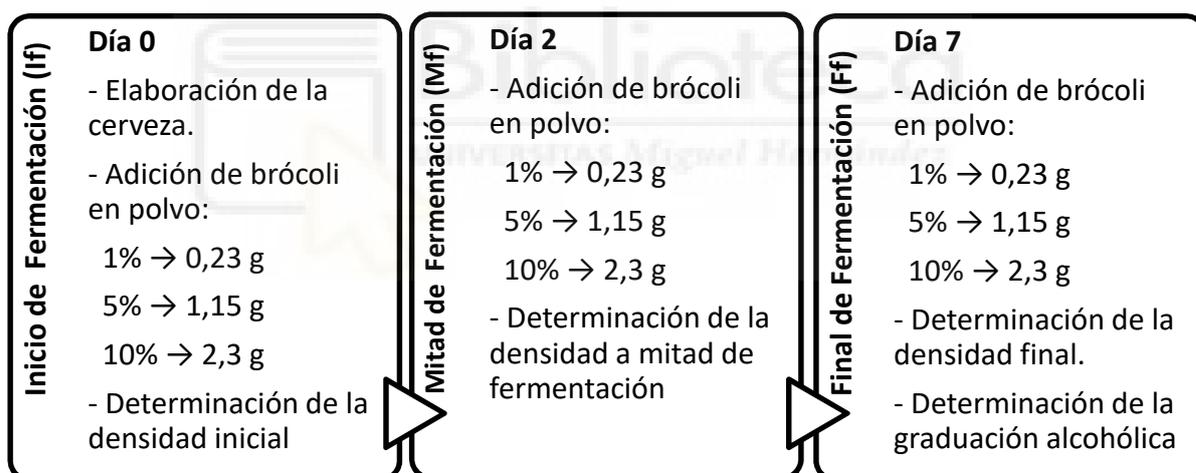


Fig. 26. Línea temporal del procedimiento seguido en la elaboración de la cerveza, adición del brócoli y algunas de las determinaciones analíticas realizadas.

## 3.3 DETERMINACIONES DE LABORATORIO

### 3.3.1 Densidad

La densidad del mosto directamente proporcional a la concentración de azúcares que contiene, por lo que cuanto más denso sea el mosto, más contenido alcohólico presentará el producto final. La densidad relativa de la cerveza elaborada se

determinó utilizando para ello un densímetro o hidrómetro como el que se muestra en la imagen. El procedimiento consistió en llenar la probeta con un volumen de cerveza aproximado de 150 ml, a temperatura ambiente (25°) y previamente desgasificada.



Fig. 26. Densímetro similar al empleado para determinar la densidad del mosto cervecero.

### 3.3.2 Graduación alcohólica

La graduación alcohólica de la cerveza elaborada se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%Alcohol (v/v) = \frac{d_i - d_f}{7,45}$$

Donde  $d_i$  es la densidad inicial ( $I_f$ ),  $d_f$  es la densidad final ( $F_f$ ) y el factor de corrección 7,45.

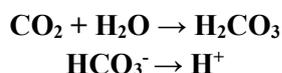
### 3.3.3 pH

El pH tiene una importancia crítica en el desarrollo del proceso fermentativo y en la calidad del producto final, debido a que ejerce una función de control frente a la contaminación por bacterias y otros microorganismos, así como la regulación del crecimiento de las levaduras que determina la velocidad del proceso de fermentación y la producción de alcohol.

El pH durante el proceso de fermentación puede variar por distintos factores:

1. **Transformación de los aminoácidos:** a medida que la población de levaduras aumenta y se hace metabólicamente activa, los aminoácidos presentes en el medio pierden átomos de nitrógeno, disminuyendo la capacidad amortiguadora y disminuyendo así el pH del medio (12).

2. **Producción de dióxido de carbono:** el dióxido de carbono producido durante la fermentación aerobia se disuelve en el medio acuoso produciendo ácido carbónico, que acidifica el mosto, siguiendo la reacción que se describe a continuación:



3. **Producción de ácidos orgánicos:** durante el proceso de fermentación anaerobia, se produce el alcohol etílico, pero también tiene lugar la producción de distintos ácidos orgánicos principalmente láctico y pirúvico.

Se determinó el pH de todas las muestras de los fermentadores y los controles por duplicado mediante el uso de un pH-metro previamente calibrado siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación del pH y, el resto de parámetros, se atemperaron las muestras que estaban congeladas en un baño termostático a 20°C y se desgasificaron por agitación, posteriormente se introdujeron los electrodos en las muestras de cerveza y se procedió a la lectura del pH.

### 3.3.4 Acidez

Para la determinación de la acidez total titulable es necesaria la exclusión de la acidez adicional aportada por el dióxido de carbono disuelto (ácido carbónico), por lo que se desgasificaron las muestras a ensayar antes de la determinación. Para determinar la acidez se utilizó un método de titulación mediante pH-metro acoplado a un sistema informatizado. Debido a que los ácidos orgánicos presentes en la cerveza son relativamente débiles, la neutralización con ácidos fuertes como el NaOH debe hacerse a pH superiores a 7. La valoración se realizó mediante el uso de una solución de NaOH 0,1 N hasta que se alcanza un pH de 8 como punto final en la determinación de la acidez total, como recomienda la AOAC (Association of Official Analytical Chemist), en la que los resultados se expresan en gramos de ácido por 100 g de cerveza. El factor de conversión de equivalencia de 1 ml de NaOH 0,1 N a ácido láctico es 0,009.

$$\% (p/p) \text{ de ácido láctico} = \frac{n \cdot 0.009 \cdot 100}{V}$$

**n:** ml de NaOH dispensados

**V:** volumen de muestra utilizado

La determinación se realizó sobre 1 ml de cada muestra de cerveza disuelto en 25 ml de agua destilada.



Fig. 27. Equipo empleado en la determinación de la acidez. Metrohm 760 Sample Changer.

### 3.3.5 Color

Los componentes presentes en la cerveza y que son responsables de su color son varios: polifenoles oxidados, productos de caramelización, carotenoides, antocianinas y, principalmente, las melanoidinas que proporcionan una gama de colores que van del amarillo o ámbar hasta el pardo intenso y que se generan durante el malteado y el proceso de cocción como consecuencia de reacciones de pardeamiento no enzimático o de Maillard.

Las escalas que evalúan el color de las cervezas son la SRM (Standard Reference Method) que se utiliza habitualmente en Estados Unidos y la escala EBC (European Brewing Convention) que se aplica en la mayoría de los países y es la que se utilizó en este caso. Las escalas se diferencian en la longitud del paso de la luz, es decir de la distancia entre la fuente de luz y la cubeta de medición situada en el espectrofotómetro. La SRM emplea un paso de luz de 1,27 cm, mientras que la EBC emplea 1 cm. La escala SRM se puede expresar en grados Lovibond ( $^{\circ}$ L), los cuales se obtienen de multiplicar la absorbancia SRM por 10, por otro lado, los grados EBC se obtienen de multiplicar la absorbancia EBC por 25. La interconversión entre ambas escalas es la siguiente:  $EBC = 1,97 \times SRM$  o bien,  $SRM = EBC / 1,97$  (36).

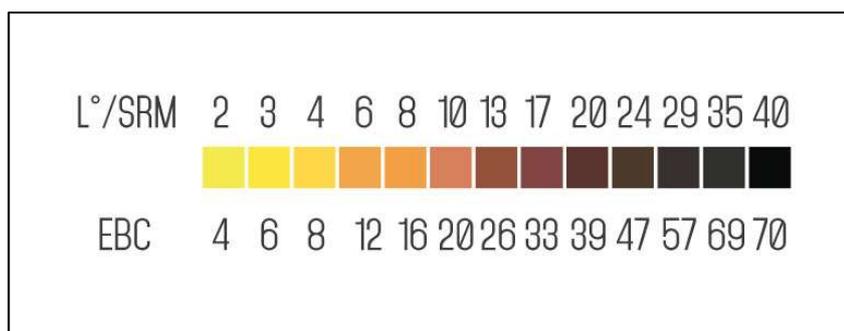


Fig. 28. Escalas de color EBC y SRM/Lovibond.

Se determinaron los valores EBC mediante la medición de la absorbancia a longitudes de onda de 430 nm y a 700 nm de una preparación con 0,5 ml de cerveza y 1,5 ml de agua destilada, se realizó por triplicado. Al igual que en la determinación del pH, las muestras de cerveza y los controles se atemperaron a 20°C y se desgasificaron. Los valores EBC se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{EBC} = \text{ABS}_{430} \times 25 \times \text{D}$$

**D:** Factor de dilución. Dilución 1:2, ya que la preparación presentaba una absorbancia superior a 1, por lo que se procedió a su dilución para realizar la determinación.

La determinación de la absorbancia a 430 nm y también a 700 nm se debe a que si la razón entre los valores de absorbancia obtenidos a ambas longitudes de onda es  $\geq 25$ , se considera que la turbidez de la muestra no interfiere en la absorbancia y, por tanto, en la determinación del color.

### 3.3.6 Amargor

Los principales componentes de la cerveza responsables del sabor amargo son los iso- $\alpha$ -ácidos o humulonas, los  $\beta$ -ácidos o lupulonas y varios de sus productos de oxidación. Los distintos iso- $\alpha$ -ácidos y la composición de estos en las distintas cervezas desempeñan un importante papel en las características organolépticas tales como el amargor, la espuma, el sabor y la estabilidad de éste en la cerveza (37). Los ácidos amargos del lúpulo y de sus análogos poseen una potente actividad antioxidante que produce efectos preventivos frente al cáncer, evitando la oxidación del ADN (38).

