



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



SALINA

Master Universitario

Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

CERVEZAS FERMENTADAS CON
LEVADURAS NO-*SACCHAROMYCES*
Y ENRIQUECIDAS CON
ANTOCIANOS NATURALES

Elena Alonso Gutiérrez

Julio 2025



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



SALINA

Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud

Master Universitario



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

CERVEZAS FERMENTADAS CON
LEVADURAS NO-*SACCHAROMYCES*
Y ENRIQUECIDAS CON
ANTOCIANOS NATURALES

Autor: Elena Alonso Gutiérrez

Tutor: Antonio Dionisio Morata Barrado

Cotutor: Carmen López Díaz

Julio 2025

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Carmen López y Antonio Morata. Por su supervisión y por ser Profesores, con P mayúscula. Por la confianza depositada y por darme esta y todas las oportunidades que me han dado. A todo el personal de laboratorio, por darme ganas de ir a trabajar y por tener siempre mil manos. A Chang, que en todas las ocasiones dejó lo que estaba haciendo para enseñarme cosas de cajón; y por enseñarme el truco de las placas en pirámide.

A cervezas Dougall's, porque es de donde vengo y donde descubrí mi vocación. En especial a Víctor y a Juanjo, por todo lo que me enseñaron. Se me hincha el corazón de orgullo cuando veo vuestras cervezas en algún garito de Madrid.

A mis padres. Porque son mis padres y nunca me ha faltado de nada. Mi madre a veces dice que ellos no pudieron estudiar y que hay mucho que no me pueden enseñar. A mí, mis padres me han enseñado amor incondicional, sacrificio y resiliencia ante todas las situaciones de la vida. Que nada ni nadie es irremplazable ni imprescindible. Vosotros sí. Muchas gracias por todo lo que hacéis y habéis hecho por mí, os habéis desvivido y me siento una hija muy querida. A mi hermano Mígui, porque es mi hermano y es el mejor hermano del mundo.

A mi abuelo Cuco, que es mi mejor amigo. Me llevaba a inglés, a piscina, a baile y al conservatorio. Y me hacía bocadillos de chorizo al microondas y de queso con manzana. Cuando era pequeña me enseñó a sumar y a restar. A lavarme los dientes. De mayor, me ha enseñado cosas más importantes; a ser constante y a trabajar, y a descansar, a no hacer nada y sentirme plena. Somos dos: Cuco y Nini, y suyos son, siempre, el 50% de mis logros. De los cumplidos y de los que quedan por cumplir. A mi abuela Bibi, por criarme.

A mis amigos, a los de siempre. A Elena, a Bea, a Inés, a Juan, a Nuria, a Alba, a Laura, a Andrés... después de todo siguen aquí, aunque ya no esté León. Nunca os lo digo, pero os quiero mucho.

Por supuesto, a Álex. Que se merece mucho más que un párrafo en estos agradecimientos. Que siempre sabe cuándo y cómo estar. Álex, tu refuerzo y apoyo diarios me inspiran todos los días de mi vida a darlo todo y a ser la mejor versión de mí misma. Nos conocimos siendo dos niños y hemos crecido muchísimo juntos. Tengo una suerte inmensa de que estés en mi vida. Te quiero.

A Alba y a Blanca, por ser mis primeras y mejores amigas en Madrid. Porque habéis conseguido algo terriblemente difícil: entrar. Con vosotras todo ha sido increíblemente fácil. A partir de ahora, recordaré los miércoles con mucho, muchísimo cariño.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	6
4. MARCO TEÓRICO	9
4.1. La cerveza: introducción y contexto histórico.....	9
4.2. Proceso de elaboración del mosto de cerveza	10
4.3. Antocianos.....	15
4.4. Uso de fruta en las cervezas	17
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1. Reactivos y materiales	18
3.2. Elaboración del mosto de cerveza	20
3.3. Ensayo de implantación.....	21
3.4. Fermentación	22
3.5. Guarda	24
3.6. Embotellado y segunda fermentación	26
3.7. Análisis instrumental	26
3.8. Análisis sensorial.....	32
3.9. Análisis estadístico.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	70
6. ANEXOS	81
6.1. Hoja de cata	81

1. RESUMEN

En los últimos años, la demanda de cervezas artesanas sin alcohol con propiedades funcionales y sensoriales únicas ha aumentado notablemente, impulsada por el interés en un estilo de vida saludable y nuevas experiencias. En este contexto, la industria cervecera busca métodos alternativos para producir cervezas *sour* reduciendo tiempo y costes. Una alternativa es reemplazar la acidificación bacteriana tradicional con levaduras no-*Saccharomyces*. La incorporación de compuestos antioxidantes contribuye a la singularidad y mayor valor nutricional del producto resultante. Este estudio explora el uso combinado de *Lachancea thermotolerans* L31 y *Metschnikowia pulcherrima* M29 en la elaboración de cervezas con arándanos o enriquecidas con antocianos. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos como pH, color, amargor, polifenoles totales, capacidad antioxidante, perfiles de antocianos y volátiles, además de una evaluación sensorial. Los resultados mostraron que tanto la adición de arándanos o antocianos, como la fermentación con *Lachancea-Metschnikowia* influyeron significativamente en las propiedades químicas y sensoriales de las cervezas. Esta estrategia permite obtener cervezas con un perfil distintivo y beneficios funcionales, marcando un avance en la elaboración de cervezas artesanales y abriendo nuevas líneas de investigación y desarrollo en el sector.

2. ABSTRACT

In recent years, the demand for alcohol-free craft beers with functional properties and unique sensory characteristics has increased significantly. In this context, the brewing industry is seeking alternative methods to produce *sour* beers with reduced production time and costs. For example, replacing traditional bacterial acidification with non-*Saccharomyces* yeasts during fermentation. This study explores the combined use of *Lachancea thermotolerans* L31 and *Metschnikowia pulcherrima* M29 in the production of beers with blueberries or enriched with anthocyanins. Physicochemical parameters such as pH, color, bitterness, total polyphenols, antioxidant capacity, and anthocyanin and volatile profiles were evaluated, along with a sensory analysis. The results showed that both the addition of blueberries or anthocyanins and fermentation with *Lachancea-Metschnikowia* significantly influenced the chemical and sensory properties of the beers. This strategy enables the production of beers with a distinctive profile and functional benefits, representing a step forward in craft beer development and opening new avenues for research and innovation in the sector.

3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La cerveza es la bebida alcohólica más antigua y consumida actualmente en el mundo, por encima del vino y de otros licores. Desde su descubrimiento, ha jugado un papel vital como base de la nutrición y como rasgo cultural de las sociedades que la producían. En su sentido estricto, la cerveza se define como “un alimento resultante obtenido de la fermentación mediante levaduras seleccionadas de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales”; y se elabora con malta de cebada u otros cereales amiláceos en una proporción menor del 50%, agua, lúpulo y levaduras (1,2).

En un contexto evolutivo y dinámico, la receta primaria original de la cerveza se ha ido modificando y adecuando a las necesidades y gustos de los consumidores, impulsando el surgimiento de una gran variedad de tipos de cervezas con distintos sabores, aromas y características. Hoy en día, existen más de 150 estilos distintos de cervezas artesanas, por lo que las cerveceras están experimentando un crecimiento exponencial tanto en tamaño como en demanda (3,4).

El consumo de cervezas sin alcohol o con baja graduación alcohólica pasó del 1,8% hasta el 3,8% de 2013 a 2019, aumentando la demanda de cervezas sin alcohol en un 13,5% sobre la producción total (5). La persecución de un estilo de vida sano por parte de los consumidores pasa por reducir la ingesta de alcohol, y por tanto la demanda actual se enfoca en cervezas con sabores y olores frutales y baja graduación alcohólica, similares a las cervezas *sour* o cervezas ácidas. Sin embargo, este tipo de cerveza tradicional implica largos tiempos de fermentación y producción, alto coste y una calidad inconsistente en el tiempo. Como consecuencia, la industria alimentaria está buscando posibles soluciones a este problema.

Una de las posibles alternativas consiste en el uso de especies de microorganismos distintos a *S. cerevisiae*. Ejemplos de estas son las levaduras de los géneros *Lachancea* o *Metschnikowia*, empleadas en la industria alimentaria para la producción de vinos. El metabolismo de estas levaduras es capaz de aportar al vino y a la cerveza aromas y sabores frutales, propiedad que se está investigando en este contexto para elaborar cervezas similares a las cervezas *sour*, de manera mucho más rápida, barata, en procesos controlados y con menos riesgo de contaminación.

Este proyecto fin de máster se centra en el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de cervezas ácidas, suplementadas con arándanos o con extracto de antocianos de uva como herramienta para elaborar alimentos funcionales con alta capacidad antioxidante.

Objetivos del proyecto

Con la intención de contextualizar y enfocar la investigación, se definieron el objetivo general y los objetivos específicos del proyecto, que se enuncian a continuación.

Objetivo general: Estudiar el efecto del uso de levaduras no-*Saccharomyces* y de la suplementación con arándanos o antocianos de uva en la elaboración, características y perfil sensorial final de cervezas artesanales.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar protocolos de fermentación para la elaboración de cervezas artesanales suplementadas con arándanos o antocianos de uva, mediante el uso de levaduras convencionales (*Saccharomyces cerevisiae*) y levaduras no convencionales en cultivo mixto (*L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*)
2. Analizar la interrelación entre las levaduras empleadas y relacionar los aspectos y productos de sus metabolismos con las características fisicoquímicas y sensoriales del producto final.
3. Analizar y comparar el perfil fisicoquímico de las cervezas terminadas, estudiando parámetros como pH, densidad, glucosa residual, contenido de etanol, color, amargor, perfil de componentes volátiles, índice de polifenoles totales, perfil y concentración de antocianos y capacidad antioxidante.
4. Valorar las características organolépticas de las cervezas mediante evaluación sensorial para compararlas y correlacionar el perfil aromático percibido con el perfil de componentes volátiles.
5. Determinar la influencia del tipo de levadura adicionada, del uso de frutas y de la adición de antocianos de uva en las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de los distintos productos finales.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. La cerveza: introducción y contexto histórico.

Las primeras evidencias de la existencia de las cervezas datan del año 2800 a.C (3), pero se cree que su práctica comenzó hace más de 8000 años, principalmente en las civilizaciones egipcia y babilónica (2). En un contexto de escasez de recursos, la cerveza apareció como una bebida capaz de satisfacer las necesidades nutricionales, buen contenido calórico y no susceptible a la contaminación, debido al pH ácido y al alcohol de la bebida. La fabricación de cerveza permitía asimilar cereales en azúcares y aumentar la vida útil de los alimentos, que en muchas ocasiones escaseaban (6).

Si bien el descubrimiento de la cerveza fue eventual, con el paso de los años las técnicas de elaboración se fueron perfeccionando, y en el año 1516 se definió la cerveza como una bebida alcohólica elaborada únicamente con agua, malta, lúpulo y levadura (3). El concepto de fermentación no surgió hasta entrado el siglo XIX (2), gracias a los descubrimientos de Louis Pasteur sobre la capacidad fermentativa de los microorganismos.

Desde entonces, las cervezas se han ido adaptando a las necesidades de las sociedades y convirtiéndose en un rasgo reflejo de la cultura, hasta coronarse como la bebida alcohólica más antigua y consumida en todo el mundo (7,8). Se estima que entre 2016 y 2022, el consumo de cerveza en Europa aumentó en 365 millones de hectolitros (5).

La globalización y la adaptación de la receta a los recursos naturales de los distintos lugares geográficos provocó la diversificación de la bebida original y como consecuencia, la aparición de distintos tipos de cerveza. Antiguamente, se dividían en dos: las cervezas “*ale*”, típicas de Gran Bretaña, fermentadas a 12-22°C con *Saccharomyces cerevisiae*, y en las que las levaduras al final del proceso ascendían a la superficie; y las cervezas “*lager*”, propias de Alemania, fermentadas a bajas temperaturas (4-15°C) con *Saccharomyces pastorianus*, y en las cuales las levaduras floculaban al fondo del fermentador (2). Con el tiempo, se descubrieron también las cervezas de fermentación espontánea (3). A día de hoy, hay incontables tipos de cervezas e instituciones completas dedicadas a su estudio y clasificación (4).

Entre todas ellas, destacan las cervezas de fermentación espontánea, no inoculadas de manera intencionada. En estas cervezas, el mosto cervecero, se transfiere caliente a vasijas o

barriles y se deja fermentar en abierto, aprovechando los microorganismos presentes en el ambiente y en las superficies de los recipientes. Este tipo de cervezas se conocen como cervezas *lambic*, un subgrupo dentro de las cervezas *sour*, que se caracterizan por un fuerte aroma y sabor cítrico y frutal (3,9–11).

4.1.1. Cerveza *sour*

Las cervezas *sour* son un tipo de cervezas caracterizadas principalmente por una alta concentración de ácidos orgánicos y pH muy bajos en comparación con la cerveza tradicional (3). A pesar de que el proceso de elaboración es similar al de otras cervezas, la fermentación de las cervezas *sour* se lleva a cabo de manera espontánea y mediante co-cultivos de levaduras (principalmente *Brettanomyces*, *Candida*, *Saccharomyces* y *Torulaspota spp.* (12)) y bacterias productoras de ácido y responsables de pH y graduación alcohólica bajos, como las bacterias ácido-lácticas (BAL) o bacterias ácido-acéticas (BAA) (3,12). El proceso de elaboración tradicional de estas cervezas puede durar de 1 a 3 años, y tiene una serie de problemas asociados que dificultan la producción y aumentan el coste considerablemente (3).

Este tipo de cerveza está tomando un protagonismo importante en el mercado, impulsado por la búsqueda de estilos de vida más sanos, que comprenden reducir el consumo de alcohol; y por sus características sensoriales únicas (5).

Por esta razón, la industria cervecera está buscando alternativas de producción que permitan reducir el tiempo de elaboración y optimizar el proceso. Una alternativa interesante es el uso de levaduras *no-Saccharomyces* (5), con baja capacidad fermentativa y alta actividad enzimática relacionada con la producción de ácidos volátiles (13) y metabolitos, capaces de generar cervezas de baja graduación alcohólica (14) y aportar características sensoriales similares a las de las cervezas *sour* (15). Dentro de estas levaduras, destacan el uso de *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspota delbrueckii*, y *Metschnikowia pulcherrima*, entre otras (16).

4.2. Proceso de elaboración del mosto de cerveza

La elaboración del mosto de cerveza se divide en cuatro etapas principales: el malteado de la cebada, la molienda de la malta, la maceración de la malta, y la cocción del mosto cervecero.

La maceración es el proceso por el cual la malta se mezcla o infundiona con agua caliente para extraer y digerir las proteínas, carbohidratos, enzimas y sustancias fenólicas en azúcares fermentables y compuestos nitrogenados aprovechables por las levaduras (17). Como resultado de este proceso, se obtiene el mosto, un líquido denso y rico en azúcares (3), que posteriormente se fermentará hasta convertirse en cerveza.

Durante la maceración, el agua empleada se calienta hasta 67-68°C para activar las enzimas amilolíticas presentes en los granos de malta (α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa terminal) y degradar el almidón en azúcares fermentables (maltosa, maltotriosa, dextrinas y glucosa) (18). Cada una de estas enzimas tiene una función y temperaturas óptimas distintas, y su actividad es crucial para este proceso. La α -amilasa rompe las cadenas de almidón por los enlaces α (1 \rightarrow 4), liberando dextrinas ramificadas. La β -amilasa hidroliza estas moléculas y libera monómeros de maltosa a partir de los extremos no reductores de las dextrinas. Por otro lado, la dextrinasa terminal rompe los enlaces α (1 \rightarrow 6) de las ramificaciones de amilopectina, liberando dextrinas lineales, que a su vez sirven como sustrato para la β -amilasa (19). Cada una de estas enzimas tiene una temperatura óptima de reacción distinta. Por ejemplo, la α -amilasa trabaja mejor a 72°C, temperatura a la que la β -amilasa se inactiva (18). Por el contrario, la β -amilasa trabaja mejor alrededor de los 62°C, temperatura a la que la α -amilasa disminuye considerablemente su actividad (20). La malta empleada en cerveza tiene un ratio de dextrinasas bajo. Aproximadamente el 80% del almidón se convierte en azúcares fermentables, mientras que el 20% restante permanece en forma de dextrinas ramificadas que aportan cuerpo a la cerveza final (21). Sin embargo, estos porcentajes pueden variar en función del tipo de cerveza que se desee elaborar.

Debido a que la viscosidad del mosto y el cuerpo de la cerveza dependen estrechamente de la actividad enzimática y de la composición en azúcares del mosto, es importante encontrar un rango de temperaturas en las que el ratio de actividad enzimática sea óptimo. Si la actividad α -amilasa es mayor que la actividad β -amilasa, se obtendrá un mosto rico en dextrinas, que se asocia a cervezas con mucho cuerpo (20,21) y menos alcohólicas (la concentración de azúcares fermentables en el mosto es menor); mientras que si en la maceración predomina la actividad β -amilasa aumenta la concentración de azúcares fermentables y se obtienen cervezas más secas y con mayor contenido alcohólico.

Tras la maceración, la porción líquida (mosto) y sólida (bagazo) se separan en un paso denominado clarificado (3). Se añade lúpulo y se somete al mosto a ebullición entre 90-120 minutos (22), en un proceso llamado cocción. Esto se realiza por varios motivos: la inactivación de las enzimas, la esterilización y concentración del mosto, la coagulación de proteínas y taninos, y la precipitación de fosfato de calcio y consecuente disminución del pH (2). La cocción también es responsable de dar el color y sabor a malta característico de la cerveza mediante reacciones de Maillard (22). La adición de lúpulo es un paso clave en la elaboración de cerveza, ya que aporta el sabor amargo y aroma característico de esta bebida. Durante la cocción, los α -ácidos presentes en el lúpulo son isomerizados y convertidos a α -isoácidos, responsables del amargor. De manera simultánea, los aceites esenciales y taninos difunden al mosto, aportando el aroma (2,17). Durante la cocción, se puede aplicar o no un paso de *whirpool* para provocar la sedimentación del lúpulo y otros posibles sólidos en la mezcla y facilitar su retirada.

Acabada la cocción, el mosto se deja enfriar, se airea y se inocula con levaduras para iniciar la fermentación.

4.2.1. Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico en el cual una población de levaduras convierte los azúcares fermentables de un mosto en etanol, dióxido de carbono, y otros metabolitos responsables del sabor y aroma del producto final (23). Una fermentación estándar suele durar de 5 a 7 días (22), pero como todo proceso químico, depende en gran medida de una serie de parámetros, como la levadura empleada, tasa de inoculación, temperatura del proceso, oxígeno disuelto y cantidad de azúcares fermentables del mosto (24); que a su vez están condicionados por del tipo de cerveza que se quiera elaborar.

4.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura cervecera por antonomasia es *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura ascomiceto domesticada durante civilizaciones (25) capaz de producir etanol en cantidades considerables. Durante la fermentación, los azúcares fermentables se transportan al interior de la célula y son asimilados y convertidos en CO₂, etanol y ATP. Para ello, las levaduras tienen requerimientos específicos de aminoácidos y otros nutrientes como ácidos grasos, esteroides e incluso oxígeno (2).

Hay varias características que convierten a *Saccharomyces cerevisiae* en la levadura más adecuada para la elaboración de cerveza: es capaz de fermentar todos los azúcares presentes del mosto, incluyendo maltotriosa, a diferencia de muchas otras especies (26); tiene buena capacidad fermentativa a concentraciones altas de azúcar (27); presenta efecto Crabtree, resistencia a determinados estreses (etanol, oxígeno, altas temperaturas) y buena tasa de floculación (28).

A pesar de ser la opción más empleada, existen cervezas tradicionales elaboradas con otras levaduras o incluso con bacterias (ej. cervezas *Lambic* o *Gueuze*) (3), y actualmente se está popularizando el uso de levaduras no convencionales (también llamadas no-*Saccharomyces*) para obtener cervezas con características sensoriales distintas (16).

4.2.3. *Lachancea thermotolerans*

Lachancea thermotolerans (antiguamente *Kluyveromyces thermotolerans*) es una especie de levadura perteneciente al género *Lachancea*, presente en una gran variedad de nichos ecológicos entre los que destaca el mosto de uva (29). Por esto mismo, se emplea en la elaboración de vinos para disminuir el pH mediante la producción de ácido láctico, y obtener características sensoriales innovadoras (30).