El método químico de determinación del amargor que se siguió fue el descrito por la AOAC y que consistió en realizar una preparación con 0,5 ml de cerveza diluida 1:2

con agua destilada, 0,02 ml de HCl y 1 ml de Iso-octano, la mezcla se homogeneizó en agitador vórtex y se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos, tras los cuales se procedió a medir la absorbancia a 275 nm utilizando cubetas de cuarzo.

Las unidades de amargor °IBU (International Bitterness Unit) se calcularon utilizando la siguiente relación:

$$^{\circ}\text{IBU} = \text{ABS}_{275} \times 50 \times \text{D}$$

**D:** factor de dilución 2 (1:2)

Con este método químico se mide no solo los iso-alfa-ácidos de la muestra, sino que también se miden varios de los productos de oxidación de las lupulonas, ya que los productos de degradación de estos iso-beta-ácidos tienden a aumentar los valores de IBU, mientras que, por otro lado, la degradación de los iso-alfa-ácidos disminuye el valor de IBU.

### 3.3.7 Polifenoles totales

Como ya se ha comentado anteriormente, los polifenoles son compuestos de gran interés debido a las numerosas funciones biológicas que presentan, por lo que se consideran los fitoquímicos más importantes en la contribución a la salud humana a través de la nutrición, debido a su capacidad antioxidante. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de los vegetales que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, también participan en procesos de defensa frente a patógenos y otros factores externos como la radiación ultravioleta.

El ensayo utilizado para la determinación de los polifenoles totales fue el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (39) en las muestras de cerveza y los controles. Este ensayo se basa en que los compuestos fenólicos presentes en las muestras reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio alcalino para dar lugar a compuestos de color azul que pueden medirse espectrofotométricamente a 760 nm y cuya intensidad será directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos contenidos en la muestra.

La determinación de polifenoles totales se realizó por duplicado en las muestras correspondientes a la adición del brócoli en polvo al 10% tanto al inicio de la fermentación (If), mitad de la fermentación (Mf) y final de la fermentación (Ff). La determinación se realizó en dos pasos:

1. **Extracción de polifenoles** mediante una adaptación del método propuesto por Tomás-Barberán et al., 2004: Consiste en la separación de los polifenoles de la muestra, gracias a su mayor afinidad por los disolventes orgánicos que

por la fase acuosa. De este modo los reactivos empleados fueron 10 ml de metanol, 0,085 gramos de Fluoruro de sodio y 2,5 ml de cada muestra de cerveza y los controles. A continuación, se dispuso a su centrifugación durante 12 minutos a 15.000 rpm a 5°C. Tras la centrifugación se conservó el sobrenadante y se recogieron 1,5 ml de cada uno de los tubos, para la determinación de polifenoles posterior, conservándolos en una gradilla con hielo.

2. **Determinación de polifenoles** mediante el método de Folin-Ciocalteu: las muestras se prepararon por duplicado utilizando 250 µl de tampón fosfato pH 7, 250 µl de muestra, 2,5 ml de reactivo de Folin, se dejó reaccionar durante 3 minutos, transcurridos los cuales se adicionaron 2 ml de carbonato de sodio, el cual actúa como inhibidor de la reacción colorimétrica. También se prepararon dos blancos que contenían los reactivos citados anteriormente excepto la muestra, por lo que el volumen de tampón fosfato utilizado en los tubos blanco fue de 500 µl. A continuación, los tubos se agitaron en vórtex y se colocaron en un baño a 60°C durante 5 minutos para permitir la aparición de la coloración azul que posteriormente se midió espectrofotométricamente a 760 nm. Las muestras utilizadas para realizar la determinación de polifenoles totales se restringieron solamente al grupo que contenía un 10% de brócoli en polvo y a los controles.

La cuantificación del contenido de polifenoles totales se realizó mediante una batería de disoluciones patrón de ácido gálico. Se preparó una disolución madre de ácido gálico en una concentración de 1000 mg/L que se usó para preparar la batería de patrones tal y como se indica en la siguiente tabla:

<b>Concentración de Ác. Gálico (mg/L)</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>125</b>	<b>150</b>	<b>175</b>	<b>200</b>
<b>Reactivos</b>									
Solución madre de Ác. Gálico (mL)	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2
Agua destilada (mL)	10	9,75	9,5	9,25	9	8,75	8,5	8,25	8

**Tabla 4. Preparación de la recta patrón de ácido gálico para la determinación de la concentración de polifenoles totales.**

### 3.4 CATA DE LA CERVEZA

El análisis sensorial se realizó mediante una cata a en la que participaron 10 personas de la comunidad universitaria de la UMH en la EPSO.

Los participantes probaron 10 grupos de cerveza: Control, Inicio de Fermentación (If), Mitad de Fermentación (Mf) y Final de Fermentación (Ff), con las distintas concentraciones de brócoli (1%, 5% y 10%). A continuación, valoraron con una puntuación de entre 1 y 10 puntos cada uno de los parámetros que se indican a continuación excepto el de color, para el cual se usó la escala EBC, apuntando los resultados en la Hoja de Cata que se les facilitó.

#### 1. Parámetros de apariencia:

- Color
- Persistencia de la espuma
- Turbidez

#### 2. Parámetros de flavor:

- |                  |                |
|------------------|----------------|
| - Malta          | - Tierra/cuero |
| - Tostado        | - Alcohólico   |
| - Lúpulo         | - Dulce        |
| - Floral         | - Ácido        |
| - Afrutado       | - Amargo       |
| - Herbal/vegetal | - Astringente  |
| - Brócoli        | - Cuerpo       |
| - Levadura       | - Postgusto    |

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DENSIDAD

La densidad relativa de la cerveza elaborada se determinó al mismo tiempo que la adición del brócoli en polvo en los fermentadores, de este modo se obtuvieron tres valores de densidad correspondientes al Inicio de la fermentación (If), Mitad de la fermentación (Mf) y Final de la fermentación (Ff), utilizando para ello un densímetro o hidrómetro y obteniendo los siguientes valores:

	<b>If</b>	<b>Mf</b>	<b>Ff</b>
<b>Densidad (Kg/L)</b>	1067	1025	1010

**Tabla 5. Densidad del mosto cervecero al Inicio de la fermentación (If), mitad de la fermentación (Mf) y final de la fermentación (Ff).**

Los valores de densidad obtenidos fueron muy aproximados a los esperados, teniendo en cuenta la fórmula diseñada mediante el programa informático BeerSmith que se utilizó para elaborar la Brocolipa.

#### **4.2 GRADUACIÓN ALCOHÓLICA**

Como se ha citado en el apartado anterior, la graduación alcohólica de la cerveza depende de la densidad del mosto, por lo que para calcular el contenido en alcohol se utilizó la siguiente relación:

$$\%Alcohol (v/v) = \frac{d_i - d_f}{7,45}$$

$$\%Alcohol (v/v) = \frac{1067 - 1010}{7,45} = 7,65^\circ$$

El contenido en alcohol fue ligeramente superior al calculado por el programa BeerSmith, que se estimó en 6,8 °. La causa más probable se debe a que la densidad final del mosto, antes del embotellado, fue inferior al esperado, probablemente debido a la elevada temperatura ambiente (alrededor de los 25°C) a la que se conservó el mosto durante la fermentación, respecto a la prevista por el programa (18°C), por lo que se presume un aumento del metabolismo fermentativo de la levadura que se tradujo en un consumo más elevado de los azúcares fermentables, y por consiguiente, en una disminución de la densidad final y un aumento del contenido en alcohol.

#### **4.3 Ph**

El pH es un parámetro de calidad de la cerveza cuyos valores aceptables vienen recogidos en el *Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*. Este Real Decreto deroga el *Real Decreto 53/1995, de 20 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta líquida* (42). Según esta norma, el pH de la cerveza ha de ser inferior o igual a 5,5.

El valor medio de pH obtenido a partir de los valores recogidos en la **Tabla 1.1 pH (Anexo)** fue de  $4,45 \pm 0,07$ . Los controles presentaron un valor medio de pH de  $4,44 \pm 0,10$ .

Este resultado sitúa la cerveza elaborada dentro de los estándares de calidad establecidos por la normativa vigente.

#### **4.4 ACIDEZ**

La acidez como parámetro de calidad de la cerveza no se menciona en el *Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*. Por este motivo se tomó como referencia la normativa inmediatamente anterior, es decir, el *Real Decreto 53/1995, de 20 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta líquida*, para discutir los resultados obtenidos en la determinación de la acidez de las muestras de cerveza Brocolipa. Esta norma, especifica en su *Artículo 8. Características de la cerveza y de la malta líquida elaboradas* que “La acidez total, previa eliminación del anhídrido carbónico, expresada en ácido láctico, no será superior al 0,3 por 100.”

El valor medio de acidez calculado a partir de los valores recogidos en la **Tabla 1.2 Acidez (Anexo)** fue de  $0,41 \pm 0,04$  gramos de ácido láctico por cada 100 gramos de cerveza, es decir 0,41% (p/p). Mientras que el valor medio de acidez de los controles fue de  $0,421 \pm 0,004$  gramos de ácido láctico por cada 100 gramos de cerveza, es decir 0,42% (p/p)

Los resultados obtenidos muestran que la cerveza Brocolipa presenta unos niveles de acidez superiores a los considerados aceptables por la normativa consultada. Teniendo en cuenta que esta normativa no contempla otras materias primas distintas a granos de cereal malteados, no puede afirmarse que este aumento de la acidez respecto a las cervezas tradicionales represente un defecto de calidad. Los valores de acidez obtenidos en la cerveza Brocolipa son coherentes con la adición de brócoli en polvo, cuya presencia aumenta la concentración de ácidos orgánicos contenidos en la cerveza.

## 4.5 COLOR

Ópticamente, la Brocolipa se observa de color anaranjado pálido o ambarino.

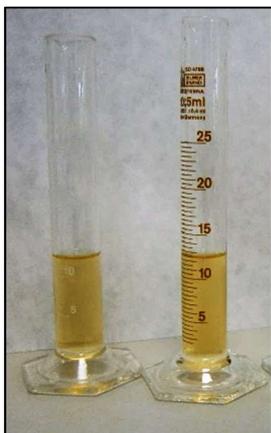


Fig. 28. Muestra de Brocolipa .

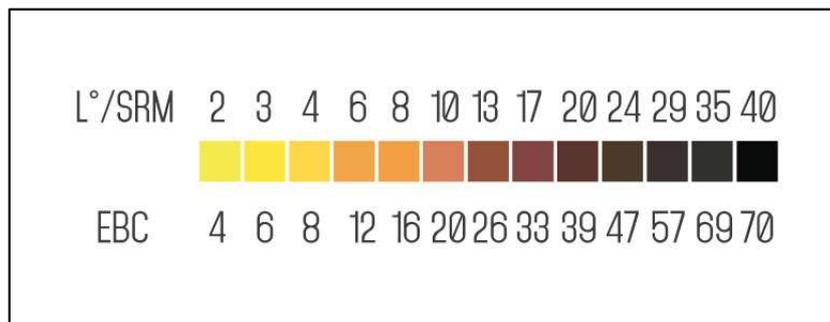


Fig. 29. Escalas de color EBC y SRM.

Analíticamente el color representado mediante escala EBC (European Brewers Convention) se determinó espectrofotométricamente a 430 nm y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$^{\circ}\text{EBC} = \text{ABS}_{430} \times 25 \times \text{D}$$

**D:** Factor de dilución. Dilución 1:2, ya que la preparación presentaba una absorbancia superior a 1, por lo que se procedió a su dilución para realizar la determinación.

Los valores mostrados se calcularon a partir de los valores recogidos en la **Tabla 1.3 Absorbancia 430 nm (EBC)**, **Tabla 1.4 Absorbancia 700 nm (EBC)** y la **Tabla 1.5 °EBC**, incluidas en el Anexo. La absorbancia media de los controles a 430 nm fue de  $0,638 \pm 0,05$ . Por otro lado, la absorbancia media de las muestras de Brocolipa a 430 nm:  $0,655 \pm 0,05$ .

Los grados EBC se calcularon mediante la relación  $^{\circ}\text{EBC} = \text{ABS}_{430} \times 25 \times 2$  obteniendo los siguientes resultados: la media de los controles fue de  $32 \pm 2$  °EBC, mientras que la media de los valores de las muestras de Brocolipa fue de  $33 \pm 3$  °EBC.

El programa informático utilizado para la elaboración de la Brocolipa, BeerSmith, estimaba un valor de °EBC de 30,1, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado.

## 4.6 AMARGOR

Según la normativa vigente, la cerveza ha de tener un amargor superior a 5 mg/l, siendo 1 mg/l de alfa-isoácidos en cervezas, el equivalente a una unidad de amargor IBU. Las unidades de

amargor °IBU (International Bitterness Unit) se calcularon utilizando la siguiente relación:

$$^{\circ}\text{IBU} = \text{ABS}_{275} \times 50 \times 2$$

A partir de los datos recogidos en la **Tabla 1.6 °IBU (Anexo)** se obtuvieron los siguientes valores de amargor: el promedio de los valores de IBU de los controles fue  $21,99 \pm 0,11$  °IBU, mientras que el promedio de los valores de IBU de las muestras de Brocolipa fue de  $17,82 \pm 3$  °IBU.

Los valores de amargor esperados en grados IBU calculados por el programa BeerSmith se estimaban alrededor de 23,8 IBU, sin embargo, los valores obtenidos están dentro de los límites de amargor que marca la normativa actual.

Los resultados obtenidos son inferiores a los esperados, al comparar los valores IBU de los controles y de la Brocolipa se aprecia una variación que podría deberse a la adición de brócoli, resultando en la disminución del amargor en las muestras que lo contienen. Si analizamos los componentes que aportan amargor a la cerveza encontramos principalmente:

- Iso- $\alpha$ -ácidos procedentes del lúpulo
- Productos de oxidación de iso- $\beta$ -ácidos

Se plantean dos hipótesis que podrían explicar la disminución del amargor que presenta la Brocolipa respecto a los controles:

- Las proteínas de la cerveza han podido interactuar con los polifenoles, pudiendo formar complejos o modificando los cromóforos desplazando el espectro de absorción a otras longitudes de onda, lo que se traduciría en una disminución de la absorbancia a 275 nm y, por tanto, en una disminución de los IBU (12).
- La actividad antioxidante del brócoli en polvo ha podido disminuir la oxidación de los iso-beta-ácidos, por lo que los productos de oxidación de éstos, responsables de parte del amargor de la cerveza, se han podido ver reducidos.

Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, no parece una correlación lineal, ni directa ni inversa, demostrable entre la concentración de brócoli de los grupos de muestras ensayados (1%, 5% y 10%) y los grados IBU, sería interesante repetir el ensayo para intentar establecer la causa de los resultados obtenidos.

#### **4.7 POLIFENOLES TOTALES**

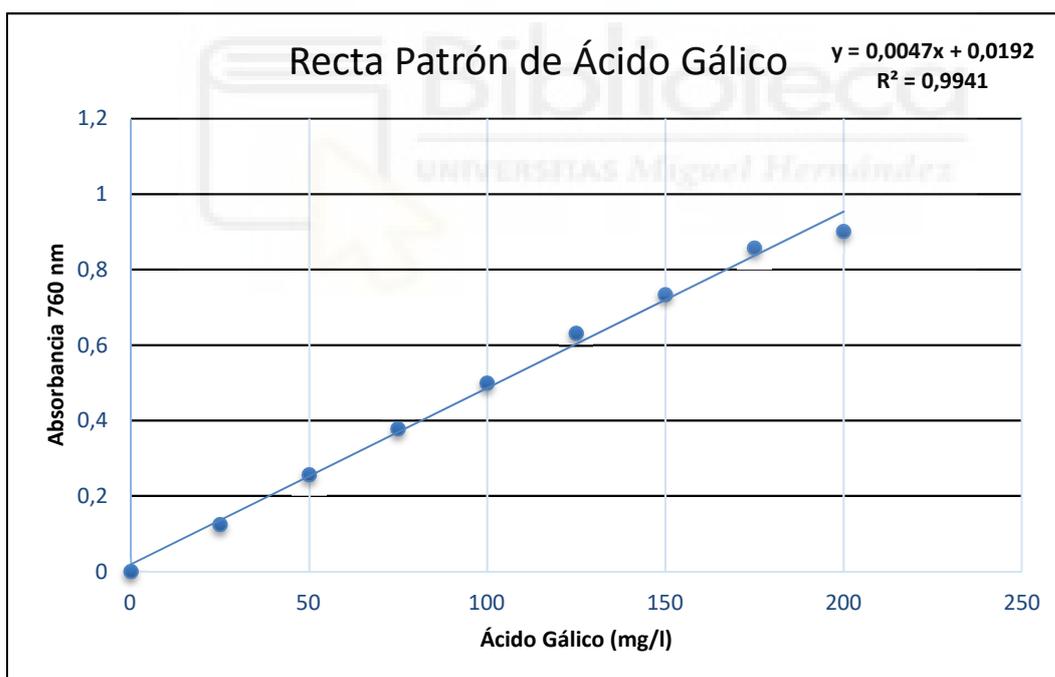
Los valores estándar de polifenoles totales (PT) contenidos en la cerveza varían notablemente dependiendo de la bibliografía que se consulte. Algunos artículos afirman que estos valores oscilan entre los 150 y los 200 mg/l (40).

Otras fuentes bibliográficas sitúan el límite superior por encima de los 600 mg/l y señalan la variación en el contenido en polifenoles totales con el tipo de cerveza y el tiempo de

almacenamiento (14). Mientras que otras fuentes sitúan los valores de PT contenidos en la cerveza entre los 50 y los 350 mg/l.