Es una especie heterofermentativa, capaz de transformar azúcares en etanol y en ácido láctico (16), lo que la confiere una característica única y que la dota de gran valor. Es capaz de metabolizar glucosa, fructosa y sacarosa de manera similar a *Saccharomyces cerevisiae* (31), pero no es capaz de fermentar maltotriosa (31,32). Otra característica fermentativa importante es que sufre efecto Crabtree (33) y por tanto, en condiciones aeróbicas y con altas concentraciones de glucosa en el medio, su metabolismo prioriza la vía fermentativa y la producción de etanol frente a la respiración oxidativa. En esta situación, la levadura es más propensa a producir etanol que a aumentar su biomasa (34,35). Aproximadamente, se calcula que *Lachancea thermotolerans* consume 21,5 g para generar un 1% v/v de etanol, frente a los 16 g que se calculan para *Saccharomyces cerevisiae* (30).

Lachancea thermotolerans sintetiza una enzima lactato deshidrogenasa capaz de catalizar la producción de ácido láctico, secretado al exterior de la célula mediante transportadores específicos (33). En función de la especie y la cepa, se estima que se pueden producir de 1-9 g/L de ácido láctico en un proceso fermentativo enológico común (36). Otro

metabolito característico de esta levadura es el glicerol, cuya producción se ve incrementada en esta cepa con respecto a otras levaduras (16,30).

Otra característica interesante de *Lachancea thermotolerans* como cultivo starter en mostos de cerveza es que su crecimiento no se ve significativamente inhibido por lúpulo o etanol. Se ha demostrado que *L. thermotolerans* es capaz de soportar concentraciones de hasta 90 IBU en mosto de cerveza, manteniendo la densidad celular en el mosto (37). De la misma manera, la densidad celular se mantiene también en mostos con hasta 10% v/v de etanol (38).

Con respecto a la producción de volátiles, se sabe que *Lachancea thermotolerans* produce mayores cantidades de 2-feniletanol (39,40) etil-lactato, etil-hexanoato (41), acetato, y butirato de etilo (16), lo que aporta en el producto final olores florales, dulces y afrutados.

La capacidad de producción de ácido láctico y compuestos volátiles asociados a aromas frutales y la resistencia a etanol y lúpulo, convierten a *Lachancea thermotolerans* en una alternativa interesante para la producción de cervezas

4.2.4. *Metschnikowia pulcherrima*

Metschnikowia pulcherrima es una levadura no-*Saccharomyces* del género *Ascomycota*, anatómicamente igual a *Saccharomyces cerevisiae* y presente en mosto de uva, y al igual que *Lachancea thermotolerans*, es común su uso en fermentaciones vínicas espontáneas (42).

También tiene metabolismo heterofermentativo, y es capaz de asimilar glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y maltosa (43), pero de nuevo, no maltotriosa (44). La capacidad fermentativa de *M. pulcherrima* es significativamente menor que la de *Saccharomyces cerevisiae*, y también inferior a la capacidad de otras especies no-*Saccharomyces* (45). Debido a esta baja tasa de fermentación, se emplea en la industria principalmente en la elaboración de vinos con baja graduación alcohólica, coinoculada con otras levaduras (46,47). La fermentación con *M. pulcherrima* puede generar aproximadamente 4% v/v etanol (48) en vinos, aunque en algunos casos se ha llegado incluso hasta el 6-7% (49). En cervezas, varios estudios han conseguido obtener contenidos de entre 0,5-1% v/v en inoculaciones individuales, y algo más de 5% v/v en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae* (5,44)

A diferencia de *L. thermotolerans*, es sensible al etanol (50), y la mayoría de cepas no soportan concentraciones superiores al 4% v/v (48).

Metschnikowia pulcherrima destaca por tener alta actividad proteolítica, lo que la convierte en una buena levadura para emplear en coinoculaciones, al ser capaz de hidrolizar los nutrientes del medio y liberar aminoácidos asimilables por otras levaduras (47). Tiene la capacidad de sintetizar y excretar pulcherrimina, un pigmento rojo con actividad antifúngica que puede inhibir el crecimiento de otras especies no-*Saccharomyces*, aunque no de *Lachancea thermotolerans* (51).

El nivel de actividad proteolítica y β -glucosidasa depende, evidentemente, de la cepa empleada (52) pero en general es responsable de la generación de ácidos volátiles que aportan olores frutales en vinos (47). En cervezas, existen estudios que concluyen que las fermentaciones con *Metschnikowia pulcherrima* mejoran el perfil aromático en el producto final, aportando aromas frutales y disminuyendo aromas indeseados con respecto a *S. cerevisiae*, como por ejemplo el aroma a manzana verde, que en cerveza se considera un defecto y está asociado a la producción de acetaldehído (5).

4.3. Antocianos

Los antocianos son pigmentos hidrosolubles presentes en la naturaleza, responsables de los colores dentro del rango rojo-morado (53) en estructuras vegetales, principalmente flores, vegetales, frutas y cereales (54). Estructuralmente son polifenoles, y se consideran un tipo de flavonoides junto con las flavonas, las flavononas y los flavonoles (54).

Los flavonoides tienen una estructura básica común de dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (55), formando todo ello un esqueleto tricíclico (56). A partir de este esqueleto, las distintas antocianinas siguen patrones característicos de hidroxilación, metoxilación y glicosidación.

En la naturaleza, las antocianinas se encuentran glicosiladas, forma en la que la aglicona (denominada antocianidina) está unida a un azúcar (57). Las antocianidinas más presentes en la naturaleza son la pelargonidina (Pl), la cianidina (Cy), la peonidina (Pe), la delfinidina (Dp), la petunidina (Pt) y la malvidina (Mv), y a partir de combinaciones entre los grupos sustitutivos y los azúcares unidos, se han podido caracterizar hasta 700 antocianinas derivadas (56). En la figura 1 se muestra un ejemplo de las distintas estructuras de una antocianina.

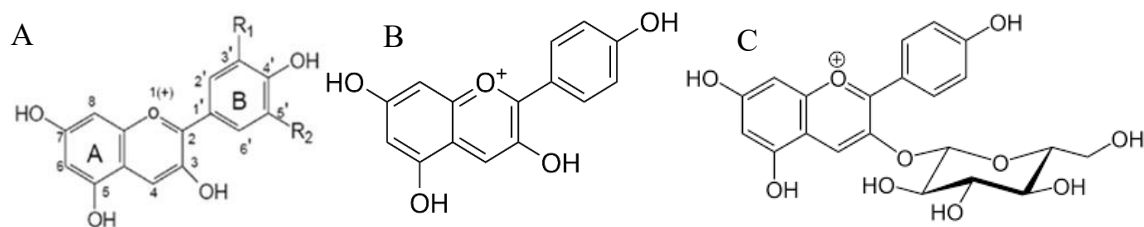


Figura 1. Estructura básica de antocianos. A: estructura básica de los antocianos ión flavilo – esqueleto tricíclico; B: forma antocianidina (pelargonidina) y C: forma antocianina (pelargonidina-3-O-glucósido). (54).

Los antocianos se emplean en la industria alimentaria como pigmentos naturales gracias a sus propiedades como tintes y a los beneficios asociados a su consumo en la salud (58). En este contexto, la comunidad científica está ahondando en la materia y la investigación sobre el tema ha crecido considerablemente durante los últimos años, sobre todo con respecto al potencial farmacológico y terapéutico. Actualmente se sabe que los antocianos ejercen actividad anti-tumoral, anti-angiogénica, anti-inflamatoria y anti-diabética (54), y que su consumo en la dieta tiene efectos beneficiosos en la reducción de enfermedad coronaria y en la mejora de la agudeza visual y el rendimiento cognitivo (59–61).

Los efectos beneficiosos de las antocianinas en la salud del consumidor derivan de su potencial antioxidante. Los compuestos antioxidantes son “cualquier sustancia que retrasa o elimina el daño oxidativo hacia una molécula”, y la actividad antioxidante se define como “la capacidad de ciertos compuestos para neutralizar radicales libres” (54,62). Las antocianinas tienen la capacidad de neutralizar radicales libres lipofílicos, reduciendo el estrés oxidativo y el daño en lípidos, proteínas y DNA, y por tanto evitando el daño celular y el deterioro de funciones celulares e inmunes (54,63,64).

El uso de extracto de antocianos como aditivos alimentarios está regulado por el *Codex Alimentarius* (56) y presenta numerosas ventajas: funcionan como pigmentos naturales capaces de sustituir a otros pigmentos artificiales, constituyen una fuente de antioxidantes en la dieta y permiten aprovechar residuos vegetales que no puedan comercializarse frescos, disminuyendo el desperdicio de recursos naturales (54). Hasta la fecha, existen ejemplos de alimentos funcionales con antocianos en arroz, maíz (65), galletas (66), mermeladas y gelatinas (67), bebidas con y sin alcohol, helados, sorbetes, etc. (54).

En el sector cervecero, se han realizado estudios sobre la suplementación con antocianinas y su efecto en las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes; tanto mediante la adición de frutas ricas en antocianos como las frambuesas (68), aronia (69), y frutos rojos (70) como mediante la adición de extractos de antocianos de pulpa de uva (71). En general, la adición de este tipo de frutas en la cerveza supone un aumento en el contenido de antocianos y actividad antioxidante de las cervezas, tal y como cabe esperar (68–71).

4.4. Uso de fruta en las cervezas

Las cervezas con frutas son cervezas a las que se le ha añadido frutas o sabores frutales, diferenciándose de otro tipo de bebidas obtenidas a partir de frutas como el vino o la sidra de manzana. En este tipo de bebidas fermentadas, el cereal sigue siendo la atracción principal, y la fruta, en mayor o menor medida, un adjunto (72).

El uso de frutas en la cerveza no es una práctica novedosa, y un ejemplo tradicional de esto es la cerveza *Kriek*, una cerveza tradicional belga elaborada con cereza (4). Las cervezas con frutas se elaboran igual que una cerveza convencional, pero intercalando en algún punto del proceso una fase de adición de fruta. En función de dónde se coloque este paso, se clasifican en distintos grupos. Lo más común, es o añadir las frutas antes de la fermentación (ejemplo de esto son las cervezas *sour*), o bien mezclar la cerveza ya elaborada con alguna parte de la fruta, principalmente el zumo o la piel (ejemplo: *Radler*) (72).

La adición de fruta a la cerveza está tomando importancia como posibilidad comercializable de alimento funcional, ya que la cerveza es un producto con un éxito considerable en el mercado y con un público abierto a las nuevas tendencias e innovaciones organolépticas, debido al peso de las cervezas artesanales (73). Muchos estudios hablan ya sobre la mejora organoléptica y sensorial que supone la adición de frutas en cervezas, y recientemente se ha demostrado que esta práctica supone un aumento de componentes bioactivos antioxidantes, como polifenoles y flavonoides, en el producto final (73–75)

3. METODOLOGÍA

3.1 Reactivos y materiales

3.1.1. Malta

Para la elaboración del mosto cervecero se emplearon dos tipos de malta. En primer lugar, se utilizó malta deshidratada molturada pálida Château Pilsen 2RS de la cosecha del 2023 (Castle Maltin, Beloeil, Bélgica), con una humedad máxima del 4,5%, extracto seco del 81,5%, color 4,0 EBC y tiempo de sacarificación de 15 minutos. Esta malta se empleó como malta base.

Se empleó también malta deshidratada no molturada, tostada Carafa tipo I (Weyermann, Bamberg, Alemania). Esta malta se caracteriza por tener un color oscuro (900 EBC) y por aportar al mosto sabores amargos y notas a chocolate. Antes de su adición al mosto, esta malta se molturó con un molino manual.

3.1.2. Lúpulo

El lúpulo empleado fue lúpulo tipo Lemodrop en forma de pellet, con un 7,1% de α -ácidos. Este lúpulo se emplea en cervecería para aportar notas aromáticas cítricas, florales, a limón.

3.1.3. Cepas de levadura y crecimiento.

A lo largo del desarrollo del trabajo se emplearon 3 especies distintas de levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* 7VA, *Lachancea thermotolerans* L31 y *Metschnikowia pulcherrima* M29, conservadas en el departamento de Microbiología de la ETSIAAB (UPM) en forma de cultivos en tubo, y refrescados en placa Petri con medio YPD agar (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 0,8% agar).

Para *S. cerevisiae* 7VA y *L. thermotolerans* L31 se preparó un cultivo de 200 mL en medio YPD líquido (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) previamente esterilizado a 121°C y 15 minutos. Para *M. pulcherrima* M29, se prepararon 400 mL de medio en las mismas condiciones.

Los cultivos se inocularon con un asa de siembra a partir de las placas Petri, en condiciones estériles. Se incubaron durante 48 h a 25°C y en agitación a 240 rpm. A las 48 horas, se realizó un pase al 2% v/v en medio YPD líquido (1% extracto de levadura, 2%

peptona, 2% glucosa) para todos los matraces y se incubaron otras 24 horas en las mismas condiciones para garantizar un inóculo de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL.

3.1.4. Mosto empleado en el ensayo de implantación

El mosto empleado para el ensayo de implantación se obtuvo a partir de una muestra de mosto de cerveza elaborada un año antes, congelada en el departamento de Química y Tecnología de los Alimentos de la ETSIAAB (UPM). El mosto se descongeló y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. La densidad y pH del mosto eran de 1050 kg/m³ y 5,27, respectivamente.

3.1.5. Extracto de antocianos de uva

Para la fermentación de las cervezas, se elaboró una dilución de antocianos a partir de extracto de antocianos de uva (Secna, Benifaió, Valencia, España).

Para ello, se diluyó el extracto de antocianos en matraces Erlenmeyer, en proporción 1:2 con H₂O previamente esterilizada a 121°C y 15 minutos. Se prepararon dos matraces de 600 mL de antocianos diluidos, cada uno con 300 mL del extracto original y 300 mL de agua estéril.

3.1.6. Arándanos

Para la preparación de las frutas se compraron bolsas de arándanos congelados de la marca Hacendado (España), elaborados por la empresa Crop's Fruit (Ooigem, Bélgica). Las bolsas tenían un contenido de 100% arándanos, sin otras frutas, aditivos o similares.

El mismo día que se inoculó la cerveza, los arándanos se trituraron en un procesador de alimentos (Vorwerk, Wuppertal, Alemania), a máxima potencia durante aproximadamente 5 minutos, hasta obtener una mezcla con una textura líquida, cremosa.

El puré de arándanos se guardó en botes de cristal tapados, dentro de la nevera durante aproximadamente una hora hasta el momento de su utilización.

3.2. Elaboración del mosto de cerveza

3.2.1. Maceración

El equipo empleado para la maceración fue un macerador comercial de la marca Grainfather (Auckland, Nueva Zelanda), con capacidad para 40 L de mosto, una cuba filtrante, una bomba de recircularización con filtro, y una camisa de calor que permite seleccionar la temperatura de maceración a lo largo de todo el proceso.

Para la maceración, se emplearon 18 L de agua procedente del grifo del departamento de Microbiología de la ETSIAAB (UPM), de 14,5 mg/L de calcio. A esta agua se añadieron 5,85 g de sulfato de calcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) para llegar a una concentración final de calcio de 90 mg/L. Una vez adicionado el calcio, el agua se calentó hasta los 72°C aproximadamente en un calentador comercial de la marca Grainfather. El agua caliente se añadió al macerador junto con 6 kg de malta pálida molida y 37,5 g de malta tostada molida. Una vez añadidos los ingredientes dentro de la cuba filtrante, se encendió la bomba de recirculación y se mantuvo la temperatura del macerador a 68°C durante una hora.

Durante esta hora, se tomaron muestras de mosto para medir densidad, pH y glucosa en intervalos de tiempo de 20 minutos: al inicio del proceso, y a los 20, 40 y 60 minutos.

3.2.2. Lavado

Tras la maceración, se apagó la bomba de recirculación y se levantó la cuba filtrante, dejando caer el mosto al fondo del macerador.

Para el lavado, se emplearon 16,5 L de agua del grifo, calentados previamente a 77°C. Se hicieron tres tandas de lavado, de 6 L, 6 L y 4,5 L respectivamente. Durante cada tanda, el agua se vertió en movimientos circulares y lentos sobre la malta, y se dejó escurrir completamente sobre el macerador.

Tras el lavado, se descartó el bagazo y se inició de nuevo la bomba de recirculación. Se tomó una muestra de mosto para analizar densidad, pH y glucosa.

3.2.3. Cocción

Antes de iniciar la cocción, ajustó el pH dentro del rango 5,2-5,5 con 4 mL de ácido fosfórico.

Una vez ajustado el pH, la temperatura del macerador se elevó hasta 100°C para llevar el mosto a ebullición y, se mantuvo durante 90 minutos. Transcurridos los 30 primeros minutos en ebullición, se añadieron al mosto 30 g de lúpulo Lemondrop. La cocción finalizó pasados los 60 minutos restantes.

3.2.4. Whirpool

Justo después de finalizar la cocción, el mosto se removió con una pala en movimientos circulares durante un minuto. Este proceso se conoce como “*whirpool*” y su finalidad es crear un remolino para facilitar la clarificación del mosto. Pasado un minuto de agitación, el mosto se dejó reposar y enfriar otros 25 minutos.

Finalmente, el mosto se pasó a 18 botellas de 1 L de capacidad, llenándolas con 600 mL de mosto. Las botellas y tapones empleados se esterilizaron previamente en autoclave, a 121°C durante 15 minutos.

Hasta el momento de la inoculación, el mosto se guardó entre 24 y 48 h en oscuridad y a 4°C.

3.3. Ensayo de implantación

De forma previa a la elaboración de la cerveza, se llevó a cabo un ensayo de implantación microbiológico para estudiar el crecimiento de dos levaduras distintas, *Lachancea thermotolerans* L31 y *Metschnikowia pulcherrima* M29.

Durante el desarrollo del ensayo se estudiaron 6 condiciones distintas, cada una por triplicado (tabla 1). En cada condición se varió la proporción de cultivos de L31 y M29 inoculados, de la siguiente manera: 1:1, 1:5, 1:10, 1:0, 0:1 y secuencial (inoculando en proporción 1:1 pero en días distintos, inoculando primero M29, y a los dos días L31). Se colocaron 30 mL de mosto en 18 viales estériles de 50 mL de capacidad.

Las levaduras se inocularon al 2% v/v en todos los viales, de manera que el volumen de cultivo añadido permanecía constante. Para obtener las proporciones indicadas, en los casos en los que fue necesario (1:5 y 1:10) se centrifugó el cultivo de M29 a 3000 rpm durante 5 minutos y a -4°C, y el precipitado se resuspendió de nuevo en medio YPD, concentrando las levaduras hasta obtener un cultivo de la proporción deseada.

Tabla 1. Condiciones de cultivo para el ensayo de implantación realizado.

Condición	Volumen L31	Proporción L31	Volumen M29	Proporción M29	
1:1	300 µL	1x	300 µL	1x	
1:5	300 µL	1x	300 µL	5x	Resuspender 10 mL de cultivo M29 en 2 mL YPD
1:10	300 µL	1x	300 µL	10x	Resuspender 10 mL de cultivo M29 en 1 mL YPD
1:0	600 µL	1x	0 µL	-	
0:1	0 µL	-	600 µL	1x	
Secuencial	300 µL	1x	300 µL	1x	

Los viales se taparon con tapones septum y se colocaron agujas para permitir la salida de CO₂. Una vez inoculados, los viales se guardaron en una estufa a 25°C durante 7 días. Los días 2, 5 y 7 de ensayo, se sembraron placas de YPD para las condiciones 1:0 y 0:1, y de medio cromogénico para el resto de las condiciones a diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶. Se realizó un recuento de UFC en placa por triplicado para condición. El valor UFC/mL se calculó de la siguiente forma:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ medio de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrado (mL)}}$$

3.4. Fermentación

3.4.1. Preparación de los mostos

Los mostos se prepararon de 3 maneras distintas, en función del tipo de cerveza que se iba a elaborar.

Del total de 18 botellas, a 6 de ellas no se las añadió nada. En otras 6 botellas, se añadió 200 mL en cada una de la solución de extracto de antocianos de uva preparado previamente ese mismo día. En las botellas 6 restantes se añadieron 200 g de puré de arándanos, procesado manualmente también el mismo día. Cada botella se etiquetó correspondientemente.

3.4.2. Inoculación

Las botellas se inocularon en condiciones estériles, a partir de los cultivos de levaduras crecidos durante los días previos. Todas las botellas se inocularon al 2% sobre el volumen final total de fermentación.