Las concentraciones de PT obtenidas en este ensayo se han calculado a partir de la ecuación que puede observarse en la **Gráfica 1. Recta Patrón de Ácido Gálico (AG)**, cuyas concentraciones y absorbancias correspondientes figuran en la siguiente tabla:

AG (mg/l)	ABS
0	0
25	0,124
50	0,256
75	0,378
100	0,499
125	0,631
150	0,733
175	0,857
200	0,901

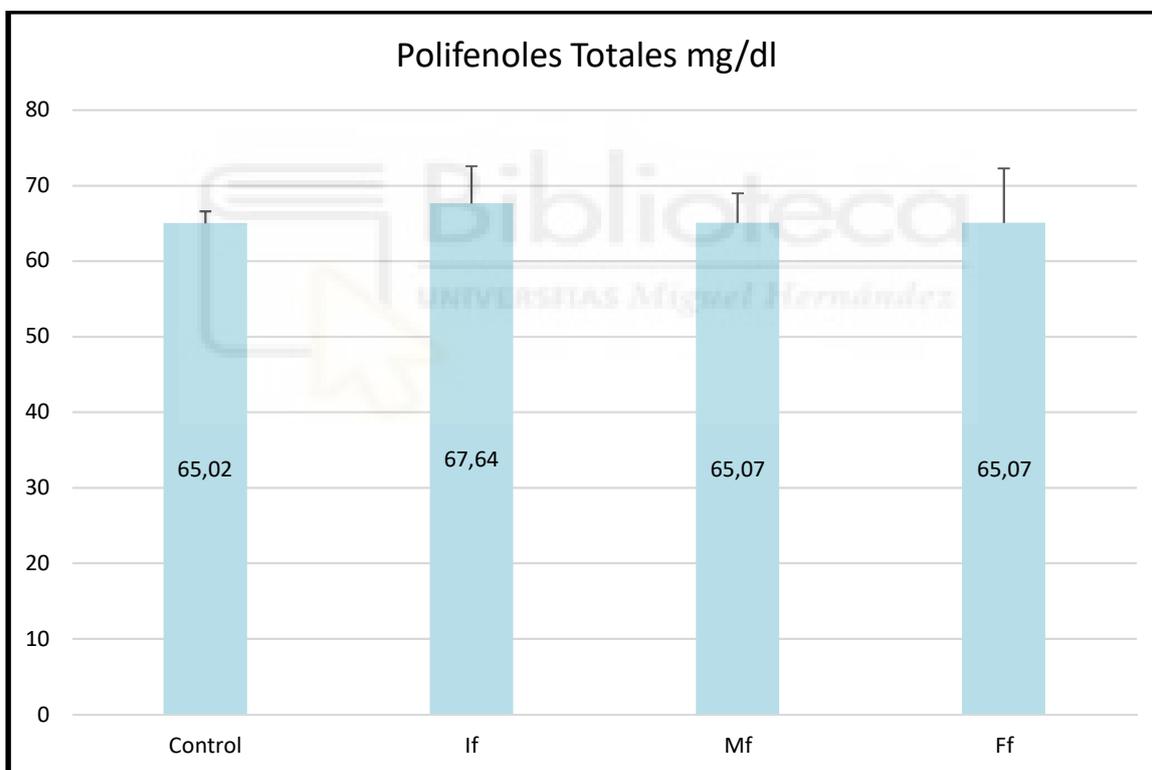


**Gráfica 1. Recta patrón Ácido Gálico.**

Se calculó la concentración de PT (mg/ml), utilizando los datos presentados en la **Tabla 1.7 Polifenoles totales (Anexo)** y la ecuación de la recta sobre todos los valores de absorbancia de los 4 grupos de muestras de Brocolipa: Controles, muestras de Inicio de Fermentación (If),

muestras de Mitad de Fermentación (Mf) y muestras de Final de Fermentación (Ff), teniendo en cuenta los volúmenes de muestra y diluyente usados durante la fase de extracción de los polifenoles: 2,5 ml de cerveza y 10 ml de metanol.

Una vez obtenidas las concentraciones de todas las muestras, se calculó la concentración media de cada grupo en mg/dl de Brocolipa. Los resultados obtenidos en el análisis de la concentración de polifenoles totales de la Brocolipa muestran que los controles tienen un contenido en polifenoles totales superior al resto de grupos de muestras, de este modo el grupo control presenta una concentración de PT igual a  $60,83 \pm 5,43$  mg/dl, mientras que el resto de grupos de muestras presentan una concentración menor, el grupo If presenta una media de concentración de PT de  $65,51 \pm 4,86$  mg/dl, el grupo Mf de  $62,97 \pm 3,86$  mg/dl y el grupo Ff de  $62,97 \pm 7,1$  mg/dl.



Gráfica 2. Polifenoles totales en los controles y muestras por categoría.

La media del contenido en polifenoles totales de las muestras de cerveza Brocolipa, a las cuales se les adicionó brócoli en polvo, es de  $63,77 \pm 1,39$  mg/dl, mientras que la media del contenido en polifenoles totales de las muestras control es de  $60,83 \pm 5,43$  mg/dl, lo que supone un aumento medio del contenido en PT de  $2,94$  mg/dl ( $29,4$  mg/l). Entre los tres grupos a los cuales se les adicionó el brócoli en polvo (If, Mf e If), el que mayor contenido en polifenoles totales presenta

es el grupo de Inicio de Fermentación (If) con un valor de  $65,51 \pm 4,86$  mg/dl, es decir, muestra un aumento respecto a los otros dos grupos de 2,54 mg/dl o 25,4 mg/l.

Basándonos en la bibliografía consultada, podemos afirmar que las concentraciones de polifenoles totales obtenidas en la cerveza Brocolipa se encuentran por encima del rango considerado estándar, sin embargo, la adición del brócoli en polvo no parece ser la causa exclusiva de los elevados niveles de polifenoles totales, ya que las muestras control presentan de media una concentración superior a la esperada según la bibliografía.

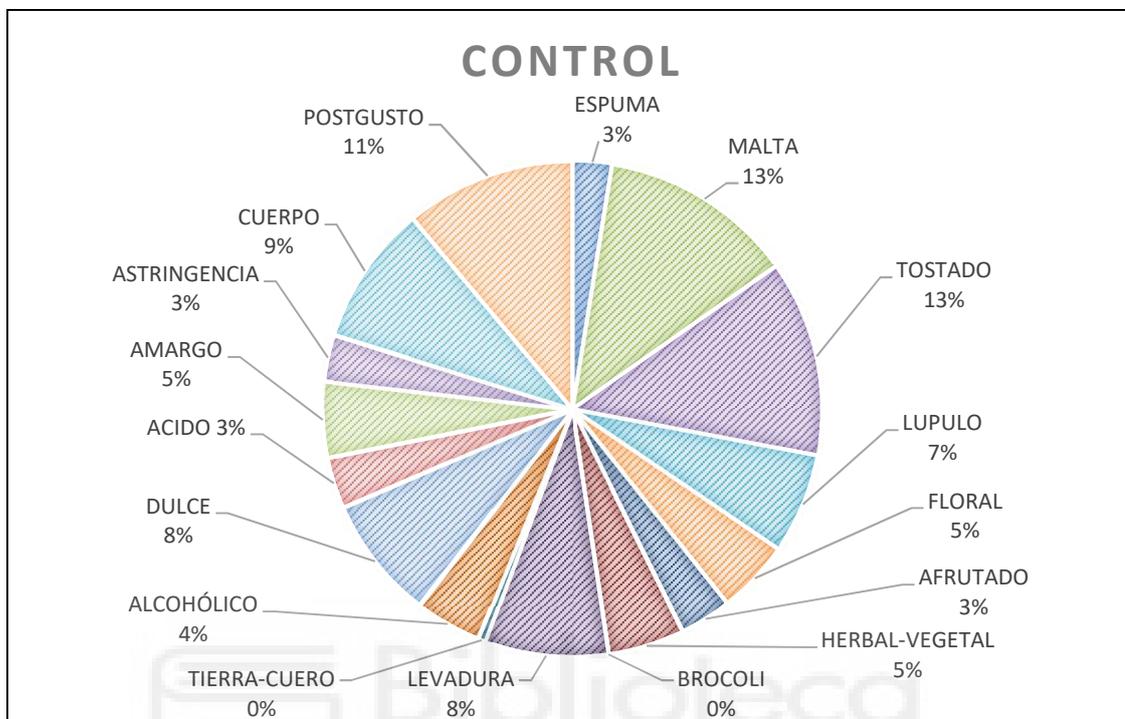
Debido al elevado contenido en distintos polifenoles presentes en el brócoli, y teniendo en cuenta que se ha utilizado una fórmula concentrada 100:1, respecto del brócoli en fresco (en forma de brócoli en polvo) la hipótesis que se planteaba, que consistía en que la cerveza Brocolipa debía presentar una concentración de polifenoles totales significativamente superior a los controles, no se ha visto confirmada por este ensayo, ya que el análisis de datos realizado aplicando la Prueba *t* mediante el uso del programa de Microsoft Excel, ha revelado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de PT de los controles y las muestras, ni tampoco entre los distintos grupos de muestras. Son muchas las variables que pueden afectar a la inestabilidad de los polifenoles procedentes de frutas y hortalizas, entre ellos la temperatura, el tratamiento aplicado para su conservación y el tiempo transcurrido desde la cosecha hasta que se consume (41), entre otros, y que explicarían un contenido en polifenoles totales menor al esperado.

Asimismo, hay que considerar un error de planteamiento en este ensayo, ya que no se realizó una determinación de polifenoles totales en una batería de soluciones a distintas concentraciones del brócoli en polvo que iba a ser utilizado. De haber sido así, esta determinación habría aportado información sobre la cantidad real de polifenoles que se estaban introduciendo en la cerveza con la adición de brócoli a la fórmula y habría esclarecido si los valores obtenidos se ajustan o no a la cantidad de polifenoles añadidos o, por el contrario, si se deben a otras causas como su degradación durante el proceso de fermentación y/o de almacenamiento.

#### **4.8 CATA DE LA CERVEZA**

La media de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros analizados se ha dividido en tres categorías para facilitar así la visualización de los datos, estas tres categorías corresponden a los grupos de Inicio de fermentación (If), Mitad de Fermentación (Mf) y Final de Fermentación (Ff), cada uno de ellos se representado frente al valor medio de los controles.

En primer lugar, se representan los resultados obtenidos para las muestras control:

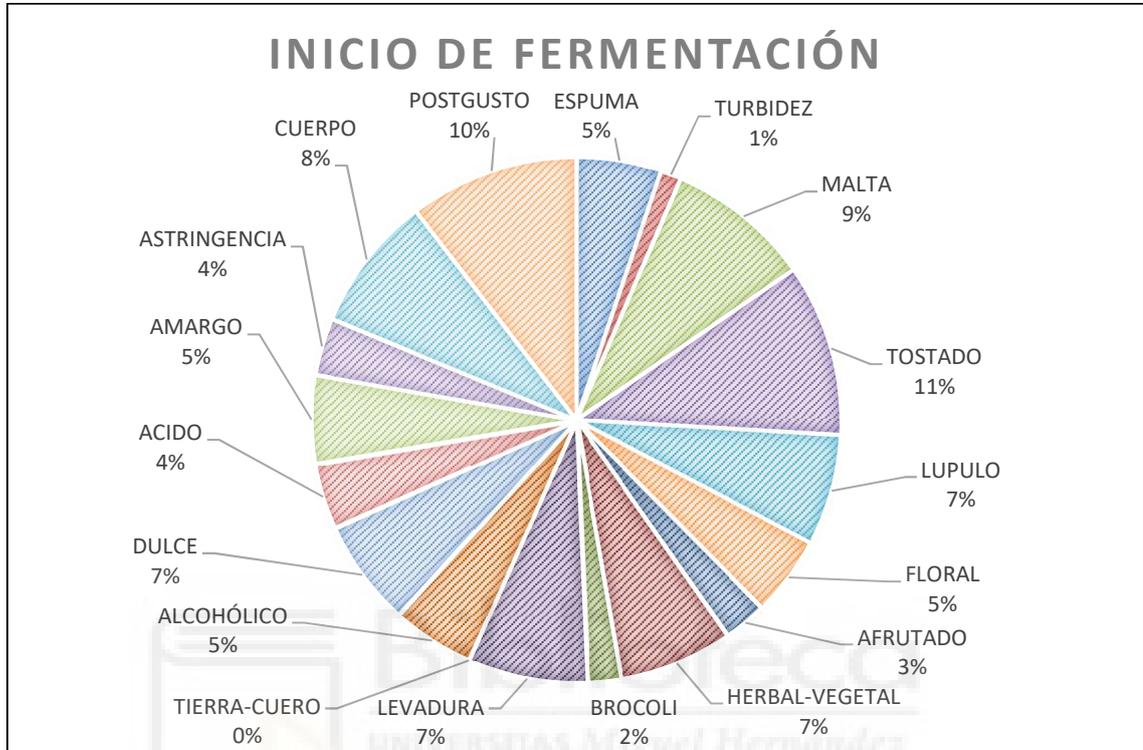


**Gráfica 3. Resultados de la cata de la muestra control.**

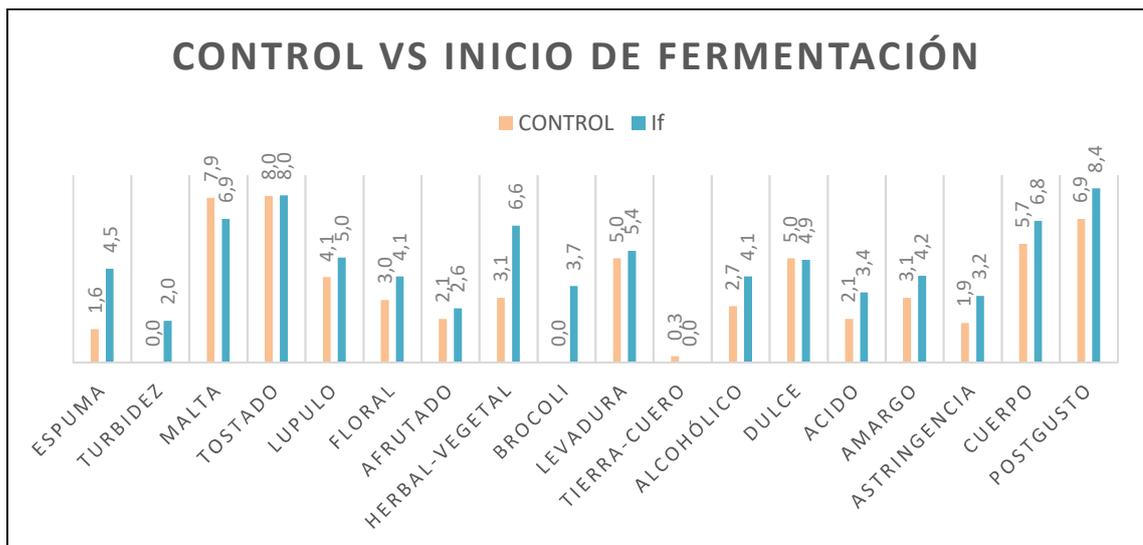
En el grupo de muestras control los participantes detectaron como predominantes los sabores de malta y tostado, con un 13% cada uno, seguidos por el sabor dulce y a levadura (ambos con el 8%), lúpulo (7%) y herbal-vegetal (5%). Como era de esperar, no se percibió sabor a brócoli, aunque sí se apreció cierto sabor floral de base.

Durante la sesión de cata, los participantes valoraron positivamente el cuerpo y el postgusto de la cerveza, considerando el producto de base (el control) agradable para el consumo.

En las siguientes gráficas se representaron los resultados de los parámetros valorados en la categoría de muestras de Inicio de Fermentación (If) (Gráfica 4) y comparativa entre la muestra control y la categoría If (Gráfica 5).

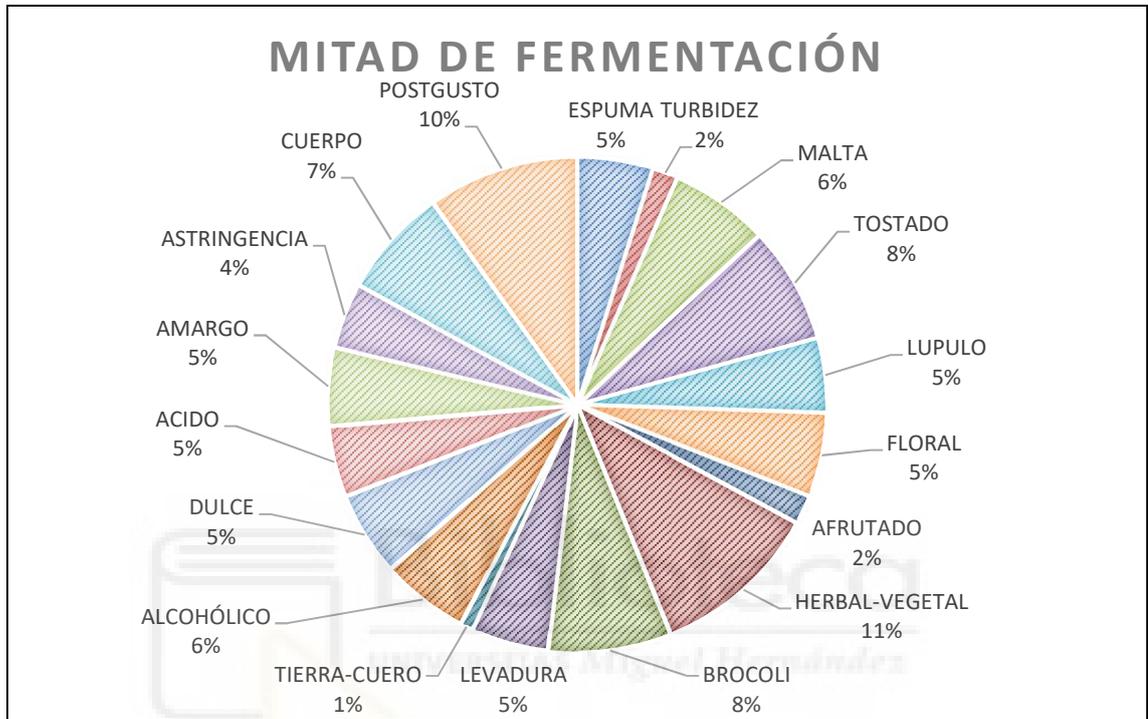


Gráfica 4. Resultados de la cata de la muestra Inicio de Fermentación.

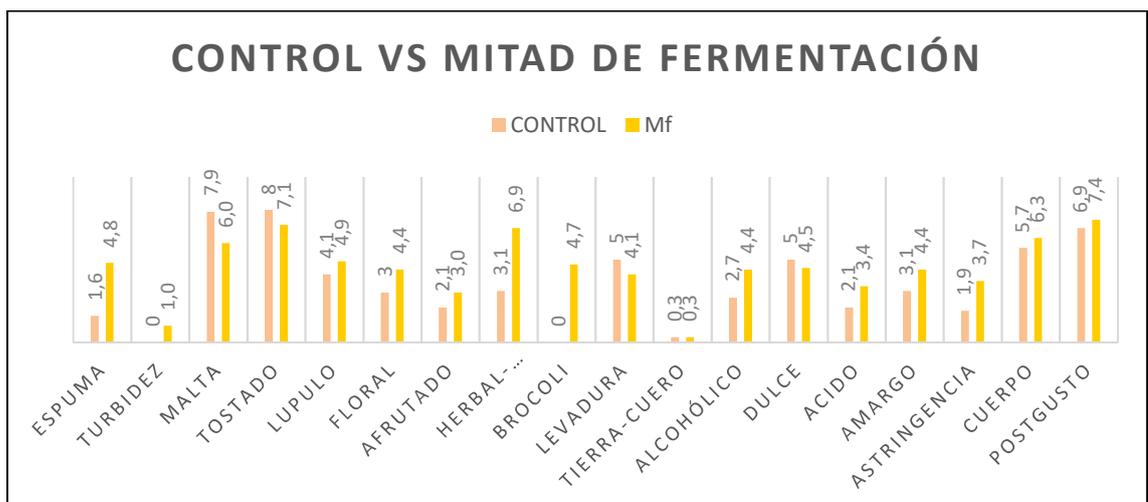


Gráfica 5. Comparativa entre la muestra control y la muestra If.