De las 18 botellas, 9 de ellas se inocularon con *S. cerevisiae* 7VA, de manera que tres de ellas tuvieran fruta, tres de ellas extracto de antocianos, y tres de ellas solo mosto de cerveza.

Las otras 9 botellas se inocularon con una mezcla de L.31 y M29 en proporción 1:10. Una vez inoculadas, a cada botella se le puso un tapón de fermentación previamente estéril y una válvula de fermentación de plástico. Dentro de la válvula se añadieron 2 mL de glicerol, para permitir la salida de CO₂ durante la fermentación y evitar la entrada de posibles contaminantes en las botellas. Cada botella se rotuló de acuerdo a su condición (levaduras inoculadas y presencia de frutas, antocianos o nada). Los códigos empleados para su identificación, y las condiciones asociadas se presentan en la tabla 2.

Las botellas se dejaron a temperatura ambiente a 20°C y oscuridad durante los días que fuera necesario para cada condición, dando la fermentación por terminada cuando el mosto alcanzó una densidad de aproximadamente 1015 kg/m³. Se tomaron muestras de mosto cada 3 o 4 días para medir densidad, pH y contenido total de glucosa durante la fermentación. Las muestras tomadas cada día se congelaron en tubos Falcon.

Tabla 2. Códigos para las muestras de los distintos fermentadores.

Código	Levaduras	Aditivo	Triplicado
7.VA.1	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	No	1
7.VA.2	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	No	2
7.VA.3	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	No	3
7.VA.F1	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	Arándanos	1
7.VA.F2	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	Arándanos	2
7.VA.F3	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	Arándanos	3
7.VA.A1	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	Antocianos	1
7.VA.A2	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	Antocianos	2
7.VA.A3	<i>S. cerevisiae</i> 7.VA	Antocianos	3
LM.1	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	No	1

LM.2	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	No	2
LM.3	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	No	3
LM.F1	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	Arándanos	1
LM.F2	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	Arándanos	2
LM.F3	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	Arándanos	3
LM.A1	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	Antocianos	1
LM.A2	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	Antocianos	2
LM.A3	<i>L. thermotolerans</i> L31 <i>M. pulcherrima</i> M29	Antocianos	3

3.4.3. Segundo ensayo de 7.VA.A Y LM.A

Durante el primer ensayo con las cervezas 7.VA y LM.A se detuvo la fermentación a densidades bastante altas (1020 y 1040 kg/m³ respectivamente). Se puso en marcha un segundo ensayo con mosto sobrante de la cocción. Se esterilizó el mosto sobrante y se vertieron 600 mL de mosto en 6 botellas estériles de capacidad de 1 L. En este caso, en todas las botellas se añadieron 250 µL de extracto de antocianos de uva (Secna, Benifaió, España) con una micropipeta. Las botellas se inocularon, por triplicado, respectivamente con *Saccharomyces cerevisiae* 7.VA y con *Lachancea–Metschnikowia* en proporción 1:10, mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.5. Las botellas se taparon con tapones de fermentación estériles con una válvula de plástico y glicerol. Cada botella se rotuló pertinentemente y se dejaron en oscuridad a 20°C. Se monitoreó la densidad, pH y glucosa de las cervezas cada 5 días. Se inocularon de nuevo las botellas en las mismas condiciones que la primera inoculación, en un ambiente estéril y al 2% v/v.

3.5. Guarda

Al finalizar la fermentación, se guardaron las botellas en frío a 4°C durante 7 días para favorecer la floculación de los productos sólidos, como el lúpulo y la levadura.

Pasados 7 días del inicio de la guarda, se trasvasó el contenido de las botellas de fermentación a botellas limpias y esterilizadas previamente a 121°C y 15 minutos con el uso de un embudo, también estéril.

En el caso de las cervezas con fruta, fue necesario centrifugar parte del mosto ya que la fruta macerada dificultaba el proceso de trasvase. El mosto que no se pudo trasvasar con el uso del embudo, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se vertió en las botellas nuevas, y el pellet, principalmente levaduras y fruta, se desechó.

Una vez realizado el proceso de trasvase, las botellas permanecieron a 4°C hasta el momento del embotellado. En la figura 2 se muestra un esquema global del ensayo.

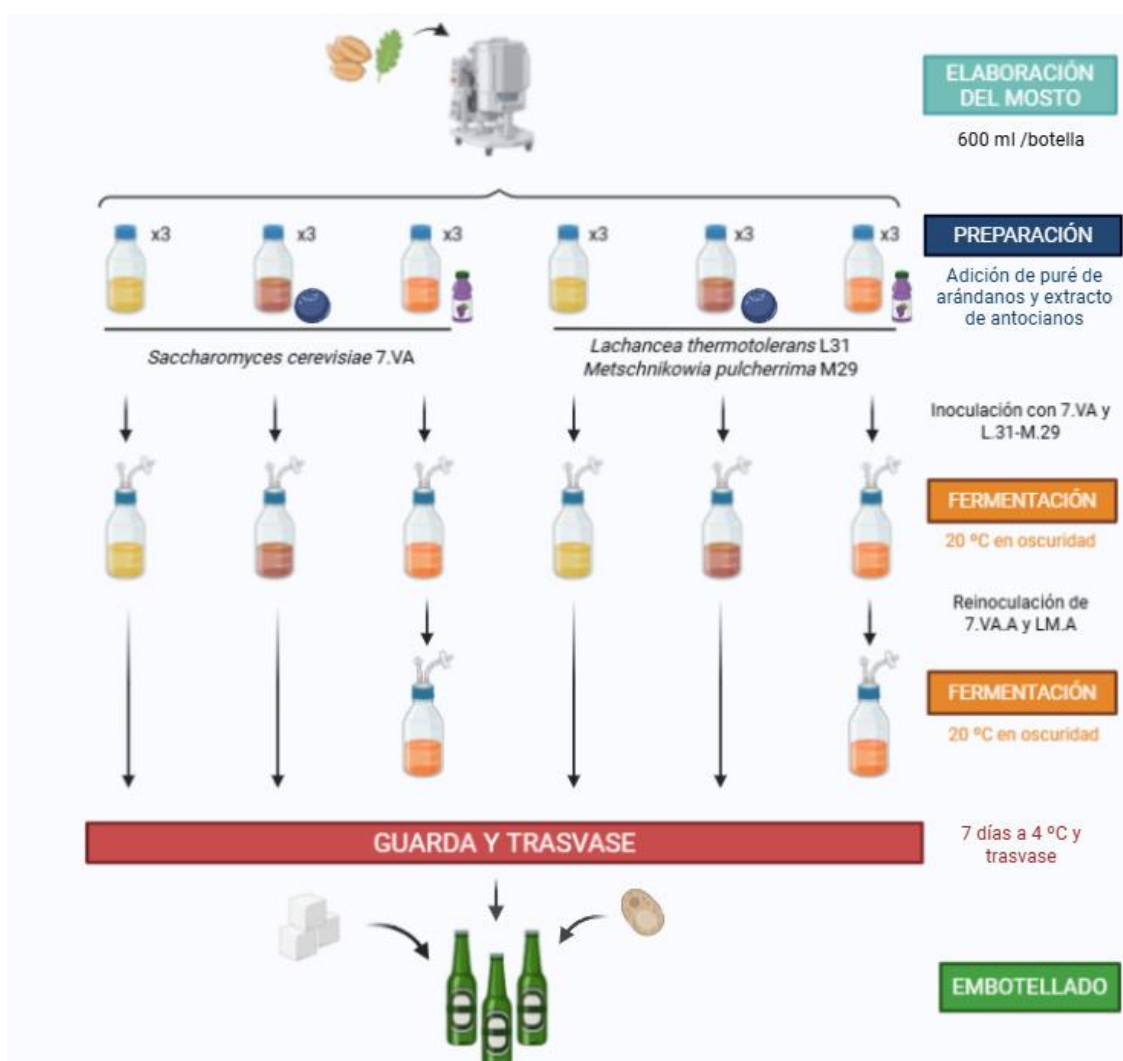


Figura 2. Esquema global del proceso. Imagen de elaboración propia.

3.6. Embotellado y segunda fermentación

Las cervezas se embotellaron en botellines de 200 mL con tapón de chapa, previamente esterilizados durante 15 minutos a 121°C.

Para generar el CO₂ las cervezas se sometieron a una segunda fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, se prepararon dos disoluciones: una de azúcar y una de levadura seca activa, y se mezclaron con la cerveza en el botellín antes de cerrarlos.

Para la disolución de azúcar, se preparó una solución stock de 400 g/L de azúcar blanco (Hacendado, Valencia, España) con agua destilada estéril. Esta solución se añadió hasta una concentración de 5 g/L en los botellines de cerveza.

Para la levadura, se utilizó levadura seca activa *Saccharomyces cerevisiae* QA23™ (Lallemand Iberia, Madrid, España) hidratada previamente con 10 veces su volumen a 25°C. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 20 minutos. Esta disolución se añadió a una concentración final de 0,4 g/L por botellín.

En el momento de embotellar la cerveza, se añadió en los botellines en primer lugar 2,5 L de la solución stock de azúcar, luego un volumen aproximado de 200 mL de cerveza por volcado, y por último, 0,8 mL de la solución de levadura hidratada. Las botellas se taparon con tapones de corona mediante una chapadora manual.

Las cervezas se dejaron fermentar durante 10 días a temperatura ambiente, y acabada la fermentación, se metieron a la nevera a 4°C.

3.7. Análisis instrumental

3.7.1. Densidad

La densidad de las muestras se analizó a temperatura ambiente (20°C) con una probeta de 50 mL y un densímetro del rango 1000-1050 kg/m³.

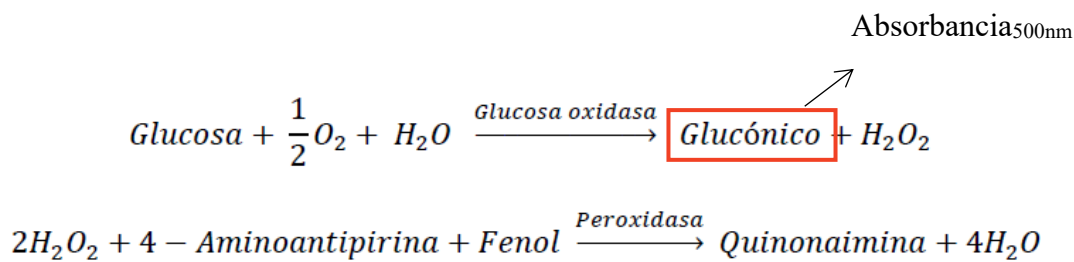
3.7.2. pH

El pH de las muestras se analizó a temperatura ambiente (20°C) con un pHímetro portátil de la marca Metria, modelo M22 previamente calibrado.

3.7.3. Glucosa

El análisis del contenido de glucosa se realizó con un kit enzimático de Biosystems que permite medir la glucosa presente en una determinada muestra mediante espectrofotometría a 500 nm.

Para ello, el kit contiene un reactivo con glucosa oxidasa, capaz de oxidar la glucosa presente en la muestra a ácido glucónico; y peroxidasa, que permite desplazar completamente el equilibrio hacia la formación de ácido glucónico. Pasado el tiempo de reacción, el kit mide la concentración total de glucónico en la muestra, y mediante un factor de conversión, se puede calcular la concentración de glucosa en la muestra. Las reacciones químicas que son las siguientes:



El kit tiene también un patrón que permite calcular la concentración de glucosa a partir de la absorbancia a 500 nm. El patrón está compuesto por glucosa 100 mg/dL, urea 50 mg/dL y creatinina 2 mg/dL.

Para medir la concentración de glucosa, se mezclaron 10 µL de muestra o de patrón con 1 mL de reactivo, se agitó en un vórtex y se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se midió la absorbancia del patrón y de las muestras a 500 nm en un espectrofotómetro UV-visible. La concentración de glucosa en las muestras se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{glucosa}]_{\text{muestra}} = \frac{\text{Abs}_{500 \text{ nm}} \text{ muestra}}{\text{Abs}_{500 \text{ nm}} \text{ patrón}} \times [\text{glucosa}]_{\text{patrón}}$$

3.7.4. Color

El color de las cervezas se determinó según el método de la ASBC (nº 10A), mediante espectrofotometría. El color se expresa en EBC, medida empleada por la *European Brewery Convention* para clasificar las tonalidades de las cervezas.

Las muestras de cerveza se midieron a 430 nm y a 700 nm. Cuando la absorbancia a 700 nm superó en 0,039 veces la absorbancia a 430 nm, las muestras se filtraron con un filtro de jeringa de éster de celulosa mixta (MCE) con poro de 0,45 µm. En los casos en los que fue necesario, se diluyó la muestra y se repitió la medida.

De nuevo, se midió la absorbancia a 430 nm y se calculó el valor EBC, con la siguiente fórmula.

$$EBC = 25 \times Abs_{430} \times \text{factor de dilución}$$

3.7.5. Amargor

Para calcular el amargor en unidades IBU (International Bitterness Units) se empleó un método espectrofotométrico que permite determinar la concentración de α -isoácidos de la cerveza.

Antes de realizar la medición, se llevó a cabo un protocolo de extracción líquido-líquido. Para ello, se mezclaron 10 mL de muestra con 1 mL de HCl 3M, 20 mL de isooctano y 50 μ L de octano. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 15 minutos para favorecer la interacción entre los compuestos, y posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm durante otros 15 minutos.

Tras la centrifugación, se recuperó la fase orgánica y se midió la muestra en el espectrofotómetro a 275 nm, con una cubeta de cuarzo. El amargor en IBUs se calculó con la siguiente fórmula:

$$IBUs = Abs_{275\text{ nm}} \times 50$$

3.7.6. Grado alcohólico

La determinación del grado alcohólico de las muestras se llevó a cabo mediante el método ebullométrico Barus, basado en la diferencia de temperatura de ebullición a 1 atm entre el etanol y el agua.

El equipo consta de una caldera cilíndrica en la parte inferior, una caldera refrigerante en la parte superior, un termómetro con una precisión de 0,1°C graduado en un rango de 70-100°C, un termómetro indicador, un mechero y una regla de doble entrada calibrada.

Debido a que la presión atmosférica en Madrid no es exactamente igual a 1 atm, el método se calibró previamente. Para ello, se colocaron 10 mL de agua destilada en la caldera.

El equipo se armó colocando el sistema refrigerante vacío justo encima de la caldera inferior, y el termómetro medidor en el interior de la caldera. Una vez colocada el agua y

montado el sistema, se prendió el mechero y se colocó bajo la caldera. Cuando la temperatura en el termómetro se estabilizó, se anotó como referencia de temperatura de ebullición del agua y se marcó este valor en la regla de doble entrada, fijando el cero en dicho punto.

Una vez calibrado el método, se procedió a medir las muestras. Antes de analizar una muestra se enjuagó la caldera con un pequeño volumen de la misma, y seguidamente se colocaron 50 mL de muestra en la columna. En este caso, se colocó el sistema refrigerante lleno de agua del grifo a temperatura ambiente. El termómetro medidor se colocó dentro de la caldera, y el termómetro indicador, en el sistema refrigerante. Cuando el mercurio del termómetro indicador se estabilizó dentro del espacio delimitado por las dos marcas, se anotó la temperatura indicada por el termómetro de la caldera, que corresponde con la temperatura de ebullición de la muestra. Este valor se transportó a la regla de doble entrada, obteniendo así el valor de graduación alcohólica de la muestra.

Entre las distintas muestras, la caldera se enjuagó con un poco de cerveza y el sistema refrigerante se vaciaba y se volvía a llenar con agua del grifo a temperatura ambiente.

3.7.7. Perfil de volátiles por GC-FID

El perfil de compuestos volátiles se estudió mediante cromatografía de gases. Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 (GC System Network) acoplado a un detector de ionización de llama (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE. UU). Se utilizó una columna BD-624 de dimensiones 60 m x 250 mm x 1,4 mm.

Previo al momento de la inyección, las muestras se filtraron con filtro de jeringa de éster de celulosa mixta (MCE) con poro de 0,45 μm y se añadió 1 mL de la muestra filtrada en viales cromatográficos de 1,5 mL. Por cada muestra, se añadieron 100 μL de 4-metil-2-pentanol a modo de estándar interno.

El método para la determinación de compuestos volátiles se calibró realizando rectas de calibrado de los siguientes estándares externos: acetaldehído, metanol, 1-propanol, diacetilo, acetato de etilo, 2-butanol, alcohol isobutílico, 1-butanol, acetoina, 2-metil-1butanol, 3-metil-1-butanol, acetato de isobutilo, butirato de etilo, lactato de etilo, 2,3-butanodiol, acetato de isoamilo, hexanol, 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo; que permitieron la cuantificación de las señales ($r^2 > 0,999$ para todos los compuestos excepto para 2,3-butanodiol ($r^2 = 0,991$), LOD = 0,1 mg/L).

Para la correcta separación de los componentes, se utilizó un programa de rampa de temperatura, empezando los 5 primeros minutos a 40°C y aumentando la temperatura en 10°C por minuto hasta alcanzar los 250°C. Las temperaturas del inyector y del detector fueron, respectivamente, 200 y 300°C. El volumen de inyección fue de 1 µL y como gas portador se empleó hidrógeno. Las muestras se analizaron en el siguiente orden: 7.VA, 7.VA.F, 7.VA.A, LM, LM.F, LM.A, y la primera muestra se inyectó dos veces para aumentar la precisión del método y evitar posibles interferencias. Se introdujo un ciclo de limpieza con agua cada 5 muestras. Una vez inyectadas la mitad de las muestras, se introdujo un ciclo de limpieza final con agua para lavar la columna.

Tras la obtención de los cromatogramas, los picos se identificaron mediante comparación con bibliografía disponible. La concentración de cada compuesto se calculó por integración de los picos de los cromatogramas.

3.7.8. Perfil de antocianos por HPLC

Para la identificación de antocianinas se utilizó un cromatógrafo HPLC serie 1260 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD). La columna utilizada para la separación de pigmentos fue una columna de fase reversa Poroshell 120 C18 (Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) con dimensiones de 50 mm × 4,6 mm y un tamaño de partícula de 2,7 µm.

Previo a la inyección, se filtró 1 mL de cada muestra con un filtro de jeringa de éster de celulosa mixta (MCE) con poro de 0,45 µm y se colocaron todas ellas en viales cromatográficos de 1,5 mL de capacidad.

Como fase móvil se utilizó una dilución de agua-ácido fórmico 95:5 v/v (disolvente A) y metanol-ácido fórmico 95:5 v/v (disolvente B). El gradiente empleado fue el siguiente: 0–2 min, 25 % B; 2–10 min, 25–50 % B lineal; 10–11 min, 50 % B; 11–12 min, 50–2 % B lineal; y 12–17 min, reequilibración.

La presión durante todo el proceso se mantuvo en 200 bar, y se fijó un caudal de 1 mL/min. La temperatura fue de 25°C y el volumen de inyección fue de 50 µL para todas las muestras. Se estableció una longitud de onda de 525 nm para medir los antocianos.

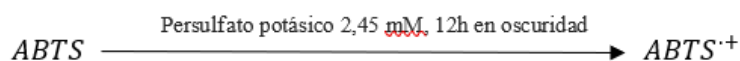
Una vez obtenidos los cromatogramas, los antocianos presentes en la muestra se identificaron mediante comparación con bibliografía disponible. La concentración de los antocianos se obtuvo por integración de los picos para cada señal a partir de una recta de calibrado de malvidin-3-O-glucósido como estándar externo ($r^2 = 0,9999$, LD = 0,1 mg/L)

3.7.9. Índice de polifenoles totales (IPT)

Los polifenoles totales de la cerveza se analizaron mediante espectrofotometría a 280 nm. Se realizó una dilución 1:50 en agua destilada para todas las muestras de cerveza, añadiendo en tubos Eppendorf de 5 mL de capacidad, 60 μ L de muestra y 2,94 mL de agua destilada hasta completar un volumen total de 3 mL. Las muestras se agitaron durante 10 segundos con el objetivo de homogenizar la dilución, y seguidamente se midieron a 280 nm con una cubeta de cuarzo. Como blanco, se empleó agua destilada.

3.7.10. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las muestras se midió siguiendo el protocolo descrito por Re et al. en 1999 (76). El día anterior al análisis de la capacidad antioxidante de las muestras, se preparó una dilución de ABTS a concentración 7 mM en agua destilada. A esta disolución se añadió persulfato potásico hasta una concentración de 2,45 mM y se dejó reaccionar en oscuridad durante 12-16 h. Con esto, se consigue la oxidación parcial del ABTS a radical $ABTS^{\cdot+}$, y se genera un compuesto cromóforo verde azulado que permite estudiar la capacidad antioxidante de los compuestos mediante espectrofotometría.