En el grupo de muestras en las que se adicionó el brócoli en polvo al inicio de la fermentación, los participantes valoraron que los sabores a malta, tostado, levadura y el dulce, seguían siendo los sabores predominantes. En este grupo, sin embargo, sí se apreció un ligero aumento del sabor herbal-vegetal, pasando del 5% al 7% y se apreció un sutil sabor a brócoli (2%). También se apreció un ligero aumento de la percepción del alcohol.

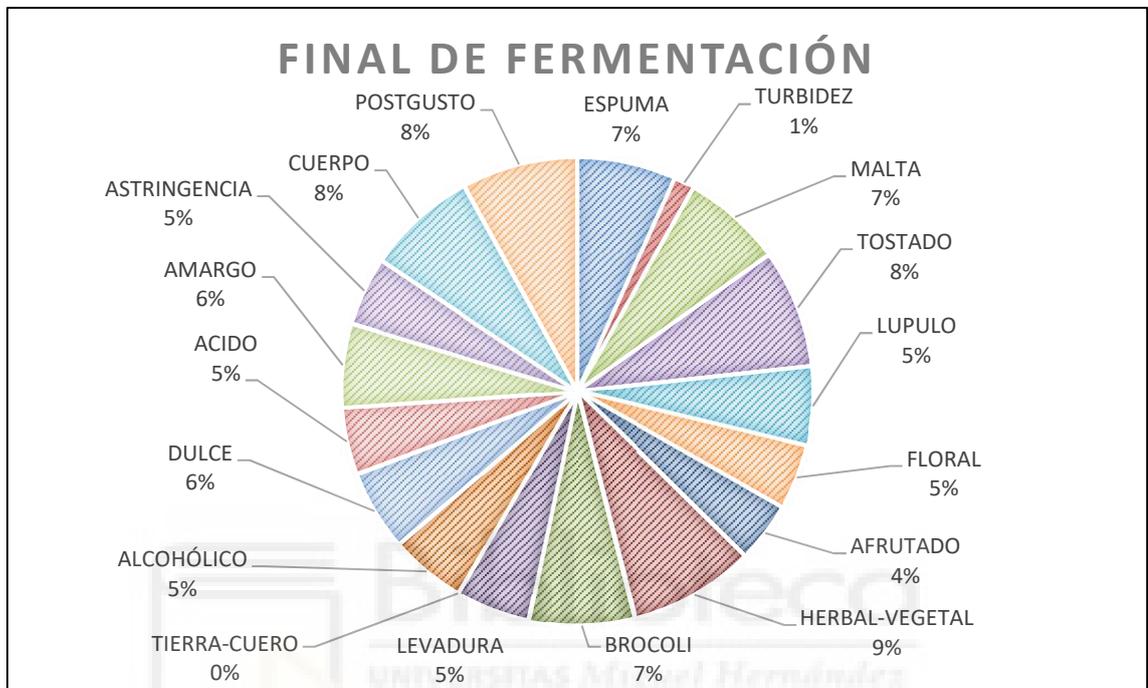


Gráfica 6. Resultados de la cata de la muestra Inicio de Fermentación.

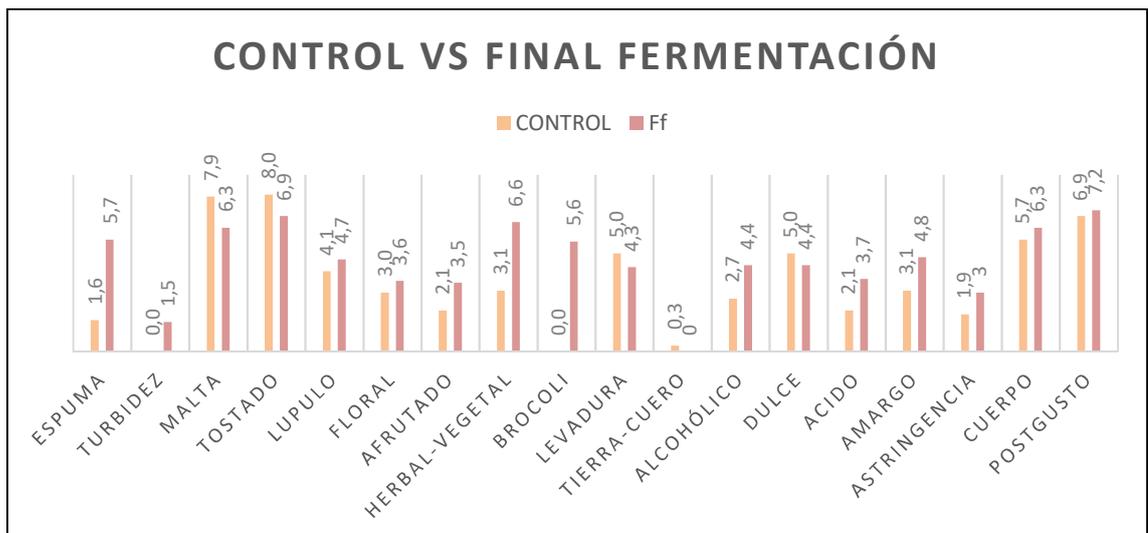


Gráfica 7. Comparativa entre la muestra control y la muestra Mf.

El grupo de muestras a las que se adicionó el brócoli en polvo a mitad de la fermentación, presentaron como sabores predominantes el herbal-vegetal, pasando de un 5% en el control a un 11%, el de brócoli y tostado, ambos con el 8%. Asimismo, la percepción del alcohol aumentó de un 4% a un 6%, respecto al control, mientras que el sabor dulce disminuyó, de un 8% en el control, a un 5%.



Gráfica 8. Resultados de la cata de la muestra Inicio de Fermentación.

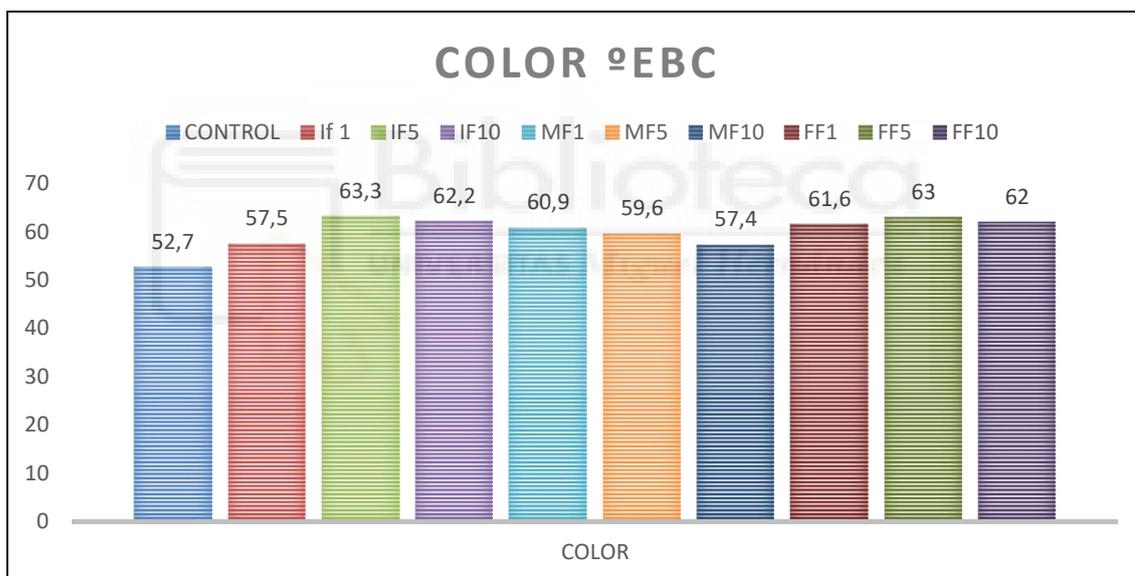


Gráfica 9. Comparativa entre la muestra control y la muestra Ff.

Según las valoraciones de los asistentes a la cata de cerveza Brocolipa, la adición del brócoli al inicio de la fermentación disminuyó la intensidad del sabor brócoli en el producto final, sin embargo, todos los grupos que contenían brócoli fueron valorados con un predominante aroma herbal-vegetal respecto a los controles.

También cabe destacar el efecto en la percepción del sabor a malta y tostado que parece ejercer la adición del brócoli, ya que los participantes coincidieron en que estos sabores predominaron en las cervezas control, mientras que en todos los grupos que contenían brócoli la percepción de los sabores a malta y tostado disminuyeron considerablemente.

Otros parámetros que destacaron por su aumento considerable respecto a los controles en las cervezas que contenían brócoli, son los de astringencia, acidez, amargor y sabor a alcohol, los participantes percibieron que la adición de brócoli aumentaba notablemente en estos parámetros.



**Gráfica 10. Resultados de la valoración del color en todas las categorías y concentraciones.**

Respecto al color y teniendo en cuenta que los valores obtenidos se basaron en una comparación visual entre las muestras y la escala EBC, por lo que son totalmente subjetivos, no se puede decir que los participantes apreciaran diferencias significativas entre los distintos grupos de cerveza, como puede observarse en la Gráfica 10 Color °EBC, aunque sí se observa que los participantes apreciaron visualmente que el color de las muestras era mucho más oscuro que el determinado mediante espectrofotometría, probablemente debido a un defecto de impresión de la tabla EBC empleada en la comparación.