El mismo día de la medición de las muestras, la dilución de $ABTS^{\cdot+}$ se diluyó nuevamente en etanol 95% hasta alcanzar una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Una vez conseguido, se procedió al análisis de las muestras y a la construcción de la recta de calibrado.

Para construir la recta de calibrado, se prepararon 50 mL de una dilución stock de Trolox a 2,5 mM en etanol 95%. A partir de esta solución stock, se prepararon otras 5 diluciones de concentraciones 2,0 mM, 1,5 mM, 1,0 mM, 0,5 mM y 0,25 mM para la construcción de una recta de calibrado. Se pipeteó en distintos tubos Eppendorfs 1 mL de la

dilución final de ABTS^{•+} y 10 µL de las diluciones de Trolox con distintas concentraciones. Las mezclas se dejaron incubar en oscuridad y temperatura ambiente (20°C) durante 4 minutos. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 734 nm.

Para la medir las muestras se pipeteó en tubos Eppendorf 1 mL de la dilución de ABTS^{•+}, y se añadieron 10 µL de muestra (tabla 3). Los Eppendorfs se incubaron en las mismas condiciones descritas para la construcción de la recta de calibrado, y la absorbancia se midió también a 734 nm pasados 4 minutos. Las muestras se analizaron por triplicado.

Tabla 3. Volúmenes para la medida de la capacidad antioxidante de las muestras según Re et al. (1999).

	Blanco	Patrón	Muestras
ABTS ^{•+} (0,7±0,02 a 734 nm)	1 mL	1 mL	1 mL
Trolox 2,5 mM	-	10 µL	-
Muestra (cerveza)	-	-	10 µL

A partir de los datos obtenidos, el porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} \cdot 100$$

Una vez calculado el porcentaje de inhibición, mediante la ecuación de la recta de calibrado se puede calcular la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox, de la siguiente manera:

$$\text{Capacidad antioxidante en equivalentes trolox} = \frac{\% \text{ inhibición} - b}{a}$$

Donde a y b son respectivamente la pendiente y la ordenada de la ecuación de la recta de calibrado generada a partir de las soluciones de Trolox, expresada como y (% de inhibición) = aX (concentración de Trolox) + b.

3.8. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras se realizó mediante una prueba sensorial cuantitativa con escalas, con un panel de 8 catadores pertenecientes al Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos de la ETSIAAB (UPM).

El grupo de catadores se formó con 2 hombres y 6 mujeres del rango de edades de 20 a 55 años. Cada panelista evaluó 20 atributos en una hoja de cata: 6 atributos visuales, 6 atributos olfativos, 6 atributos gustativos, y 2 atributos globales, puntuando la intensidad de los descriptores en una escala creciente de números enteros del 1 al 5, siendo 1 el valor más bajo y 5 el valor más alto. Los atributos valorados se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Atributos valorados durante el desarrollo de la prueba de análisis sensorial.

Atributos visuales	Color de la cerveza, turbidez, efervescencia, consistencia de la espuma, persistencia de la espuma, color de la espuma.
Atributos olfativos	Intensidad aromática, calidad aromática, aroma a malta, aroma floral, aroma frutal, aroma oxidado-reducido.
Atributos gustativos	Cuerpo, dulzor, acidez, amargor, astringencia, efervescencia.
Atributos globales	Retrogusto, percepción global.

Para ciertos atributos (color de la cerveza, color de la espuma, consistencia de la espuma, persistencia de la espuma, retrogusto, y presencia de oxidación-reducción en la cerveza), se proporcionó a los catadores una guía de valoración para unificar el criterio. La hoja de cata proporcionada y la guía de los descriptores se adjuntan en el anexo 9.1.

La cata se llevó a cabo en una sala especializada, con luz blanca, con una temperatura controlada de 21°C, ventilada y preparando las muestras previamente a la entrada de los catadores en la sala.

Tabla 5. Orden de presentación y codificaciones para las distintas muestras durante la prueba de análisis sensorial

Orden de presentación	Código	Cerveza	Condiciones
1	256	7.VA	<i>S. cerevisiae</i>
2	952	7.VA.F	<i>S. cerevisiae</i> con fruta
3	671	7.VA.A	<i>S. cerevisiae</i> con antocianos
4	840	LM	<i>Lachancea-Metschnikowia</i>
5	187	LM.F	<i>Lachancea-Metschnikowia</i> con fruta
6	913	LM.A	<i>Lachancea Metschnikowia</i> con antocianos

A cada catador se le presentaron 6 muestras distintas, correspondientes a los 6 tipos de cerveza, en copas de cristal y sobre un mantel blanco. Las muestras se codificaron con códigos de 3 cifras aleatorias y se presentaron de izquierda a derecha tal y como se muestra en la tabla 5. Se proporcionó un vaso de agua a cada juez.

3.9. Análisis estadístico

La descripción de los estadísticos se llevó a cabo calculando la media y la desviación estándar para todas las muestras, cada una de ellas por triplicado. El procesamiento estadístico de los datos se llevó a cabo con el software Microsoft Excel 365 versión 2504 (Microsoft, Redmond, Washington, Estados Unidos).

En los casos pertinentes, se estudiaron las diferencias significativas entre las muestras con un análisis de varianza ANOVA de dos factores: “*tipo de levadura*” y “*tipo de aditivo*”. Para cada factor, se definen los siguientes niveles: *tipo de levadura* (7.VA, LM) y *tipo de aditivo* (sin, fruta, antocianos). Se fijó el nivel de significación en 0,05 (diferencia significativa si $p < 0,05$) y se realizó la prueba de la diferencia mínima (LSD). Para llevar a cabo el contraste de hipótesis, se utilizó el software Statgraphics Centurion 19 v19.6.04 (Graphics Software System, Rockville, MD, Estados Unidos).

Para relacionar el perfil aromático obtenido por métodos analíticos con el perfil aromático obtenido por evaluación sensorial se llevó a cabo una correlación de Pearson y un Análisis de Componentes principales (PCA) con el complemento XLSTAT versión 2025.1.1 (Addinsoft, París; Francia) para Microsoft Excel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo de implantación

Antes de inocular el mosto de cerveza y arrancar la fermentación, se llevó a cabo un ensayo de implantación para conocer la cinética fermentativa y decidir la condición óptima de inoculación del mosto con *L. thermotolerans* L31 y *M. pulcherrima* M29.

Por problemas operativos que podrían producir una contaminación de las muestras, 6 de los 18 viales se debieron descartar. El ensayo se continuó por duplicado.

Los días 0, 2, 5 y 7 se realizaron recuentos de microorganismos mediante siembra en placas de medio YPD con los cultivos aislados de L31 y M29, lo que nos permitió conocer por separado los perfiles de crecimiento microbiano de *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima* en mosto de cerveza. La curva de crecimiento microbiano para ambas levaduras se incluye en la figura 3.

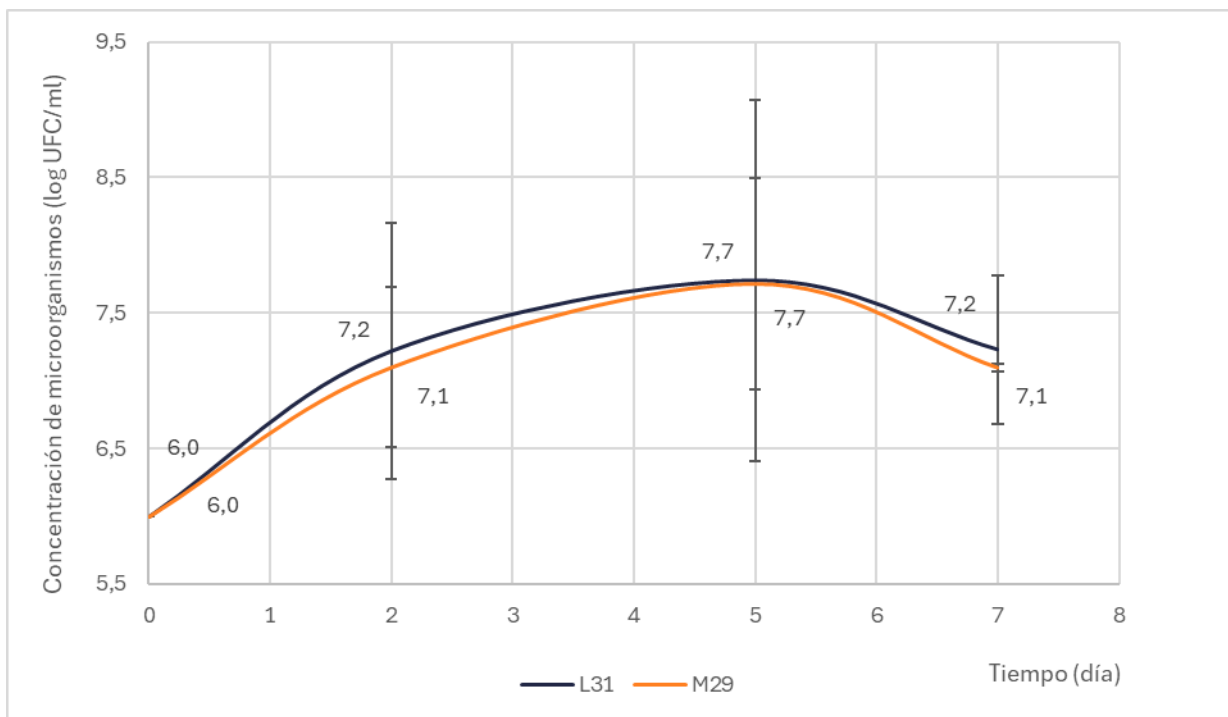


Figura 3. Curva de crecimiento microbiano para *Lachancea thermotolerans* L31 y *Metschnikowia pulcherrima* M29 en mosto de cerveza.

Como cultivos puros, ambas cepas muestran cinéticas de crecimiento similares. Los cultivos se inocularon a una densidad de 6 log UFC/mL, y ambas levaduras alcanzan un máximo poblacional de 7,5 log CFU/mL durante el día 5, momento a partir del cual la población comienza a descender, probablemente por la depleción de nutrientes en el medio.

Estos resultados son coherentes con otros estudios relacionados. Por ejemplo, Drosou *et al.* estudiaron el crecimiento de *M. pulcherrima* Flavia 385 en un mosto rico en maltosa, sacarosa y fructosa simulando el mosto de cerveza (77). Los resultados que obtuvieron son similares a los que aparecen en la figura 3, alcanzando un aumento poblacional de un orden de magnitud durante los primeros 7 días de fermentación a 20°C. Por otro lado, un estudio sobre el potencial fermentativo de *L. thermotolerans* también mostró resultados similares a

los presentes en este estudio, alcanzando *L. thermotolerans* un máximo poblacional de log 7,8 UFC/mL tras 4 días de fermentación a 20°C en mosto de cerveza (78).

Los días 0, 2, 5 y 7 del ensayo de implantación se sembraron placas de agar cromogénico para las condiciones 1:1, 1:5, 1:10 y secuencial, y tras 72 horas de incubación se hizo recuento de UFC. El medio cromogénico es un medio diferencial y por tanto permite distinguir las levaduras que crecen en él. De esta manera, las colonias de *L. thermotolerans* L31 aparecen coloreadas de morado, mientras que las colonias de *M. pulcherrima* M29 son blancas. Esto permite recontar fácilmente las UFC correspondientes a cada levadura. La figura 4 muestra los recuentos de log UFC/mL de las cuatro condiciones estudiadas a lo largo de los días.

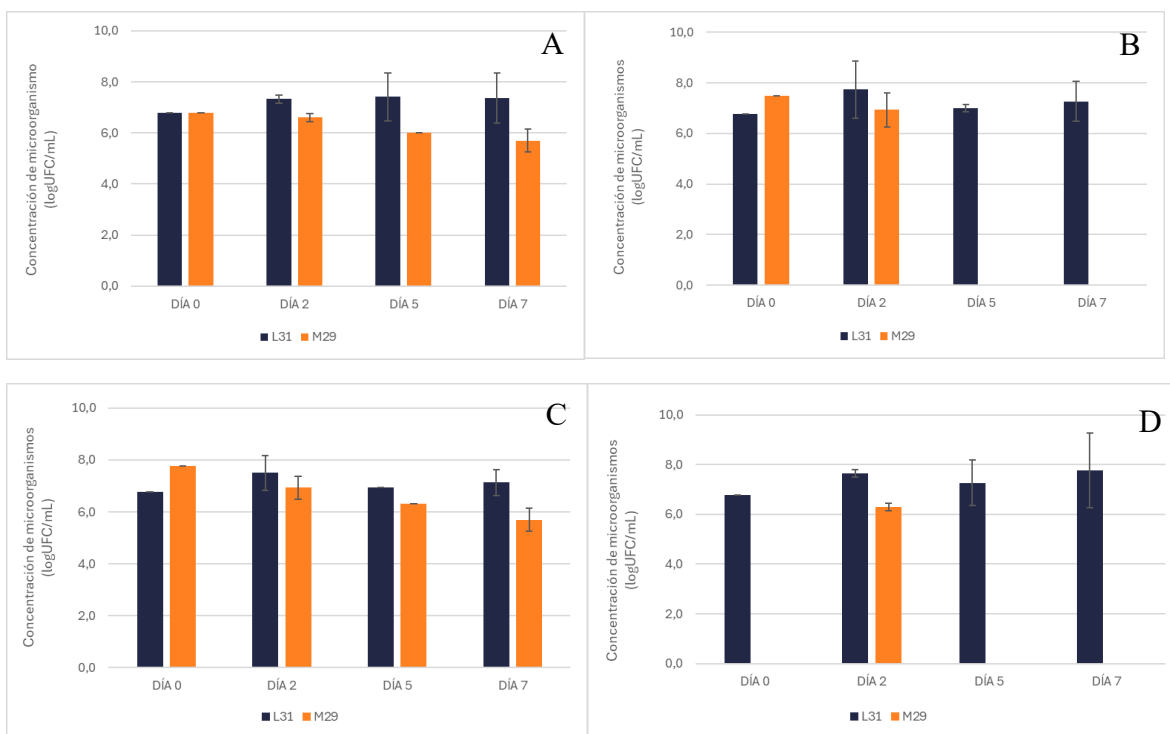


Figura 4. Representación del crecimiento de levaduras en mosto de cerveza durante el ensayo de implantación. Se incluyen los resultados para la inoculación en A: 1:1; B: 1:5; C: 1:10; y D: secuencial.

El cultivo inoculado en proporción 1:1 muestra un aumento de la población de L31 en el mosto desde los días 0 a 5, alcanzando en el día 5 el máximo de densidad poblacional. El crecimiento aumenta un orden de magnitud con respecto a la densidad inoculada, al igual que ocurre en la figura 3. Asociado al crecimiento de *Lachancea thermotolerans* L31, se

observa una disminución de la población celular de *Metschnikowia pulcherrima* M29 desde el inicio del inóculo. La densidad máxima en este caso se alcanza el día 0 y corresponde con la cantidad inoculada. En el día 7, la población celular ha descendido considerablemente, hasta 10 veces menos que la densidad inoculada el día 0 del ensayo. Se observa un fenómeno de competencia entre ambas cepas inoculadas, ya que este fenómeno solo ocurre al co-inocular L31 con M29 y no en sus respectivos cultivos puros.

Algo similar ocurre con la condición 1:5. En el día 2 de ensayo, se puede ver que L31 crece exponencialmente, mientras que la población de M29 disminuye significativamente. En este caso, el máximo de densidad celular para L31 se alcanza el día 2, mientras que la población de M29 disminuye. De la misma manera que ocurre al coinocular las levaduras en proporción 1:1, se establece una competencia entre ambas especies, lo que provoca la supervivencia de L31 frente a M29, que desciende hasta un orden de magnitud de densidad poblacional en apenas dos días.

Al inocular las levaduras en proporción 1:10, se establece un fenómeno de competencia similar, pero en este caso M29 presenta una mayor tasa de viabilidad, al presentar mayor densidad celular para los días 0, 2 y 5 que el resto de las condiciones. Debido a que el inóculo de M29 en este caso es mayor, las levaduras de esta cepa parecen ser capaces de sobrevivir ligeramente mejor que en otros supuestos, alcanzando hasta un 50% más de viabilidad en el día 5 que en el caso del co-inóculo en proporción 1:1. Sin embargo, al cabo de 1 semana, la densidad poblacional de M29 vuelve a disminuir, al igual que ocurre en la condición 1:1.

La competencia que se establece entre las levaduras empleadas puede deberse a diversas causas. A la hora de inocular mosto de cerveza, es interesante seleccionar cepas de levaduras capaces de fermentar los azúcares del mosto (44). En este contexto, se ha estudiado la capacidad fermentativa de ambas levaduras, tanto juntas como por separado. Se sabe que *Lachancea thermotolerans* es capaz de fermentar glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa con una actividad similar a *S. cerevisiae* (30,31), pero no es capaz de fermentar maltotriosa (16). Por otro lado, *Metschnikowia pulcherrima* es capaz de fermentar glucosa y fructosa, pero no maltosa ni maltotriosa (44). El hecho de que *Lachancea* tenga una mayor disponibilidad de nutrientes en el medio, gracias a que es capaz de fermentar más tipos de azúcares residuales puede fomentar el crecimiento de *Lachancea* frente a *Metschnikowia* en mosto de cerveza.

Otro factor a tener en cuenta es que, en ciertas levaduras, la presencia de concentraciones elevadas de maltosa en el medio puede producir un efecto de represión catabólica en el metabolismo de la glucosa (79–81), fenómeno que también podría explicar la disminución de las colonias de *Metschnikowia pulcherrima* en los experimentos.

Aunque no se ha encontrado bibliografía sobre estudios de co-inoculación de *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima* en mosto de cerveza, sí se ha estudiado la cinética de crecimiento de esta asociación en mostos de vino, pudiendo observar que la densidad poblacional disminuía progresivamente a medida que la concentración en etanol aumentaba, y que en general *Lachancea thermotolerans* resultó ser mejor biocompetidor que *Metschnikowia pulcherrima* (82).

En vista de todo esto, se decidió continuar el experimento inoculando L31 y M29 en el mosto en proporción 1:10, ya que durante los primeros días del ensayo, M29 muestra mayor crecimiento en esta condición que en otras, y por tanto se espera que tenga mayor influencia durante la primera fermentación del mosto.

4.2. Seguimiento del proceso de elaboración del mosto.

Durante la elaboración del mosto de cerveza se analizaron densidad, pH y concentración de azúcares totales. La evolución de la densidad a lo largo del proceso de elaboración se recoge en la figura 5.

El tiempo 0 se corresponde con el inicio de la maceración de la malta, que continúa hasta el minuto 60. Desde el inicio hasta el final de la maceración, la densidad del mosto aumenta desde 1025 kg/m³ hasta 1056 kg/m³. Dentro del rango de temperaturas en los que ocurre la maceración (68-72°C), los gránulos de almidón comienzan a gelatinizar entre ellos, aumentando la viscosidad del mosto y la accesibilidad de las enzimas amilolíticas a los gránulos de almidón (83). De manera simultánea, alrededor de los 70°C las α -amilasas y β -amilasas presentes en la malta se activan y comienzan a degradar el almidón en azúcares fermentables y dextrinas (22,84), responsables de un aumento en la densidad del mosto.

Tras los 60 minutos de maceración, se realizó el lavado de la malta, disminuyendo la densidad hasta 1040 kg/m³ por la adición de agua. La densidad del mosto en este punto debería estar sobre 1050 kg/m³, por lo que, con el objetivo de aumentar la densidad final del mosto, se aumentó la duración de la cocción de 75 minutos indicados en el protocolo a 90

minutos. El tiempo 200 se corresponde con el final del proceso de elaboración, por lo que la densidad final del mosto, una vez enfriado, fue de 1051 kg/m³.

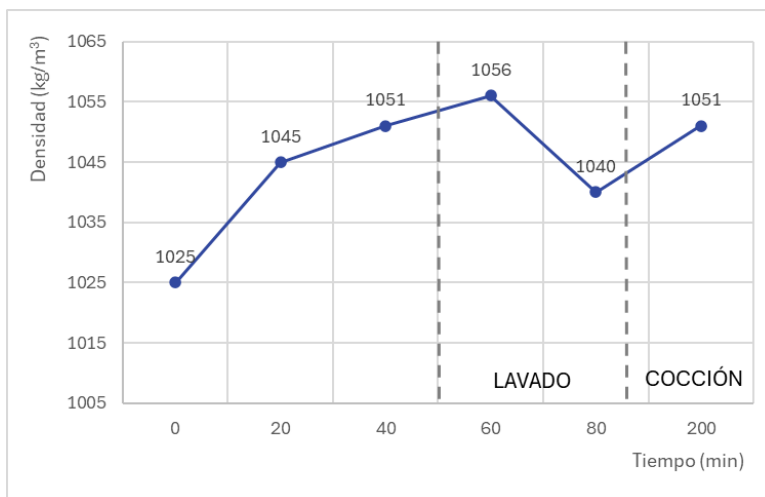


Figura 5. Evaluación de la densidad del mosto de cerveza durante la elaboración.

La evolución del pH durante la elaboración se puede observar en la figura 6. El pH al inicio de la maceración fue de 6,02. Durante los 20 primeros minutos disminuyó hasta 5,77, y luego permaneció estable hasta el final de la maceración. Tras el lavado (tiempo 80) el pH aumentó hasta 6,29 como consecuencia de la adición de agua. En este punto, el pH debería oscilar alrededor de 5,2. Para reducir el pH de 6,2 hasta 5,22, se emplearon aproximadamente 4 mL de ácido fosfórico. El pH se mantuvo estable durante toda la cocción, y el pH final del mosto permaneció en 5,22.

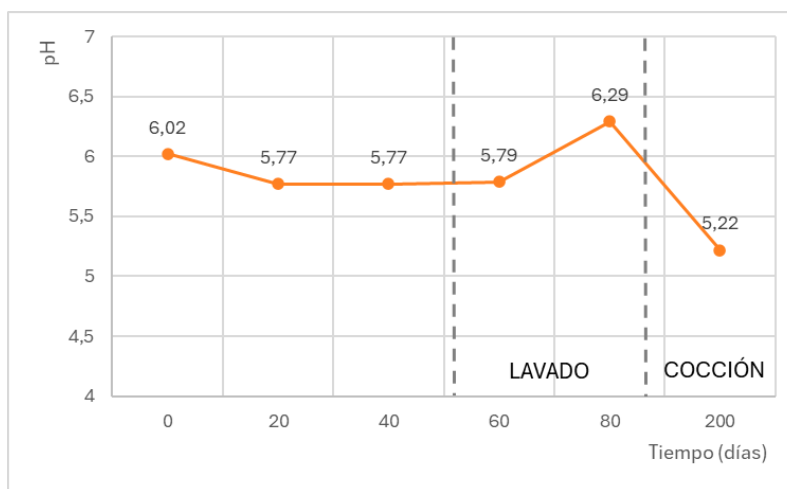


Figura 6. Evaluación del pH del mosto de cerveza durante la elaboración.

De la misma manera que se monitorizó la evaluación de densidad y pH, a lo largo de la elaboración se midieron los grados Brix del mosto mediante refractometría. Los grados Brix ($^{\circ}$ Brix) son una medida de concentración de sólidos solubles en la mezcla, lo que permite conocer de manera estimada la concentración de azúcares en el mosto de cerveza.

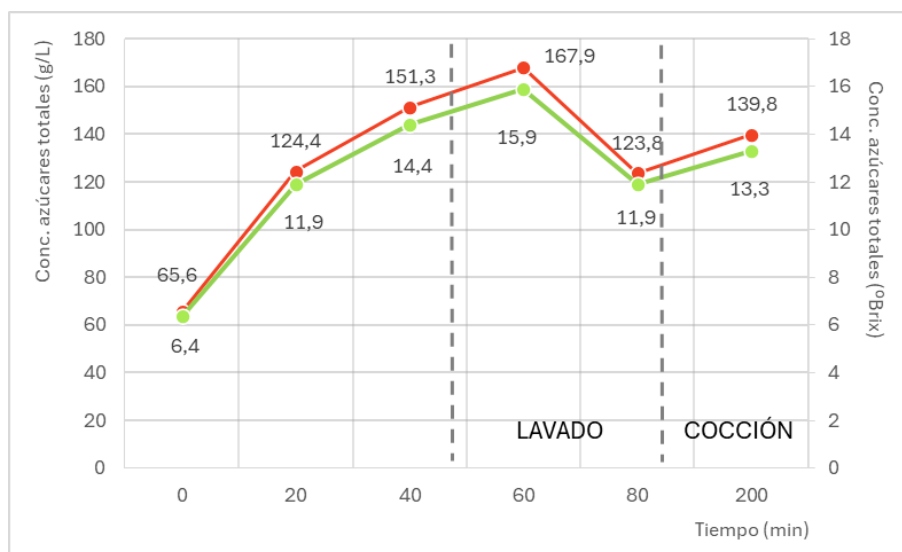


Figura 7. Evaluación de la concentración de azúcares totales en g/L (rojo) y $^{\circ}$ Brix (verde) en el mosto de cerveza durante la elaboración.

Durante la maceración (minutos 0-60) se observa un aumento en $^{\circ}$ Brix, y por tanto de la concentración de azúcares en el mosto, desde 6,5 $^{\circ}$ Brix hasta 15,9 $^{\circ}$ Brix en el momento previo al lavado (figura 7). Esto ocurre por la activación de las enzimas amilolíticas endógenas de la malta (22), aumentando la concentración de azúcares totales en el mosto.

De nuevo, debido a la adición de agua durante el lavado, los azúcares del mosto se diluyen y los grados Brix disminuyen hasta 11,9 $^{\circ}$. Tras la cocción, parte del agua se evapora y los azúcares vuelven a concentrarse, aumentando ligeramente los $^{\circ}$ Brix, hasta un valor de 13,3 $^{\circ}$. Hoff *et al.* (2013) evaluaron el efecto de la variedad de la malta en las propiedades del mosto, obteniendo valores muy cercanos a los obtenidos en este ensayo (85).

4.3. Seguimiento de las fermentaciones

Durante la primera fermentación de las cervezas, se tomaron muestras de densidad (kg/m^3), pH, y concentración de glucosa (g/L) para controlar y monitorizar el proceso de fermentación en cada experimento. Los datos se recogen en las figuras 8, 9, 10 y 11.

La densidad del mosto inicial, una vez enfriado a 20°C fue de 1051 kg/m^3 . Tras la inoculación con *Saccharomyces cerevisiae* 7.VA y co-inoculación de *Lachancea thermotolerans* L31 y *Metschnikowia pulcherrima* M29, la densidad fue disminuyendo paulatinamente a medida que transcurría la fermentación. El proceso se dio por finalizado cuando el valor de densidad descendió hasta 1015 kg/m^3 .

Como se puede ver en la figura 8, las cervezas 7.VA.F y LM.F (*Saccharomyces cerevisiae* con arándanos y *Lachancea-Metschnikowia* con arándanos) acabaron la fermentación en los primeros 7 días, alcanzando una densidad de 1012 y 1015 kg/m^3 respectivamente. El día 7, 7.VA tenía una densidad de 1017 kg/m^3 , por lo que se esperó tres días más para ponerla en frío. La cerveza co-inoculada con *Lachancea thermotolerans* L31 y *Metschnikowia pulcherrima* M29, tardó 18 días en acabar la fermentación. Las cervezas 7.VA.A y LM.A, en las cuales se añadió extracto de antocianos de uva, no terminaron la fermentación pasadas las 2 semanas, estancándose en densidades de 1027 kg/m^3 y 1045 kg/m^3 respectivamente.

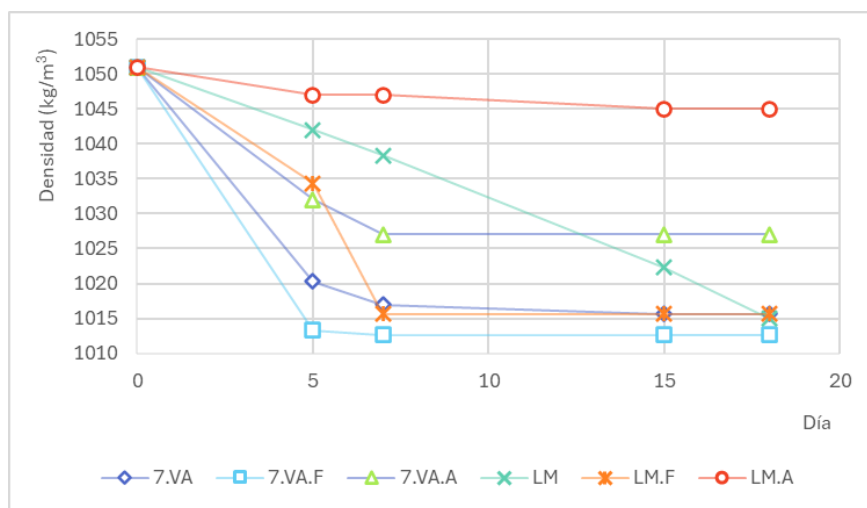


Figura 8. Evolución de la densidad (kg/m^3) de las cervezas durante la etapa de fermentación para la primera prueba realizada.

El efecto de la presencia de antocianos en las fermentaciones 7.VA.A y LM.A se relacionó con una elevada concentración de sulfitos en el concentrado de antocianos. Varios estudios sobre la viabilidad de *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima* en presencia de sulfitos (SO₂) demuestran que estas levaduras son muy sensibles a altas concentraciones de este compuesto. En el estudio de Nally et al. (2018) se observa que *L. thermotolerans* pierde capacidad fermentativa a concentraciones de SO₂ mayores a 300 mg/L (86), mientras que Comitini et al. (2010) estudiaron la resistencia a SO₂ de varias cepas de *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*, que demostraron ser sensibles a concentraciones mayores de 40 y 60 mg/L respectivamente (48).

Por otro lado, *S. cerevisiae* tiene ciertos mecanismos moleculares característicos que le confieren resistencia a SO₂ (87), por lo que en este caso, se abren varias posibilidades que hayan podido forzar la parada de la fermentación en 7.VA.A. Podría ser que, a pesar de presentar una mayor tolerancia a altas concentraciones de SO₂ en el medio que *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*, la concentración en el medio fuese demasiado elevada como para permitir la supervivencia de la población celular. De hecho, la exposición a altas concentraciones de sulfito puede disminuir la concentración intracelular de lisina y arginina, afectando a la integridad de la membrana plasmática (88), lo que explicaría este fenómeno.

En vista de los resultados, se realizó una segunda prueba de fermentación de 7.VA.A y LM.A, con menor cantidad de extracto de antocianos, con el objetivo de reducir la presencia de sulfitos. Para ello, se esterilizó mosto sobrante de la cocción y se adicionaron 250 µL del concentrado de antocianos por cada 600 mL de mosto. La representación de los datos se recoge en la figura 9.

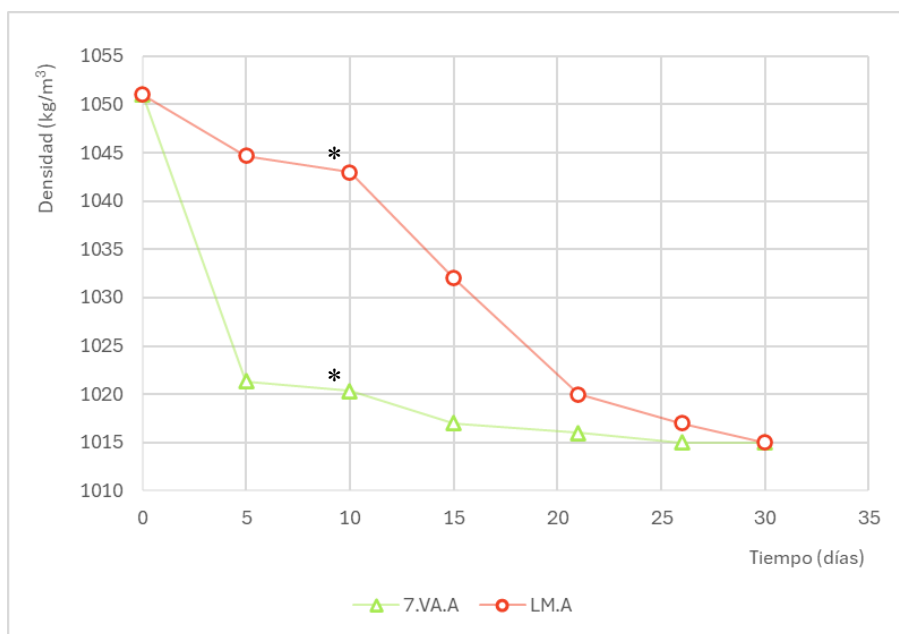


Figura 9. Evolución de la densidad (kg/m^3) de las cervezas 7.VA.A y LM.A durante la etapa de fermentación para la segunda prueba realizada. El asterisco (*) marca el momento de la reinoculación de los cultivos.

Durante los 5 primeros días, las fermentaciones 7.VA.A y LM.A se desarrollaron correctamente, disminuyendo la densidad del mosto mucho más en las botellas inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* que en las botellas inoculadas con *Lachancea* y *Metschnikowia*. Sin embargo, de los días 5 a 10 la fermentación se detuvo y la densidad estuvo 5 días sin disminuir. En este punto, el día 10 se reinocularon las botellas y se puso en marcha de nuevo la fermentación (figura 9). Las botellas inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* 7.VA terminaron la fermentación sobre los días 20-25, mientras que las botellas coinoculadas con *Lachancea* y *Metschnikowia* no terminaron hasta el día 30. Debido a que la fermentación en esta segunda prueba fue exitosa, se desecharon las primeras cervezas y se siguió el estudio con estas dos muestras.

La causa más probable que justifica la detención de la fermentación en este caso es que las placas a partir de las cuales se preparó el preinóculo de *Lachancea thermotolerans* L.31, *Metschnikowia pulcherrima* M29 y *Saccharomyces cerevisiae* 7.VA, no estaban lo suficientemente frescas y tras 48 horas de crecimiento en medio líquido, el cultivo no tenía una densidad óptica suficiente y la tasa de inoculación no fuese suficiente.

Las cervezas con frutas mostraron la mayor tasa de fermentación, tardando 7.VA.F y LM.F, 5 y 10 días respectivamente desde el momento de la inoculación. La adición de fruta a la cerveza supone un aumento en la concentración de glucosa del mosto, lo que aumenta el contenido de azúcares fermentables. Como la disponibilidad de nutrientes aprovechables en el medio es mayor, las levaduras pueden crecer más rápido y con más facilidad, resultando en una actividad fermentativa aumentada con respecto al resto de condiciones.

Seguidas de estas, las cervezas sin frutas fermentaron a una velocidad algo inferior, aunque de nuevo las cervezas inoculadas con *S. cerevisiae* tardaron menos días en fermentar que las cervezas inoculadas con *Lachancea-Metschnikowia*.

Por último, las cervezas que tardaron más en acabar la fermentación fueron las cervezas suplementadas con antocianos de uva, aunque no se puede asociar este hecho a la presencia de antocianos, ya que al reinocular de nuevo los cultivos, la fermentación terminó exitosamente en un lapso de días similar al de las otras condiciones. Además, 7.VA.A y LM.A muestran una tendencia muy similar a sus respectivas condiciones sin antocianos ni fruta (figuras 8 y 9), cosa que no ocurre en el caso de 7.VA.F y LM.F, donde se aprecia claramente que la densidad disminuye mucho más rápido.

En general, se puede observar en todos los casos que *S. cerevisiae* tiene más capacidad fermentativa que *Lachancea-Metschnikowia*, lo cual se corresponde con los datos obtenidos en otros ensayos similares. En varios estudios sobre fermentación de mostos de cerveza, *Lachancea thermotolerans* parece tener una menor tasa fermentativa que *Saccharomyces cerevisiae* (32,89). Esto puede deberse a la incapacidad de *Lachancea thermotolerans* para fermentar maltotriosa (30,31), a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque se ha demostrado que puede fermentar de manera efectiva y con valores similares fructosa, glucosa y sacarosa. A pesar de que no existe mucha bibliografía sobre el uso de *Metschnikowia pulcherrima* en fermentación de mosto cervecero, sí se ha estudiado su uso en fermentaciones enológicas. En el estudio de Comitini et al. (2010) se evalúa la capacidad fermentativa de *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima* frente a *Saccharomyces cerevisiae* en vinos, demostrando también una menor capacidad fermentativa de las levaduras no convencionales (48).

El pH inicial del mosto fue de 5,22. Tras inocular cada botella con las levaduras correspondientes, el pH mostró una disminución considerable en los 5 primeros días de la fermentación y luego los valores se estabilizaron en todos los casos.

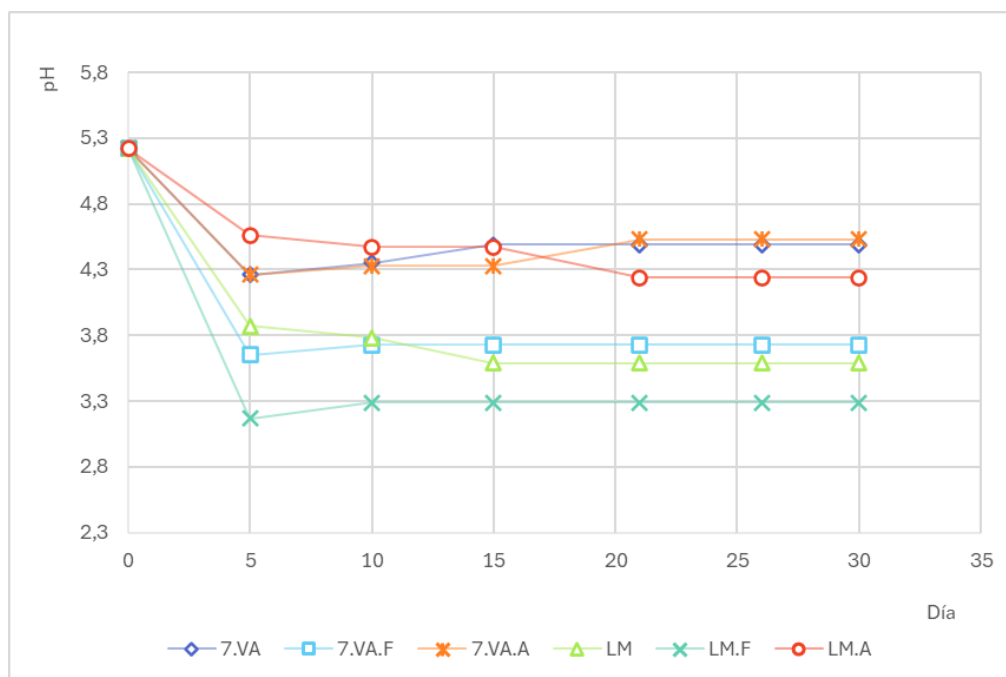


Figura 10. Evolución del pH durante la fermentación de las cervezas.

Durante la fermentación, el pH disminuye considerablemente durante los primeros 5 días en todos los casos, debido a la síntesis de ácidos orgánicos como productos del metabolismo de las levaduras (90). En el caso de LM.A y LM este descenso es más extendido en el tiempo, de acuerdo a la capacidad fermentativa disminuida de estas levaduras con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*.

En este caso, de nuevo las cervezas con frutas destacan por tener valores de pH más bajos, en consonancia a que son las cervezas con mayor disponibilidad de nutrientes y por tanto la actividad metabólica de las levaduras puede verse incrementada, produciendo mayor cantidad de ácidos orgánicos. Además, los arándanos son frutos con un pH bajo, que requieren suelos acidificados para su cultivo (91) y por tanto es un factor a tener en cuenta para explicar la disminución del pH con respecto al resto de cervezas.

Finalmente, también se puede observar que, a excepción de 7.VA.F, las cervezas con el pH final más ácido son las inoculadas con *Lachancea-Metschnikowia*, debido a la producción de ácido láctico por *L. thermotolerans* (30,89,92).

Durante la fermentación, también se evaluó el consumo de glucosa. Los resultados se recogen en la figura 11.