## **5 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA**

De la realización de este trabajo se extrae que la elaboración de cerveza artesana es relativamente sencilla y que la aplicación de distintos alimentos a los que se les atribuyen ciertas propiedades funcionales durante el proceso de elaboración de la cerveza es una vía interesante y poco explorada de creación de nuevos productos alimentarios.

El producto resultante de este trabajo ha logrado cumplir con dos objetivos importantes: el primero, obtener un producto con un elevado contenido en polifenoles totales, ya que esta fórmula de cerveza artesana presenta una concentración de polifenoles totales equiparable al de las cervezas negras, las cuales, de todos los tipos de cervezas, son las que mayor concentración de polifenoles totales contienen (14).

El segundo objetivo alcanzado ha sido la obtención de un producto artesano de calidad aceptable según la normativa vigente y cuyas características organolépticas y sensitivas han agradado a una muestra de potenciales consumidores.

Sin embargo, tras este proceso de elaboración artesana de cerveza, ha quedado en evidencia la gran variabilidad, tanto analítica como sensorial, existente dentro de las muestras de un mismo grupo. Asimismo, tampoco ha sido posible establecer una relación entre la concentración de polifenoles totales de la cerveza artesana y la fase del proceso en la cual se adiciona el brócoli en polvo, siendo esta concentración independiente del momento en el que se adicionara el vegetal.

De cara al futuro, sería interesante investigar en el desarrollo de procesos de elaboración que logren retener una mayor concentración de compuestos fenólicos y que permitan la adición combinada de frutas y hortalizas en la producción de cerveza artesana, asegurando la calidad y reproducibilidad de los productos obtenidos.

## 6 ANEXO

En este anexo se incluyen las tablas con los datos a partir de los cuales se han obtenido los valores que se incluyen en el apartado 4. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**.

**Tabla 1.1 pH**

Muestra	pH 1	pH 2	Media pH
Control 1	4,45	4,45	4,45
Control 2	4,43	4,44	4,435
If1	4,22	4,23	4,225
If1'	4,43	4,43	4,43
If5	4,43	4,45	4,44
If5'	4,45	4,43	4,44
If10	4,47	4,49	4,48
If10'	4,47	4,5	4,485
Mf1	4,52	4,51	4,515
Mf1'	4,5	4,49	4,495
Mf5	4,43	4,43	4,43
Mf5'	4,51	4,5	4,505
Mf10	4,57	4,55	4,56
Mf10'	4,43	4,41	4,42
Ff1	4,38	4,39	4,385
Ff1'	4,42	4,41	4,415
Ff5	4,5	4,51	4,505
Ff5'	4,51	4,53	4,52
Ff10	4,42	4,43	4,425
Ff10'	4,46	4,46	4,46

**Tabla 1.2 Acidez**

Muestra	ACIDEZ	Muestra	ACIDEZ
Control 1	0,418	Mf5	0,51
Control 2	0,424	Mf5'	0,342
If1	0,448	Mf10	0,394
If1'	0,427	Mf10'	0,428
If5	0,426	Ff1	0,472
If5'	0,425	Ff1'	0,455
If10	0,386	Ff5	0,388
If10'	0,386	Ff5'	0,391
Mf1	0,392	Ff10	0,454
Mf1'	0,387	Ff10'	0,406

**Tabla 1.3 Absorbancias 340 nm (EBC)**

Muestra	ABS(430nm)1	ABS 2	ABS 3	Media
C1	0,605	0,606	0,605	0,605
C2	0,633	0,753	0,627	0,671
If1	0,575	0,574	0,61	0,586
If1'	0,676	0,666	0,672	0,671
If5	0,651	0,641	0,674	0,655
If5'	0,663	0,666	0,658	0,662
If10	0,757	0,771	0,764	0,764
If10'	0,777	0,779	0,798	0,784
Mf1	0,664	0,654	0,665	0,661
Mf1'	0,556	0,623	0,654	0,611
Mf5	0,617	0,61	0,616	0,614
Mf5'	0,632	0,622	0,632	0,628
Mf10	0,711	0,726	0,719	0,718
Mf10'	0,61	0,615	0,612	0,612
Ff1	0,619	0,614	0,617	0,616
Ff1'	0,648	0,636	0,647	0,643
Ff5	0,648	0,641	0,644	0,644
Ff5'	0,652	0,663	0,662	0,659
Ff10	0,615	0,609	0,616	0,613
Ff10'	0,641	0,652	0,651	0,648

**Tabla 1.4 Absorbancia 700 nm (EBC)**

Muestra	ABS(700nm) 1	ABS 2	Media ABS
Control 1	0,051	0,052	0,0515
Control 2	0,074	0,076	0,075
If1	0,059	0,063	0,061
If1'	0,053	0,053	0,053
If5	0,13	0,119	0,1245
If5'	0,145	0,143	0,144
If10	0,076	0,074	0,075
If10'	0,056	0,057	0,0565
Mf1	0,049	0,052	0,0505
Mf1'	0,055	0,053	0,054
Mf5	0,143	0,147	0,145
Mf5'	0,049	0,052	0,0505
Mf10	0,53	0,056	0,293
Mf10'	0,069	0,065	0,067
Ff1	0,056	0,054	0,055
Ff1'	0,051	0,047	0,049
Ff5	0,049	0,049	0,049
Ff5'	0,052	0,059	0,0555

Ff10	0,05	0,056	0,053
Ff10'	0,064	0,061	0,0625

**Tabla 1.5 °EBC**

Muestra	Media ABS (430nm)	°EBC (ABSx25xD)
Control 1	0,605	30,25
Control 2	0,671	33,55
If1	0,586	29,3
If1'	0,671	33,55
If5	0,655	32,75
If5'	0,662	33,1
If10	0,764	38,2
If10'	0,784	39,2
Mf1	0,661	33,05
Mf1'	0,611	30,55
Mf5	0,614	30,7
Mf5'	0,628	31,4
Mf10	0,718	35,9
Mf10'	0,612	30,6
Ff1	0,616	30,8
Ff1'	0,643	32,15
Ff5	0,644	32,2
Ff5'	0,659	32,95
Ff10	0,613	30,65
Ff10'	0,648	32,8

**Tabla 1.6 °IBU**

Muestra	ABS 1 (275 nm)	ABS 2	Media ABS	ABS x 50=IBU	IBU x 2
Control 1	0,215	0,223	0,219	10,95	21,9
Control 2	0,222	0,219	0,2205	11,025	22,05
If1	0,198	0,193	0,1955	9,775	19,55
If1'	0,116	0,115	0,1155	5,77	11,54
If5	0,142	0,139	0,1405	7,025	14,05
If5'	0,178	0,174	0,176	8,8	17,6
If10	0,137	0,138	0,1375	6,875	13,75
If10'	0,14	0,142	0,141	7,05	14,1
Mf1	0,116	0,117	0,1165	8,475	16,95
Mf1'	0,212	0,213	0,2125	10,625	21,25
Mf5	0,194	0,194	0,194	9,7	19,4
Mf5'	0,228	0,226	0,227	11,35	22,7
Mf10	0,157	0,153	0,155	7,75	15,5
Mf10'	0,206	0,205	0,2055	10,275	20,55
Ff1	0,175	0,169	0,172	8,6	17,2
Ff1'	0,162	0,165	0,1635	8,175	16,35
Ff5	0,206	0,201	0,2035	10,175	20,35
Ff5'	0,22	0,223	0,2215	11,075	22,15
Ff10	0,205	0,202	0,2035	10,175	20,35
Ff10'	0,176	0,174	0,175	8,75	17,5

**Tabla 1.7 Polifenoles totales**

Muestra	ABS 1 (760 nm)	ABS 2 (760 nm)	Media ABS	PT mg/dl	Media PT mg/dl
T1Control 1	0,757	0,81	0,7835	62,9517	60,832225
T2Control 1	0,697	0,67	0,8079	64,9979	
T1Control 2	0,761	0,796	0,7785	62,5324	
T2Control 2	0,644	0,682	0,663	52,8469	
T1 If10	0,896	0,892	0,894	72,21	65,507395
T2 If10	0,8	0,797	0,7985	64,2096	
T1 If10'	0,756	0,755	0,7555	60,6037	
T2 If10'	0,797	0,808	0,808	65,00628	
T1 Mf10	0,782	0,721	0,7515	60,2683	62,972025
T2 Mf10	0,851	0,841	0,846	68,19	
T1 Mf10'	0,739	0,754	0,7465	59,8491	
T2 Mf10'	0,79	0,792	0,791	63,5807	
T1 Ff10	0,869	0,867	0,868	70,0377	62,972725
T2 Ff10	0,678	0,654	0,666	53,0985	
T1 Ff10'	0,809	0,788	0,7985	64,2096	
T2 Ff10'	0,809	0,796	0,8025	64,5451	