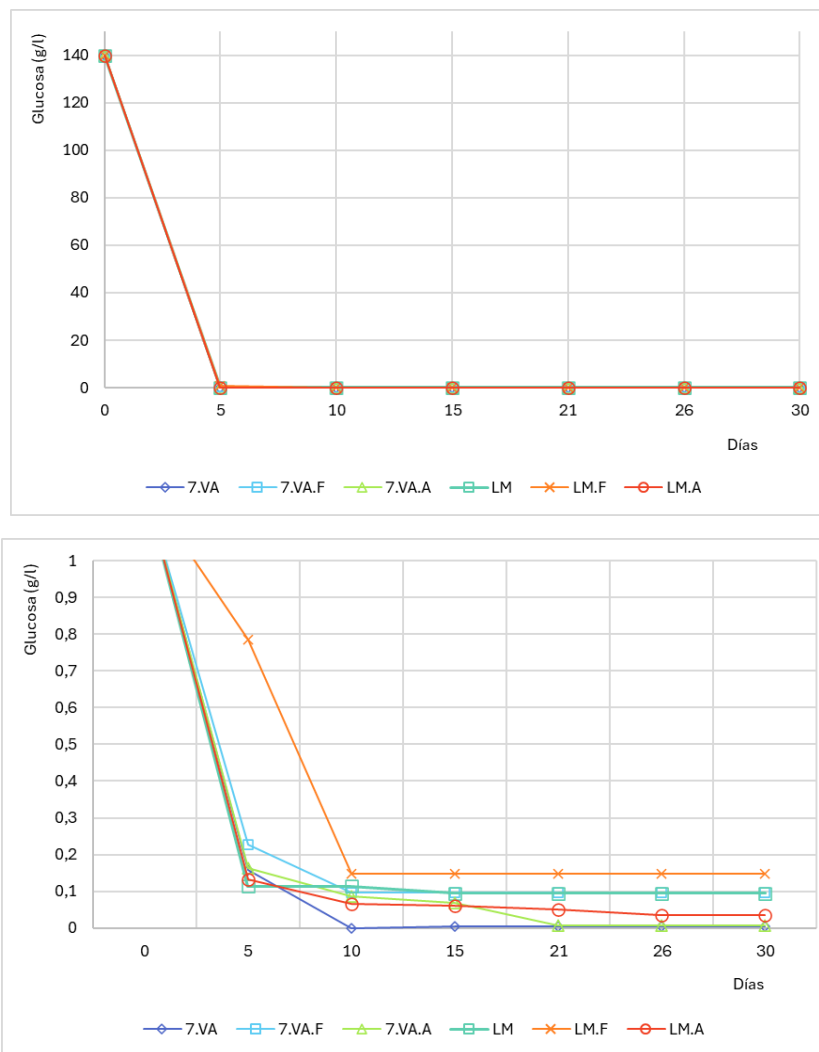


Figura 11. Evolución del consumo de glucosa durante la fermentación del mosto.

La concentración de glucosa disminuyó considerablemente durante los 5 primeros días de fermentación, obteniendo incluso valores por debajo de la sensibilidad del método en algunos casos.

En general, se puede apreciar cómo las cervezas con fruta tienen más azúcar residual al final de la fermentación, ya que la adición de puré de arándanos supone una fuente importante de glucosa en el mosto y, por lo tanto, una vez acabada la fermentación sigue habiendo glucosa presente en el mosto, aunque esa glucosa no derive de la malta. También se puede apreciar que las cervezas elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae* (7.VA) presentan valores residuales menores que las cervezas elaboradas con *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima*, en consonancia con una mayor capacidad fermentativa de *Saccharomyces* frente a las otras dos levaduras, tal y como se ha comentado anteriormente.

Destaca que, a pesar de agotar la glucosa del mosto durante los primeros días, las cervezas elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de continuar su fermentación, debido a que, como ya se dijo anteriormente, son capaces de asimilar otros azúcares presentes en el mosto como la maltosa y la maltotriosa. Por el contrario, las cervezas fermentadas con *Lachancea* y *Metschnikowia* fermentan mucho más despacio cuando se agota la glucosa por su incapacidad de asimilar maltotriosa (16).

4.4. Parámetros fisicoquímicos de la cerveza final

Tras la finalización de la segunda fermentación, se analizó el pH, densidad, color, amargor, concentración de glucosa residual y graduación alcohólica de todas las cervezas. Los resultados se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de las cervezas finales.

	pH	Densidad (kg/m ³)	Glucosa residual (g/L)	Color (EBC)	Amargor (IBUs)	Graduación alcohólica (%v/v)
7.VA	4,35 ± 0,006 ^a	1015,00 ± 0,16 ^a	0,060 ± 0,017 ^{a,b}	12,88 ± 0,77 ^a	23,92 ± 0,58 ^a	4,97 ± 0,05 ^a
7.VA.F	3,69 ± 0,009 ^b	1012,44 ± 0,17 ^b	0,040 ± 0,005 ^a	22,75 ± 0,34 ^b	11,93 ± 0,05 ^b	5,10 ± 0,00 ^{a,b}
7.VA.A	4,32 ± 0,008 ^c	1016,00 ± 0,16 ^{a,c}	0,090 ± 0,026 ^b	15,56 ± 0,25 ^{c,d}	23,42 ± 0,75 ^a	5,03 ± 0,03 ^{a,b}
LM	3,50 ± 0,017 ^d	1016,00 ± 0,17 ^c	0,019 ± 0,003 ^a	14,64 ± 0,19 ^c	22,32 ± 0,28 ^a	4,70 ± 0,13 ^{a,b}
LM.F	3,26 ± 0,002 ^e	1015,11 ± 0,10 ^d	0,034 ± 0,002 ^a	23,24 ± 0,49 ^b	9,67 ± 0,96 ^b	4,98 ± 0,13 ^{a,b}
LM.A	4,28 ± 0,027 ^c	1017,33 ± 0,16 ^c	0,046 ± 0,012 ^a	17,08 ± 0,74 ^d	16,23 ± 0,54 ^c	5,05 ± 0,06 ^b

El pH de las cervezas se ve afectado por tanto por la estrategia empleada para la fermentación como por el tipo de aditivo empleado. De esta manera, se observan diferencias significativas entre las cervezas elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae* (7.VA) y las

elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* (LM), que tienen pH más bajos. Este fenómeno se debe a la producción de ácido láctico por parte de *L. thermotolerans* (30,89). De la misma manera, la adición de arándanos tiene un efecto acidificante en la cerveza, ya que los arándanos son frutos ácidos (91) y por tanto su adición supone un descenso del pH de las cervezas con fruta frente a aquellas que no la tienen. Por el contrario, las cervezas con antocianos presentan pH intermedios en comparación al resto de cervezas, tanto en el caso de las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* como en las cervezas fermentadas con *Lachancea-Metschnikowia*. A priori, la adición de antocianos en cerveza no tiene efectos en el pH de la cerveza (93); sin embargo, la adición de antocianos en LM.A parece inhibir la acidificación de la cerveza por parte de *Lachancea thermotolerans*, cosa que no ocurre en la elaboración de vinos (36,40). Este efecto podría deberse a la presencia de sulfitos en el mosto procedentes del propio extracto de antocianos, que podrían estar disminuyendo la capacidad fermentativa de *L. thermotolerans*, explicando así el pH y densidad elevados en comparación con el resto de las cervezas LM.

La densidad de las cervezas es similar en todos los casos, alrededor de 1015 kg/m³, destacando 7.VA.F por presentar la densidad más baja, 1012 kg/m³. De nuevo, tanto la adición de fruta como el empleo de distintas levaduras tiene efectos significativos en la densidad final de las cervezas, siendo menos densas las cervezas con frutas y las cervezas elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae*. Las frutas son alimentos muy ricos en agua, y por lo tanto la adición de una cantidad considerable en el mosto de cerveza, ha podido modificar la densidad del mosto desde un primer momento, provocando así densidades finales más bajas (como es el caso de 7.VA.F). Sin embargo, esta hipótesis es poco probable ya que no se observa una dilución del grado alcohólico en comparación a otras muestras. Por otro lado, la adición de extracto de antocianos no parece modificar la densidad final de las cervezas. A su vez, las cervezas elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae* 7.VA son ligeramente menos densas que las elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia*, lo cual podría atribuirse al mayor poder fermentativo de *Saccharomyces* frente a las otras levaduras. Aunque las diferencias estadísticas sean significativas, en la práctica las diferencias entre densidades son muy pequeñas y no resultan determinantes.

Con respecto a la concentración de glucosa residual, se puede apreciar que las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* 7.VA presentan de media el doble de glucosa residual

que las cervezas *Lachancea-Metschnikowia* (LM), lo cual resulta lógico si se tiene en cuenta que al no poder fermentar azúcares complejos como la maltotriosa (16), *Lachancea-Metschnikowia* consumirá preferentemente azúcares sencillos como la glucosa, y por tanto las concentraciones de glucosa en el producto final serán menores en estas cervezas. De hecho, los valores presentados en este estudio son muy inferiores a otros estudios similares sobre elaboración de cerveza con levaduras del género *Lachancea* y *Metschnikowia*, como por ejemplo en el estudio de Postigo et al. (2023) (89), o en el de Zdaniewicz et al. (2020) (92), de lo que se deduce que las cepas empleadas en este ensayo asimilan mejor la glucosa que otras de su especie. Por otro lado, Pirrone et al. (2024) (31) y Postigo et al. (2022) (44) presentan valores de glucosa residual muy similares en sus ensayos sobre la elaboración de cervezas con *Lachancea thermotolerans* MNF105 y *Metschnikowia pulcherrima* CLI 475, respectivamente.

El color de las cervezas se mide por la escala EBC (figura 12) de la *European Brewery Convention*, y clasifica los distintos tipos de cerveza en función de su color.



Figura 12. Escalas SRM y EBC de clasificación de colores de la cerveza (94).

En este caso, el color de las cervezas depende en gran medida del aditivo añadido, de manera que las cervezas más claras y amarillas fueron las cervezas sin ningún tipo de aditivo, seguidas por las cervezas con antocianos y por último, por las cervezas con fruta, que, debido a la adición de arándanos, adquirieron un color rojo oscuro (figura 13).



Figura 13. Cervezas finales. De izquierda a derecha: 7.VA, 7.VA.F, 7.VA.A, LM, LM.F, LM.A

El valor EBC para las cervezas con frutas es prácticamente igual al de otras cervezas elaboradas con frambuesas, moras o cerezas analizadas en un estudio del perfil fisicoquímico y de polifenoles de 29 cervezas frutales comerciales (95). En un estudio sobre la adición de bayas de Kamchatka (cuya apariencia es muy similar a la apariencia de los arándanos) también se observó un aumento del valor EBC tras la adición de la fruta, obteniendo valores muy similares a los obtenidos en este trabajo (96). Las cervezas con antocianos fueron ligeramente más oscuras que las cervezas sin aditivos, y no presentaron color rojo a pesar de ser pigmentos rojos muy intensos. Dentro del grupo de cervezas con antocianos (7.VA.A y LM.A) las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* son ligeramente más oscuras que las elaboradas con *S. cerevisiae*. Una posible explicación a esto es que los antocianos son altamente sensibles al pH, y su estabilidad es mayor a pH más bajos (56). Al ser el pH de las cervezas 7.VA.A ligeramente más alto, es posible que los antocianos se hayan degradado en mayor proporción, perdiendo pigmento en estas cervezas.

Las cervezas con frutas (7.VA.F y LM.F) tienen un amargor mucho menor que sus respectivas cervezas elaboradas sin fruta (7.VA y LM), lo cual indica que la adición de fruta en las cervezas disminuye significativamente en su amargor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rinaldi et al. (2023) (97) y por Kawa-Rygielska et al. (2018) (98) en sus estudios sobre cervezas de grosellas y cerezas, respectivamente, aunque el efecto parece más intenso en los resultados de este trabajo. Esto puede deberse a la proporción de fruta añadida en las cervezas, aunque según Rinaldi et al, la reducción de acidez no es proporcional a la concentración de fruta (97). Como se comentó previamente, la adición de fruta puede

provocar la dilución del mosto por el alto contenido en agua, disminuyendo por lo tanto el amargor de la cerveza al diluir los α -isoácidos del lúpulo.

Durante la fermentación, el amargor del mosto disminuye por varias razones, entre las que se encuentran principalmente la precipitación de los α -isoácidos y la adhesión de los α -isoácidos al unirse a las paredes de las levaduras, y la dilución del propio mosto (99–101). En este contexto, se puede comprobar que la concentración de α -isoácidos en el mosto depende en gran medida de la afinidad de los α -isoácidos por la pared de las levaduras empleadas, y por tanto el efecto es totalmente dependiente de la cepa empleada. Así, algunos estudios demuestran que las cervezas elaboradas con *L. thermotolerans* presentan una reducción significativa del amargor (89,102), mientras que en otros, el amargor de las cervezas elaboradas con *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima* resultó ser mayor en comparación con las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* (44,102,103).

La graduación alcohólica de las cervezas no varió entre unas y otras muestras, presentando valores muy similares en todos los casos. Ni la especie de levadura ni el tipo de aditivo influyen en la graduación alcohólica de las cervezas, a pesar de que *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima* presentan menor poder fermentativo que *S. cerevisiae*. Generalmente, los estudios sobre el uso de *L. thermotolerans* o *M. pulcherrima* en cervezas revelan que las cervezas fermentadas con cultivos puros *L. thermotolerans* tienen significativamente menos graduación alcohólica que aquellas elaboradas con *S. cerevisiae* (32,44,92). Sin embargo, otros estudios demuestran que, de nuevo, la capacidad fermentativa de *L. thermotolerans* depende en gran medida de la cepa empleada, y mientras que la producción de etanol es menor en algunas cepas, otras no presentan diferencias significativas con respecto a *S. cerevisiae* (30,89,102).

4.5. Capacidad antioxidante e índice de polifenoles totales

La capacidad antioxidante de las muestras se calculó mediante el método de Re et al. (1999) en equivalentes Trolox por litro (TE/L) mediante la elaboración de una recta de calibrado, enfrentando porcentaje de inhibición a distintas concentraciones de Trolox. La recta de calibrado se muestra en la figura 14.

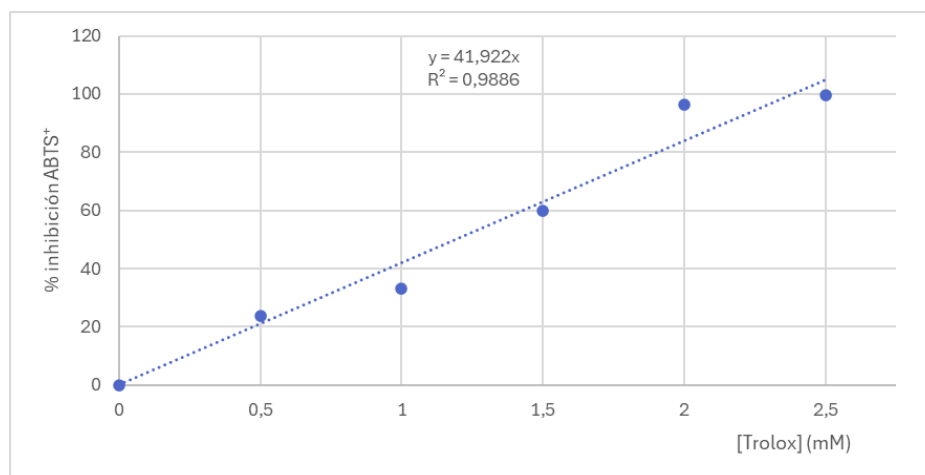


Figura 14. Recta de calibrado de la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox por litro, TE/L (mM).

La capacidad antioxidante y el índice de polifenoles totales de las muestras están directamente relacionados entre sí y con el tipo de aditivo de la cerveza. Esta capacidad antioxidante deriva de la presencia de compuestos como las melanoidinas o los polifenoles, extraídos directamente de la malta y el lúpulo durante el proceso de cocción, y que aportan respectivamente hasta el 70-80% y el 20-30% de los compuestos fenólicos presentes en las cervezas rubias (104–106).

Tabla 7. Índice total de polifenoles (IPT), capacidad antioxidante por el método ABTS (mmol TE/L) y concentración total de antocianos (mg/L) de las cervezas elaboradas.

	Índice de Polifenoles Totales (IPT)	ABTS + (mmol TE/L)	Antocianos (mg/L)
7.VA	23,97 ± 1,02 ^{a,b}	0,14 ± 0,04 ^a	n,d,
7.VA.F	24,13 ± 0,31 ^{a,b}	1,03 ± 0,05 ^b	41,23 ± 3,30 ^a
7.VA.A	23,77 ± 1,75 ^{a,b}	0,37 ± 0,05 ^c	0,37 ± 0,13 ^b
LM	21,27 ± 0,19 ^a	0,46 ± 0,07 ^d	n,d,
LM.F	27,62 ± 0,55 ^c	1,29 ± 0,02 ^c	33,37 ± 0,49 ^c
LM.A	25,33 ± 0,73 ^{b,c}	0,69 ± 0,03 ^c	3,107 ± 1,26 ^b

*Los datos representan el valor promedio ± desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes (P<0,05).

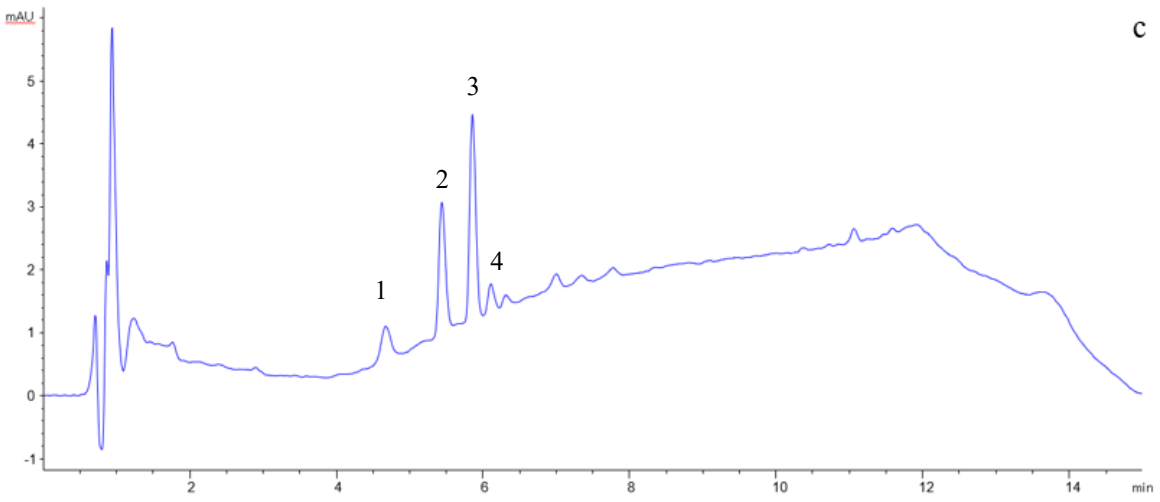
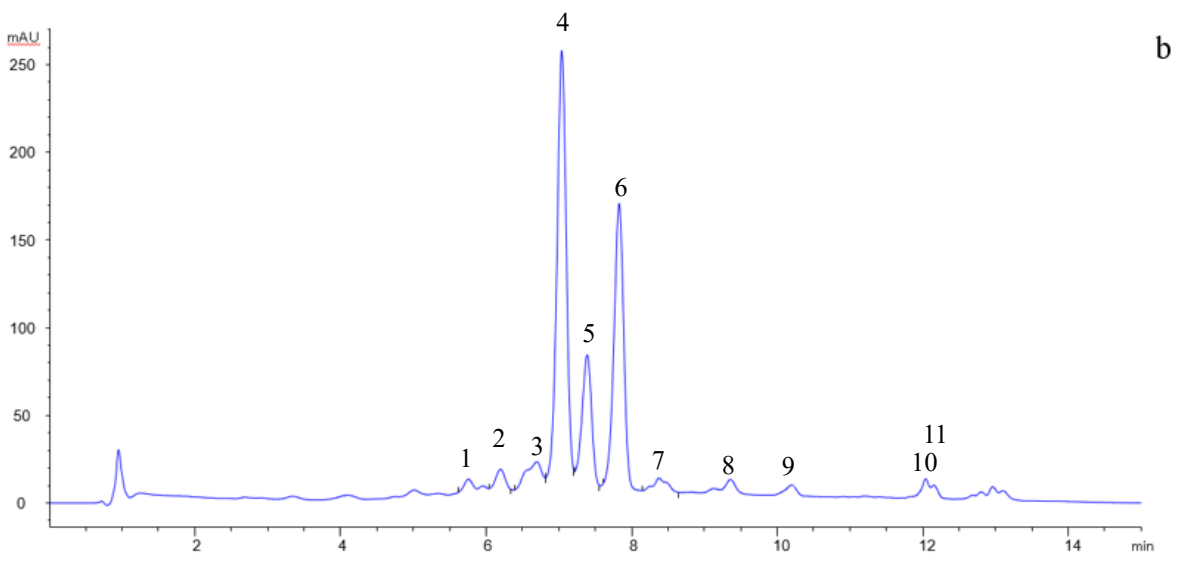
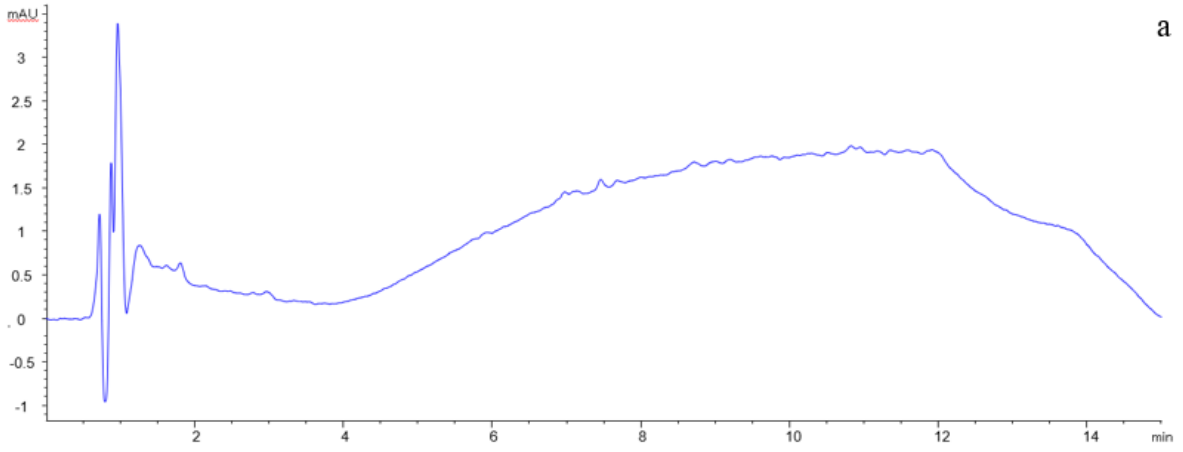
La adición de fruta en el mosto supone un aumento de la capacidad antioxidante de hasta casi 10 veces más en el caso de la cerveza 7.VA.F (de 0,14 a 1,03 mmol TE/L) y de casi 3 veces más en la cerveza LM.F (de 0,46 a 1,29 mmol TE/L), que fue la cerveza con