**Tabla 1.8 Cata de Brocolipa (Valores medios por categoría y concentración)**

	CONTROL	IF 1	IF5	IF10	MF1	MF5	MF10	FF1	FF5	FF10
COLOR	52,7	57,5	63,3	62,2	60,9	59,6	57,4	61,6	63	62
ESPUMA	1,6	4,1	4,5	4,9	4,1	5	5,2	5,7	6,4	5,1
TURBIDEZ	0	1	2,1	2,9	1,4	0,6	1	1,2	1,2	2
MALTA	7,9	7	7	6,7	5,4	6,9	5,8	5,8	6,6	6,5
TOSTADO	8	8,4	8	7,7	6,4	8	6,8	6,9	7,1	6,8
LUPULO	4,1	5,4	4,9	4,8	4,1	5,3	5,2	4,6	4,8	4,6
FLORAL	3	3,9	3,9	4,6	4,6	4,8	3,9	3,8	4,1	2,9
AFRUTADO	2,1	2,1	2,7	3	1,6	4,2	3,1	3,5	3,3	3,8
HERBAL-VEGETAL	3,1	5,5	6,8	7,4	9,2	5,2	6,2	7,3	5,9	6,5
BROCOLI	0	1,6	4,1	5,3	6,7	3,4	4	6,1	5,6	5,1
LEVADURA	5	5,8	5,1	5,2	4,2	3,8	4,2	4,3	4,4	4,2
TIERRA-CUERO	0,3	0	0	0	0,7	0	0,1	0	0	0
ALCOHÓLICO	2,7	4	4,3	4,1	4,8	4	4,3	4,4	4,3	4,4
DULCE	5	5,2	4,5	5,1	4,6	4,7	4,3	4,7	4,4	4,2
ACIDO	2,1	3,2	3,6	3,3	3,9	3,1	3,2	3,9	3,4	3,9
AMARGO	3,1	4,3	4,3	3,9	4,3	3,9	5,1	4,9	4,7	4,7
ASTRINGENCIA	1,9	2,8	3,3	3,5	3,6	3,3	4,2	4	4,1	3,8
CUERPO	5,7	6,6	6,9	6,9	6	6,3	6,5	6,4	6,2	6,4
POSTGUSTO	6,9	8,2	8,4	8,5	8,22	6,8	7,3	6,7	7,3	7,6

**Tabla 1.9 Cata de Brocolipa (Valores medios por categoría)**

	CONTROL	If	Mf	Ff
ESPUMA	1,6	4,5	4,8	5,7
TURBIDEZ	0,0	2,0	1,0	1,5
MALTA	7,9	6,9	6,0	6,3
TOSTADO	8,0	8,0	7,1	6,9
LUPULO	4,1	5,0	4,9	4,7
FLORAL	3,0	4,1	4,4	3,6
AFRUTADO	2,1	2,6	3,0	3,5
HERBAL-VEGETAL	3,1	6,6	6,9	6,6
BROCOLI	0,0	3,7	4,7	5,6
LEVADURA	5,0	5,4	4,1	4,3
TIERRA-CUERO	0,3	0,0	0,3	0,0
ALCOHÓLICO	2,7	4,1	4,4	4,4
DULCE	5,0	4,9	4,5	4,4
ACIDO	2,1	3,4	3,4	3,7
AMARGO	3,1	4,2	4,4	4,8
ASTRINGENCIA	1,9	3,2	3,7	4,0
CUERPO	5,7	6,8	6,3	6,3
POSTGUSTO	6,9	8,4	7,4	7,2

## 7 BIBLIOGRAFÍA

1. Juan-Teserras, J. *La cerveza: Un producto de consumo básico entre las comunidades ibéricas del N.E. peninsular*. 2000.
2. Charnet, D. *Biología y Producción Agroalimentaria. Problemas del desarrollo*, 19 (74), 7-52. 1998.
3. J. Wang, L. Liu, T. Ball, L. Yu, Y. Li y F. Xing. *Revealing a 5000 years old beer recipe in China*. 2016.
4. Max Nelson. *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*. 2005.
5. Á. Rojo Guerra, M., García-Martínez de Lagrán, I., Garrido Pena, R. *La elaboración experimental de cerveza prehistórica en el valle de Ambrona*. 2002.
6. A. Blasco, M. Edo, M.J. Villalba. *Evidencias de procesado y consumo de cerveza en la cueva de Can Sadurní (Begues, Barcelona) durante la Prehistoria*. 2006.
7. Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. B.O.E.
8. Aizpuru et al. (1999), Benito et al. (2000), Canals (2002), Delgado (2000), GRIN (2007), Hernández (1995), Suttie (2003). Herbario de la Universidad Pública de Navarra, Departamento de Producción Agraria.
9. IUPAC Compendium of Chemical Terminology Gold Book versión 2.3.2 IUPAC, 2012.
10. Martínez, Muñoz, A. *Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial*. 2015.
11. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas.
12. Suárez, Díaz, M. 2013. *Cerveza: Componentes y propiedades*.
13. Valls Bellés, V., Codoñer, Franch, P., González, San-José, M.L, Muñoz, Rodríguez, P. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante "in vivo". 2005.
14. González, San-José, M.L., Muñoz, Rodríguez, P. y Valls, Bellés, V. *Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo*. 2001.
15. Rovira A., Suárez Á. y Saldo J. *Cambios en la extracción de polifenoles y su efecto antioxidante en el macerado a alta concentración (High gravity mashing)*. 2012.
16. García, L.A. *Biología de la producción de cerveza*. 2013.
17. Mitch Steele. *IPA: Brewing Techniques, Recipes and the Evolution of India Pale Ale*. Ed. Brewers Publications. 2012.
18. Vallejo, G.A. *Bebidas (MF1047\_2)*. Ed. Paraninfo. 2017.

19. Campas-Baypoli, O.N; Bueno-Solano, C; Martínez-Ibarra, D.M; Camacho-Gil, F; Villa- Lerma, A.G; et al. *Sulforaphane (1-isothiocyanato-4-methylsulfinyl)-butane) content in cruciferous vegetables*. 2009.
20. Rosa, E. A. and Rodrigues, P. M. F. *Towards a more sustainable agriculture system. The effect of glucosinolates on the control of soil-borne diseases*. J. Hort Sci Biotechnol. 74:667-674. 1999.
21. Casar Fernández C., Muñoz-Guerra Revilla L.M., Ordiales Rey E. y López González J. *Efectos de fertilizantes con el inhibidor de la nitrificación 3,4 dimetilpirazol fosfato en la producción, rentabilidad y calidad nutricional de un cultivo de brócoli*. Jornadas Técnicas SECH, La Rioja, 2007.
22. Fahey J.W., Zhang, Y. and P. Talatay. *Broccoli sprout: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against carcinogens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10267-10372. 1997.
23. Imtiaz Ahmad Siddiqui, Vaqar Mustafa Adhami, Farrukh Afaq, Nihal Ahmad, Hasan Mukhtar. *Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein B-and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells*. Journal of celular biochemistry 91 (2), 232-242, 2004.
24. Lozano L., Tálamo A., Artinian A.L, Fernández J. y Arroyo C. *Evaluación de dos híbridos de brócoli (Brassica oleracea var. italica)*. Valle de Lerma, Salta. Argentina.
25. Jaramillo, J. y Díaz, C. *El cultivo de las crucíferas. Brócoli, coliflor. Repollo, col china*. Manual técnico 20. CORPOICA. Colombia. 176 pág. 2006
26. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in plant science 2 (4), 152-159, 1997.
27. Nestle, M. *Broccoli sprouts in cancer prevention*. Nutrition reviews 56 (4), 127-130, 1998.
28. Verhoeven, D.T., Goldbohm R.A., Van Poppel G., Verhagen, H., Van den Brandt P.A. *Epidemiological studies on brassica vegetables and cáncer risk*. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers 5 (9), 733-748, 1996.
29. Vallejo, F., Tomás-Barberán, F.A. y Ferreres F. *Characterisation of flavonols in broccoli (Brassica oleracea L. var. itálica) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1054 (1-2), 181-193, 2004.
30. Koh, E., Wimalasiri, K.M.S, Chassy, A.W, Mitchell, A.E. *Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in comercial broccoli*. Journal of food composition and analysis 22 (7-8), 637-643, 2009.

31. Waladkhani, A.R., Clemens, M.R. *Preventive and therapeutic effects of dietary phytochemicals on cancer development. Functional Foods and Nutraceuticals in Cancer Prevention*, 179-197, 2003.
32. López-Revuelta, A., Sánchez-Gallego, J.I., Hernández-Hernández, A., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M. *Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. Chemico-biological interactions* 161 (1), 79-91. 2006.
33. Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillen, F., Castillo, S., Valero, D. *Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. Postharvest Biology and Technology* 39 (1), 61-68, 2006.
34. Rice-Evans, C. Miller, J.M., Paganga, G. *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine* 20 (7), 933-956. 1996.
35. Álvarez Castro, E., Orallo Cambeiro, F. *Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Offarm: Farmacia y Sociedad* 22 (10), 130-140. 2003.
36. Lovibond, J.W. *Lovibond Beer Colour Database*. 2008.
37. Caballero, I., Blanco, C.A., Porras, M. *Iso-alpha-acids, bitterness and loss of beer quality during storage. Trends in Food Science & Technology* 26 (1), 21-30. 2012.
38. Miranda, C.L., Stevens, J.F., Helmrich, A., Henderson, M.C., Rodriguez, R.J., Yanga, Y.H., Deinzer, M.L., Barnes, D.W., Buhler, D.R. *Antiproliferative and cytotoxic effects on prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology*. 37 (4), 271-285. 1999.
39. García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica*. 2015.
40. MEBAK, Wort, Beer, Beer-Based Beverages, 1ªEd. 273-ss. 2012.
41. Cofré Martínez, A. *Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de jugo de murtillo obtenido por condensación de vapor*. 2015.
42. Real Decreto 53/1995, de 20 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta líquida. B.O.E

43. Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2016. Cerveceros de España y el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España.
44. Bamforth C.W. *Nutritional Aspects of Beer*. 2002.
45. Association of official analytical chemist (AOAC). Official methods of analysis. 12ª Edición. The Association: Washington, D.C. 942 P. 1995.