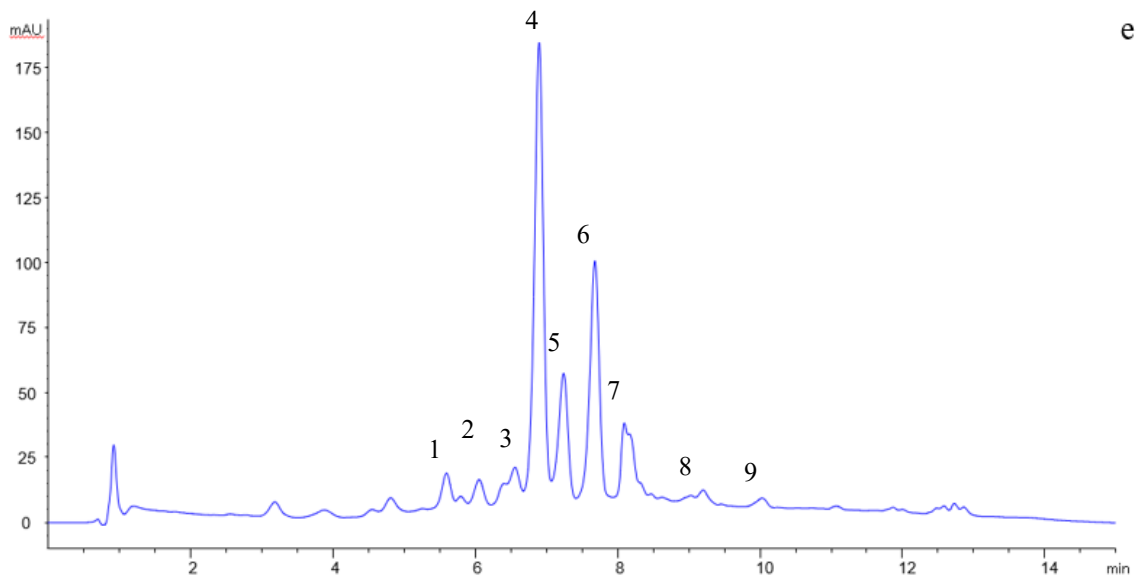
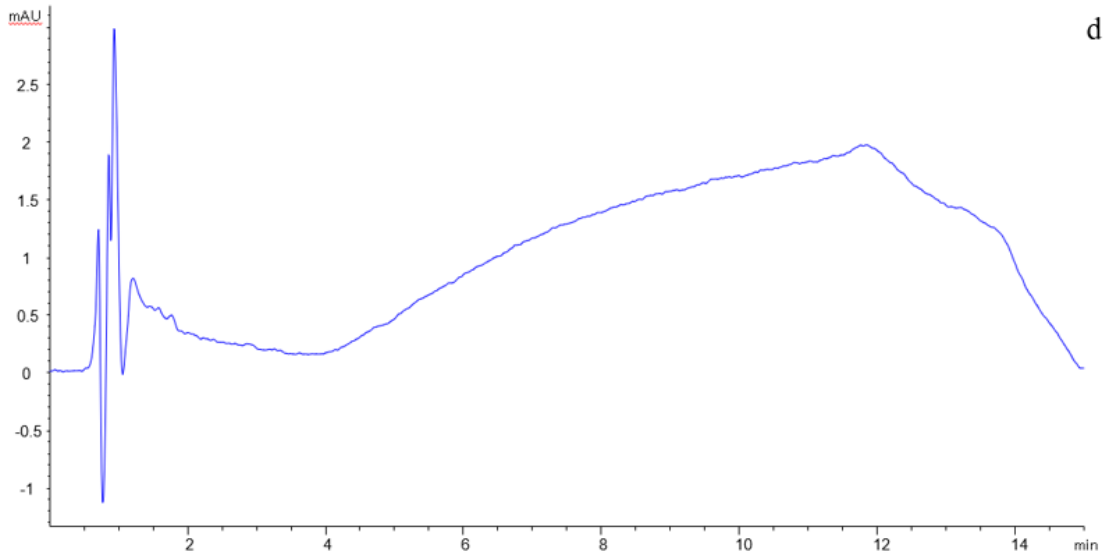
mayor capacidad antioxidante y mayor IPT. El aumento de la capacidad antioxidante en cervezas con frutas se repite en otros estudios similares como consecuencia del paso de polifenoles y flavonoides de las frutas hacia el mosto de cerveza. Este aumento de la capacidad antioxidante es mayor en ciertas frutas como cerezas, frambuesas, uvas o naranjas (74), probablemente por ser frutas ricas en antocianos, flavonoides, y otros compuestos antioxidantes (54). Belcar *et al.* (2023) (96) estudiaron la suplementación de cerveza con distintas variedades de bayas de madreSelva azul, obteniendo valores de capacidad antioxidante entre 1,27 y 1,97 mM TE/L, de manera similar a los de la tabla 7. La capacidad antioxidante de las cervezas enriquecidas con fruta depende directamente de los compuestos antioxidantes de la propia fruta, de la cantidad adicionada, del estado de la fruta en el momento de la adición y del momento en el que se añada la fruta dentro del proceso de elaboración (74,107).

Las cervezas con antocianos (7.VA.A y LM.A) también muestran una capacidad y un índice de polifenoles totales mayor que las cervezas sin aditivos, lo cual es lógico, considerando que los antocianos son sustancias polifenólicas que destacan por su capacidad antioxidante. Dentro de este grupo, las cervezas 7.VA.A tienen menos capacidad antioxidante en mmol TE/L y además su IPT es más bajo que el de las cervezas LM.A. Teniendo en cuenta que los antocianos se añadieron en la misma proporción y en el mismo punto del proceso de elaboración, es posible que los antocianos se hayan degradado en mayor proporción en la cerveza 7.VA.A, bien porque su pH es más elevado; o porque el tiempo de almacenamiento de estas cervezas fue superior que el de las cerezas LM.A. En un estudio sobre la adición de extracto de antocianos de berenjena a distintas concentraciones en cerveza se vio que el uso de extracto de antocianos en cerveza aumenta el contenido total de polifenoles, así como la capacidad antioxidante de las muestras. Este efecto es dosis dependiente (es mayor a mayor concentración de antocianos) y el efecto se pierde a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento de la cerveza (93).

4.6. Determinación de antocianos por HPLC

El perfil de antocianos de las muestras se analizó por HPLC-DAD a 525 nm, cada muestra por triplicado. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 14.





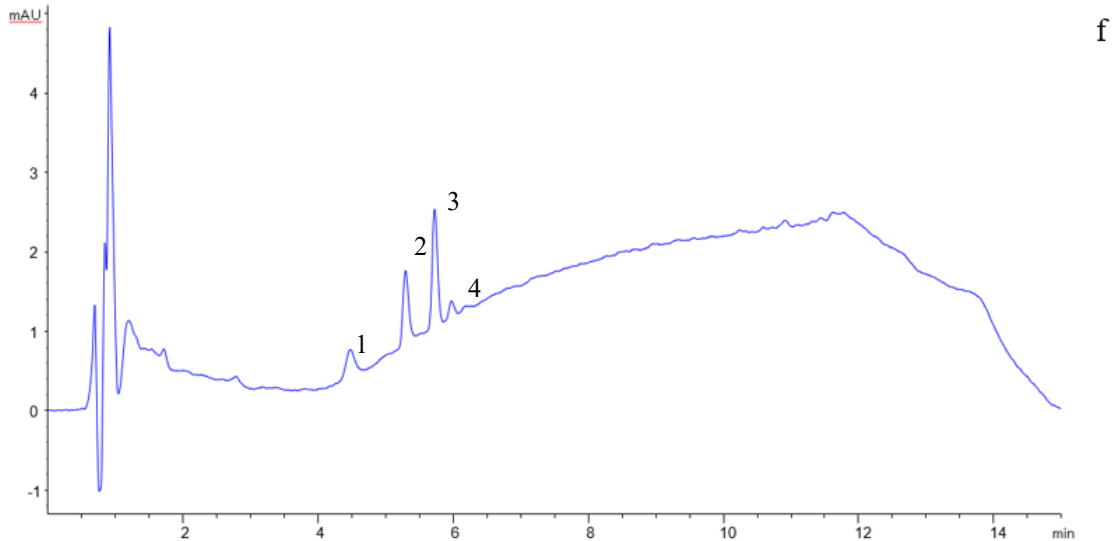


Figura 15. Perfil de antocianos de las muestras de cerveza. A: 7.VA; B: 7.VA.F; C: 7.VA.A; D: LM; E: LM.F; F: LM.A. Para 7.VA.F y LM.F, 1: delfinidin-3-(6''-acetilglucósido); 2: cianidin-3-(6''-acetilglucósido); 3: petunidina-3-(6''-acetilglucósido); 4: malvidina-3-(6''-acetilglucósido); 5: cianidina-3-(6-p-cumarilglucósido); 6: petunidina-3-(6-p-cumarilglucósido); 7: desconocido; 8: desconocido; 9: desconocido; 10: malvidin-3-glucósido-4-vinilcatecol; 11: malvidin-3-(6''-acetilglucósido-vinil-epicatequina). Para 7.VA y LM.A: 1: cianidina-3-glucósido; 2: petunidina-3-glucósido; 3: malvidina-3-glucósido; 4: malvidina-3-arabinósido

Tanto el perfil de antocianos de las cervezas como su concentración dependen exclusivamente del tipo de aditivo (fruta o extracto de antocianos) añadido durante la fermentación del mosto. Las cervezas con fruta (fig 15b y 15e) presentan las concentraciones de antocianos más altas, superando los 30 mg/L (tabla 7). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Luz *et al.* (2024) (71) al suplementar cervezas con orujo de uva concentrado al 1% del volumen, y representan casi el triple de la concentración obtenida por Machado *et al.* (2025) (108) al añadir grosellas rojas a la cerveza en el momento previo a la maduración (10 mg/L). La diferencia entre la concentración obtenida en este último estudio y la obtenida en este trabajo puede deberse a la cantidad de fruta añadida (20 g/L de grosella en el trabajo de Machado Jr *et al.* frente a 34 g/L de arándanos), al estado físico en el que se añadió la fruta (en piezas enteras o en forma de puré, ya que el procesamiento de la fruta favorece la difusión de antocianos y otras sustancias al mosto (75)) o al momento de la adición de fruta, siendo el intercambio de antocianos mayor cuando esta se añade durante la fermentación, debido a la producción de etanol y al descenso del pH (108,109). Las cervezas 7.VA.F y LM.F tienen una concentración de antocianos mucho menor, debido a que la

concentración añadida fue mucho menor y a que los pH más elevados de estas cervezas pudieron afectar a la estabilidad de los antocianos y favorecer su degradación. En las cervezas sin aditivo, no se detectaron antocianos por encima del límite de detección del método.

Los principales antocianos detectados en las cervezas con fruta fueron (1) delfinidin-3-6''-acetilglucósido, (2) cianidin-3-(6''-acetilglucósido), (3) petunidina-3-(6''-acetilglucósido), (4) malvidina-3-(6''-acetilglucósido), (5) cianidina-3-(6-p-cumarilglucósido), (6) petunidina-3-(6-p-cumarilglucósido). Los picos 7, 8 y 9 son desconocidos y no se han podido identificar, aunque se cree que el pico 7 podría ser un derivado de cianidina. Finalmente, los picos 10 y 11 se corresponden, respectivamente, con malvidin-3-glucósido-4-vinilcatecol y malvidin-3-(6''-acetilglucósido-vinil-epicatequina).

La malvidina, la delfinidina, la cianidina y la petunidina son los principales antocianos encontrados en arándanos; siendo más abundantes la malvidina y la delfinidina en sus formas 3-O-glucósidos y 6''-acetilglucósidos (110,111). Sin embargo, la composición de antocianos en arándanos es muy dependiente de la variedad de la fruta, y, en este caso de la matriz alimentaria que los rodea, ya que los parámetros fisicoquímicos determinan el grado de extracción de unas u otras antocianinas.

Los antocianos principales encontrados en las cervezas con extracto de antocianos de uva fueron (1) cianidina-3-glucósido, (2) petunidina-3-glucósido, (3) malvidina-3-glucósido y (4) malvidina-3-arabinósido. De nuevo la malvidina y la petunidina son los antocianos más abundantes en uvas rojas (56), por lo que es de esperar que sean los picos con mayor señal en las figuras 15c y 15f. Se ha encontrado cianidina en uvas rojas, aunque en una cantidad significativamente menor (112). De nuevo, la composición de antocianos de las frutas depende estrechamente de la variedad y de las prácticas de cultivo (113).

4.7. Perfil de compuestos volátiles

Los compuestos analizados junto con sus tiempos de retención, descriptores aromáticos y umbrales de percepción se recogen en la tabla 8. Los resultados obtenidos del análisis del perfil de volátiles de las muestras de cerveza se recogen en la tabla 9.

Tabla 8. Características y descriptores aromáticos de los volátiles analizados en las muestras de cerveza.

Compuesto	T _R (min)	Umbral de percepción (mg/L)	Aroma
Alcoholes			
Metanol	3,788	0,5-3,0 (114)	Alcohol, solvente orgánico
1-propanol	8,044	3,0-16,0 (114,115)	Alcohol
2-butanol	9,108	16,0 (116)	Alcohol medicinal
Isobutanol	9,970	100 (116)	Alcohol, solvente orgánico
1-butanol	10,700	450 (116)	Alcohol medicinal
3-metil-1-butanol	12,700	30,0-70,0(114,115)	Alcohol, vino, plátano
2-metil-1-butanol	12,780	8,0-30,0 (116)	Alcohol, vino, plátano
2,3-butanodiol	14,700	50,0-150,0 (116)	Dulce
hexanol	15,580	4,0 (115)	Herbáceo
Alcohol-2-feniletílico	20,620	8,0-35,0 (31)	Rosal
Ésteres			
Acetato de etilo	8,870	30 (117)	Fruta
Acetato de isobutilo	13,050	1,6 (31)	Plátano, fruta
Butirato de etilo	13,590	0,4 (117)	Fruta, papaya
Lactato de etilo	14,470	154 (117)	Frutal
Acetato de isoamilo	15,270	0,5 (31)	Plátano, pera, frutal
Acetato-2-feniletilo	22,350	0,05-2,0 (31)	Rosas, miel, manzana
Compuestos carbonílicos			
Acetaldehído	3,550	2,0-20,0 (114)	Manzana, hojas verdes
Diacetilo	8,613	0,01-0,4 (114)	Mantequilla, lácteo
Acetoína	12,600	1,0-10,0 (114,115)	Fruta, madera

4.7.1. Alcoholes

La concentración de metanol de las cervezas (6,44-67,90 mg/L) supera considerablemente el umbral de percepción en todas ellas (0,5-3,0 mg/L). Las concentraciones de metanol alcanzadas en otros estudios fueron de aproximadamente 20,00 mg/L tanto para *S. cerevisiae* como para *L. thermotolerans* (118), lo cual no difiere mucho de los resultados obtenidos para las cervezas sin fruta. Sin embargo, la adición de fruta genera un efecto significativo en la producción de metanol, independientemente de la especie de levadura empleada en la fermentación. El metanol, de manera general, se produce durante la fermentación en determinadas bebidas (principalmente elaboradas con fruta), como consecuencia de la degradación de pectinas. Debido a que la cerveza no se elabora con materias primas ricas en pectinas, no presentan niveles elevados de metanol, a diferencia, por

ejemplo, del vino, en cuyo caso la legislación establece un límite de 150 mg/L en vinos blancos y 300 mg/L en tintos; o de destilados de caña de azúcar (119,120). La adición de fruta supone un aumento en la cantidad de pectinas en el mosto, que son degradadas por la actividad pectinasa de las levaduras, y por tanto genera un aumento significativo en la concentración de metanol.

El 1-propanol aporta aromas a alcohol y disolvente, y se encuentra también en todas las muestras ligeramente por encima del umbral de percepción (3,0-16,0 mg/L), en concentraciones muy similares a las obtenidas por Peces-Pérez et al. (2022) (118) y algo superiores a las obtenidas por Kobayashi et al. (2008) (121). De nuevo, la adición de fruta provoca el aumento de la concentración de 1-propanol en el perfil volátil de las cervezas, llegando a concentraciones de 28,51 y 36,36 mg/L en el caso de las cervezas 7.VA.F y LM.F. El 1-propanol se produce como metabolito secundario del metabolismo de las levaduras, empleando la treonina como precursor (121). A pesar de no ser un alimento alto en proteínas, la adición de arándanos puede aumentar la treonina disponible en el medio, aumentando ligeramente la producción de 1-propanol.

El 2-butanol y el 1-butanol se cuantificaron en concentraciones muy inferiores a su umbral de percepción, por lo que su presencia en el producto no afecta al perfil sensorial de las cervezas finales. En general, aportan aromas asociados a alcohol y a disolventes orgánicos, y a concentraciones elevadas afectan negativamente al sabor y calidad de la cerveza. En otros estudios similares, estos compuestos o bien no se detectaron en la cerveza final (118) o se detectaron en concentraciones traza similares a las presentes en este estudio (32). De la misma manera, la concentración de isobutanol no superó el umbral de detección, y además no se detectó en las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae*, pero sí en las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia*, aunque en otros estudios la concentración de este compuesto no cambia al usar una u otra levadura, alcanzando generalmente valores entre 10-20 mg/L (89,102,118).

La concentración de 3-metil-1-butanol no superó el umbral de percepción para dicho compuesto (30,0-70,0 mg/L) en ninguna muestra. Por el contrario, sí lo hizo la concentración de 2-metil-1-butanol, aportando a la cerveza notas a vino y plátano. Los resultados obtenidos muestran concentraciones de 2-metil-1-butanol de casi el doble que en otros estudios (32,92,118,122), pero dentro del umbral recogido (46-71 mg/L) por Kobayashi et al. (2008).

De nuevo, la concentración de 2-metil-1-butanol aumenta en las cervezas con fruta. Este compuesto se genera a partir de piruvato derivado de la glucólisis, por lo que al añadir arándanos y aumentar la concentración de glucosa en el medio, la producción de 2-metil-1-butanol se ve estimulada (121).

Tanto el 2,3-butanodiol como el hexanol superaron los umbrales de percepción en todas las muestras (150,0 mg/L y 4,0 mg/L, respectivamente). La concentración de 2,3-butanodiol osciló entre 150-180 mg/L para las distintas cervezas, correspondiéndose con los resultados obtenidos en otros estudios (32,118). En este caso, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos, ni se confirma el efecto del aditivo o de la levadura sobre la concentración final de 2,3-butanodiol. Sin embargo, tanto Zdaniewicz et al. (2020) como Peces-Pérez et al. (2022) (118,123) en sus respectivos trabajos sí apreciaron diferencias significativas entre *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans*, que es capaz de generar mayores concentraciones de este compuesto. Esto último ocurre también en el caso del hexanol, aunque en este estudio no presenta diferencias significativas.

Finalmente, el alcohol 2-feniletílico solo se encuentra por encima de su umbral de percepción en la muestra L.31.F, aunque la concentración se supera por muy poco. No se detectó este compuesto en ninguna de las cervezas elaboradas con *Saccharomyces*, aunque este fenómeno no se observa en el resto de estudios, donde la concentración de alcohol-2-feniletílico en cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans* fueron similares y tomaron valores entre 10-30 mg/L (32,118).

4.7.2. Ésteres

El acetato de etilo, responsable de aportar aromas a fruta, no se encuentra por encima del umbral de percepción en ninguna de las muestras, a excepción de 7.VA.F, que lo supera, y de L.31.F, que casi lo alcanza. Se observa un aumento significativo al añadir frutas, pero no en función del tipo de levadura. Actualmente, en la bibliografía se observan casos en los que el uso de *L. thermotolerans* aumenta la producción de acetato de etilo, y casos en los que no (92,118).

Tanto el acetato de isobutilo como el butirato de etilo superan el umbral de percepción en todas las cervezas, aportando aromas a plátano y frutas tropicales. No se observa para ninguno de los dos compuestos efectos significativos en la adición de frutas o en el tipo de levadura empleada. Las concentraciones obtenidas superan por mucho las recogidas por la

bibliografía (31,124). El lactato de etilo no supera en ninguno de los casos el umbral de percepción.

El acetato de isoamilo supera el umbral de percepción en todas las muestras, con valores ligeramente superiores a los descritos en la literatura, que suelen encontrarse sobre los 2-3 mg/L (31,32,118). En el caso del acetato 2-feniletilo, la concentración fue mayor del umbral de percepción en todas las muestras, pero en este caso los valores fueron inferiores que los obtenidos por Peces-Pérez *et al.* (118).

4.7.3. Compuestos carbonílicos

La concentración de acetaldehído superó el umbral de percepción (20 mg/L) en todos los casos excepto en las cervezas 7.VA y LM.A. El acetaldehído es un producto de la fermentación alcohólica, que aporta notas a manzana y hojas verdes, y suele estar presente en la cerveza en concentraciones bajas. Es un intermediario de la fermentación, precursor directo del etanol, y por tanto funciona como un indicador de la fermentación (118). A altas concentraciones, puede considerarse un defecto en función del tipo de cerveza. Las concentraciones obtenidas en este ensayo para las muestras 7.VA.F, 7.VA.A, LM.F y LM, son muy superiores a los valores recogidos en varias fuentes de la bibliografía (2,0-20,0 mg/L), pero los valores obtenidos para las cervezas 7.VA y LM.A entran dentro del rango establecido (32,118,125). Concentraciones tan altas de acetaldehído en esas cervezas pueden ser un indicativo de una fermentación incompleta.

En ninguna de las muestras se detectó diacetilo o acetoína por encima del límite de detección del método (0,1 mg/L). Estos compuestos son precursores en la ruta del 2,3-butandiol, y a altas concentraciones aportan notas mantecosas y a madera respectivamente (118). Cuando estos compuestos se encuentran en concentraciones altas, se considera un defecto. Para evitar la aparición de olores y sabores indeseados, las cervezas se dejan madurar, proporcionando el tiempo necesario para que disminuya la concentración de estos compuestos y aumente la de 2,3-butandiol (121,126), mejorando el perfil sensorial de las cervezas. Por lo tanto, bajas concentraciones de diacetilo y acetoína en la cerveza se relacionan con una correcta maduración de la cerveza (27).

Tabla 9. Concentración de volátiles (mg/L) en las muestras de cerveza.

Compuesto	7.VA	7.VA.F	7.VA.A	LM	LM.F	LM.A
Alcoholes						
Metanol	11,80 ± 0,08 ^a	67,90 ± 18,98 ^c	19,69 ± 4,94 ^a	30,27 ± 13,31 ^b	62,53 ± 2,36 ^{b,c}	6,44 ± 2,67 ^a
1-propanol	20,61 ± 1,11 ^{a,c}	28,51 ± 1,76 ^b	21,88 ± 1,33 ^c	15,50 ± 1,31 ^a	36,36 ± 1,30 ^d	22,08 ± 2,15 ^c
2-butanol	3,41 ± 1,04 ^{a,b}	6,07 ± 0,91 ^{a,b}	6,61 ± 0,50 ^b	5,87 ± 1,17 ^{a,b}	6,06 ± 0,64 ^{a,b}	2,97 ± 0,80 ^a
Isobutanol	n,d,	n,d,	n,d,	24,68 ± 0,98 ^{a,b}	29,35 ± 4,40 ^c	20,94 ± 2,25 ^{b,c}
1-butanol	8,57 ± 1,53 ^a	9,92 ± 2,20 ^a	7,65 ± 0,53 ^a	7,74 ± 0,72 ^a	8,23 ± 3,51 ^a	5,57 ± 0,32 ^a
3-metil-1-butanol	5,49 ± 1,01 ^{a,b}	4,06 ± 0,26 ^a	4,84 ± 0,34 ^a	3,97 ± 0,12 ^a	7,33 ± 0,98 ^b	4,61 ± 0,29 ^a
2-metil-butanol	45,36 ± 2,99 ^{a,b}	79,85 ± 1,78 ^b	45,09 ± 3,09 ^a	58,71 ± 3,20 ^{a,c}	60,17 ± 3,29 ^c	46,89 ± 7,20 ^{a,c}
2,3-butanodiol	167,40 ± 9,84 ^a	176,13 ± 9,92 ^a	151,66 ± 1,78 ^a	176,37 ± 9,23 ^a	179,22 ± 6,05 ^a	158,14 ± 6,07 ^a
Hexanol	4,30 ± 0,21 ^a	5,30 ± 0,62 ^a	4,34 ± 0,28 ^a	4,31 ± 0,25 ^a	10,80 ± 5,32 ^a	4,26 ± 0,26 ^a
Alcohol-2-fenílico	n,d,	n,d,	n,d,	26,75 ± 11,18 ^a	36,81 ± 11,07 ^a	32,07 ± 1,91 ^a
Ésteres						
Acetato de etilo	19,84 ± 2,39 ^a	37,74 ± 1,93 ^b	22,36 ± 2,54 ^a	24,68 ± 0,98 ^a	29,35 ± 4,40 ^{a,b}	20,94 ± 2,25 ^a
Acetato de isobutilo	27,96 ± 4,36 ^a	32,39 ± 3,70 ^a	22,41 ± 2,16 ^a	19,50 ± 1,40 ^a	30,44 ± 5,52 ^a	25,60 ± 1,74 ^a
Butirato de etilo	7,88 ± 0,65 ^{a,b}	11,40 ± 1,91 ^a	9,31 ± 1,03 ^b	7,59 ± 1,07 ^{a,b}	6,64 ± 0,86 ^b	5,39 ± 0,18 ^{a,b}
Lactato de etilo	17,45 ± 3,64 ^a	15,37 ± 3,84 ^a	26,65 ± 2,52 ^{a,b}	34,01 ± 1,92 ^{a,b}	49,76 ± 14,59 ^b	9,83 ± 1,29 ^a
Acetato de isoamilo	5,60 ± 0,61 ^{a,b}	4,40 ± 2,03 ^a	8,91 ± 0,34 ^{b,c}	12,19 ± 1,55 ^c	9,88 ± 0,87 ^{b,c}	5,63 ± 0,19 ^{a,b}
Acetato-2-feniletilo	5,57 ± 0,24 ^a	5,66 ± 0,22 ^a	5,74 ± 0,41 ^a	5,94 ± 0,23 ^a	7,15 ± 0,87 ^a	7,41 ± 1,01 ^a
Compuestos carbonílicos						
Acetaldehído	11,09 ± 2,93 ^a	28,70 ± 2,56 ^{a,b}	34,63 ± 9,19 ^{a,b}	51,69 ± 9,09 ^b	43,85 ± 7,83 ^b	11,86 ± 2,71 ^a
Diacetilo	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,
Acetoína	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,	n,d,

*Los datos representan el valor promedio ± desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes (P<0,05).

4.8. Resultados del análisis sensorial

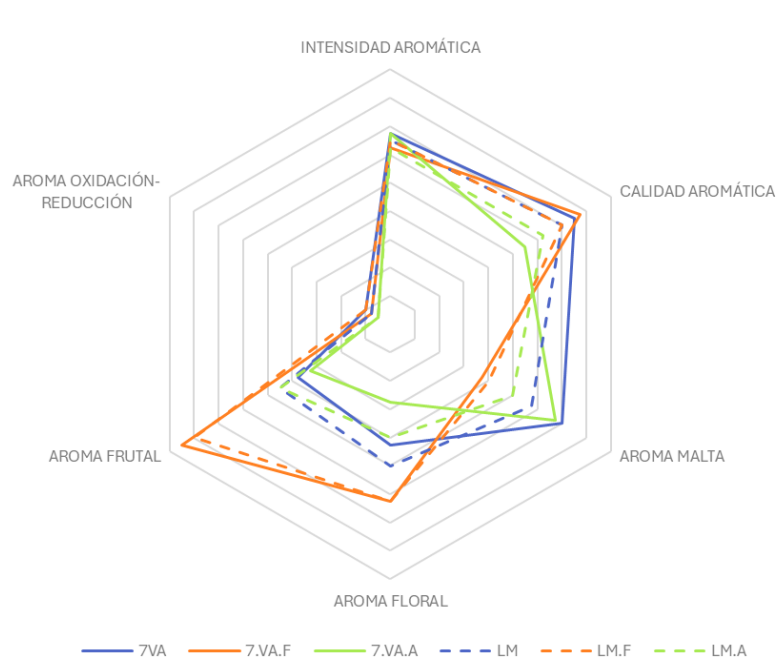
Para comparar los resultados del análisis sensorial se han elaborado gráficos de radar, representando los valores medios de cada atributo en cada cerveza, dividiendo las figuras por tipo de atributo (visual, olfativo y gustativo). Los resultados numéricos se recogen en la tabla 10, los resultados gráficos se plasman en la figura 16.

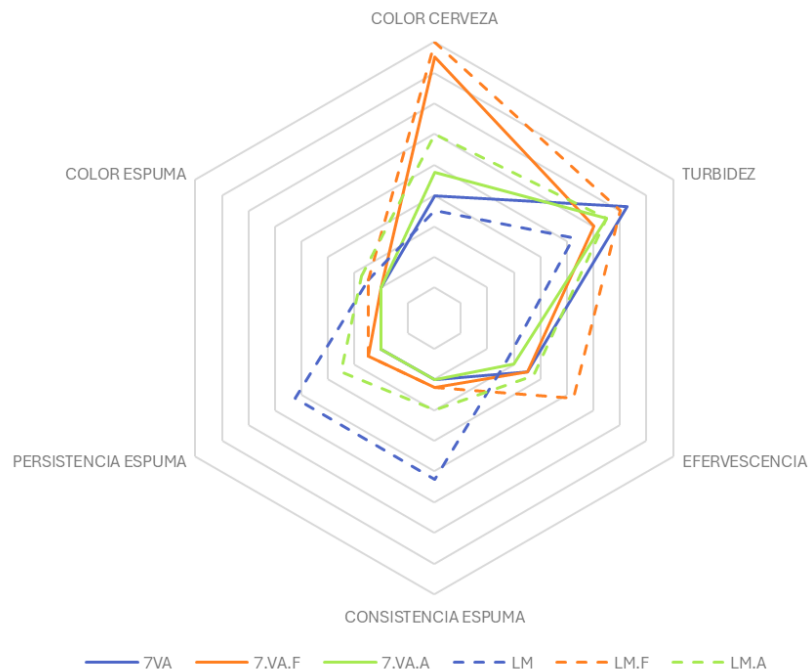
Tabla 10. Resultados del análisis sensorial de las muestras de cerveza.

Compuesto	7.VA	7.VA.F	7.VA.A	LM	LM.F	LM.A
Atributos globales						
Percepción global	3,38 ± 0,31 ^a	3,25 ± 0,23 ^{a,b}	2,38 ± 0,35 ^b	3,00 ± 0,40 ^{a,b}	3,25 ± 0,34 ^{a,b}	3,25 ± 0,23 ^{a,b}
Retrogusto	2,50 ± 0,31 ^{a,b}	2,38 ± 0,17 ^{a,b}	2,00 ± 0,25 ^b	2,00 ± 0,25 ^{a,b}	2,88 ± 0,28 ^a	2,38 ± 0,30 ^b
Atributos visuales						

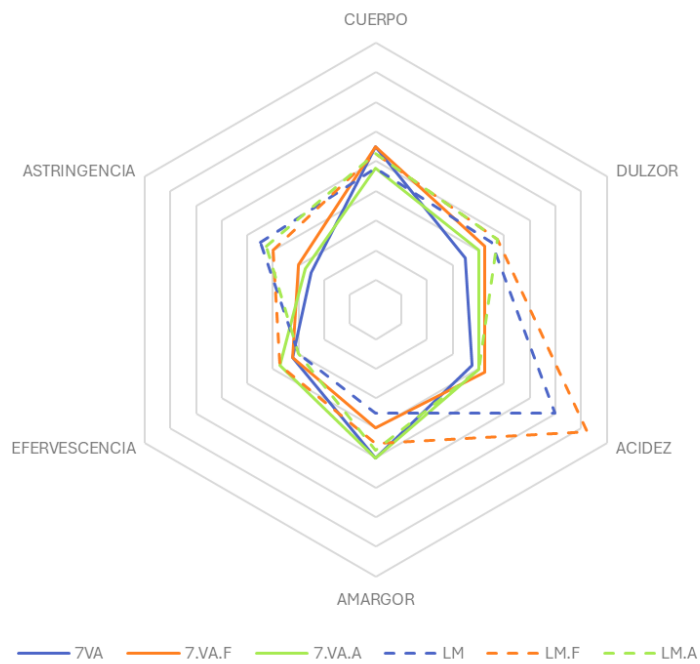
Color cerveza	2,00 ± 0,18 ^{a,b}	4,25 ± 0,29 ^c	2,38 ± 0,17 ^b	1,75 ± 0,15 ^a	4,50 ± 0,18 ^c	3,00 ± 0,00 ^d
Turbidez	3,62 ± 0,25 ^a	3,00 ± 0,47 ^a	3,25 ± 0,52 ^a	2,63 ± 0,39 ^a	3,50 ± 0,47 ^a	3,25 ± 0,39 ^a
Efervescencia	1,75 ± 0,23 ^{a,b}	1,75 ± 0,23 ^{a,b}	1,5 ± 0,25 ^a	1,38 ± 0,17 ^a	2,63 ± 0,50 ^b	1,88 ± 0,33 ^{a,b}
Cons. espuma	1,00 ± 0,00 ^a	1,23 ± 0,12 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	2,63 ± 0,53 ^b	1,13 ± 0,12 ^a	1,5 ± 0,31 ^a
Pers. espuma	1,00 ± 0,00 ^a	1,25 ± 0,15 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	2,63 ± 0,53 ^b	1,25 ± 0,15 ^a	1,75 ± 0,29 ^a
Color espuma	1,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,00 ^a	1,25 ± 0,23 ^a	1,25 ± 0,23 ^a	1,38 ± 0,25 ^a
Atributos olfativos						
Int. aromática	3,38 ± 0,35 ^a	3,13 ± 0,41 ^a	3,38 ± 0,35 ^a	3,25 ± 0,29 ^a	3,25 ± 0,39 ^a	3,13 ± 0,45 ^a
Cal. aromática	3,75 ± 0,23 ^a	3,88 ± 0,37 ^a	2,75 ± 0,23 ^b	3,50 ± 0,31 ^{a,b}	3,50 ± 0,25 ^a	3,13 ± 0,37 ^{a,b}
Aroma malta	3,50 ± 0,35 ^a	1,88 ± 0,28 ^b	3,38 ± 0,35 ^{a,c}	2,88 ± 0,21 ^{a,c,d}	2,00 ± 0,18 ^{b,d}	2,50 ± 0,40 ^{b,c,d}
Aroma floral	2,13 ± 0,45 ^{a,b}	3,13 ± 0,48 ^b	1,38 ± 0,17 ^a	2,50 ± 0,40 ^{a,b}	3,13 ± 0,33 ^b	2,00 ± 0,35 ^{a,b}
Aroma frutal	1,88 ± 0,37 ^a	4,25 ± 0,15 ^b	1,63 ± 0,25 ^a	2,25 ± 0,34 ^a	4,00 ± 0,18 ^b	2,25 ± 0,23 ^a
Aroma red-ox	0,50 ± 0,31 ^a	0,38 ± 0,25 ^a	0,25 ± 0,23 ^a	0,38 ± 0,25 ^a	0,50 ± 0,25 ^a	0,25 ± 0,23 ^a
Atributos gustativos						
Cuerpo	2,75 ± 0,29 ^a	2,75 ± 0,39 ^a	2,38 ± 0,35 ^a	2,38 ± 0,35 ^a	2,63 ± 0,25 ^a	2,63 ± 0,39 ^a
Dulzor	1,75 ± 0,24 ^a	2,13 ± 0,12 ^a	2,00 ± 0,00 ^a	2,25 ± 0,42 ^a	2,38 ± 0,25 ^a	2,38 ± 0,35 ^a
Acidez	1,88 ± 0,22 ^a	2,13 ± 0,37 ^a	2,00 ± 0,18 ^a	3,50 ± 0,35 ^a	4,13 ± 0,22 ^b	2,00 ± 0,31 ^a
Amargor	2,50 ± 0,25 ^a	2,00 ± 0,25 ^a	2,50 ± 0,31 ^a	1,75 ± 0,24 ^a	2,25 ± 0,39 ^a	2,38 ± 0,30 ^a
Astringencia	1,63 ± 0,30 ^a	1,63 ± 0,25 ^a	1,88 ± 0,33 ^a	1,50 ± 0,25 ^a	1,88 ± 0,37 ^a	1,50 ± 0,18 ^a
Efervescencia	1,25 ± 0,15 ^a	1,50 ± 0,18 ^{a,b}	1,38 ± 0,25 ^{a,b}	2,25 ± 0,42 ^b	2,00 ± 0,35 ^{a,b}	2,13 ± 0,37 ^{a,b}

*Los datos representan el valor promedio ± desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada columna son significativamente diferentes (P<0,05).





B



C

Figura 16. Resultados del análisis sensorial de las cervezas finales. A: atributos sensoriales visuales; B: atributos sensoriales olfativos, C: atributos sensoriales gustativos.

Las cervezas con frutas (7.VA.F y LM.F) tuvieron valores de “color de la cerveza” entre 4 y 5, presentando visualmente un color rojo oscuro, similar al de las cerezas. Las

cervezas con antocianos presentan valores intermedios, entre 2 y 3, que se corresponden con colores ámbar-cobrizos y por tanto se percibieron ligeramente más oscuras que las levaduras sin aditivos, que obtuvieron valores de entre 1 y 2 en la escala de intensidad, y se corresponden con un tono dorado. El color perceptible de las cervezas se ve principalmente influenciado por el tipo de aditivo adicionado, correlacionándose estos resultados con el análisis analítico del color (tabla 6), donde el orden de valores en la escala EBC se corresponden exactamente con los valores obtenidos mediante análisis visual. Analizando la turbidez y la efervescencia no se observaron diferencias significativas entre las muestras, presentando todas ellas una turbidez media (entre 2,5 y 3,5) debido a la presencia de partículas de fruta y levaduras en suspensión; y una efervescencia más bien baja. Ninguna de las muestras presentó espuma excepto la muestra LM (*Lachancea-Metschnikowia* sin aditivos), que mostró una espuma poco persistente y de color blanco. La ausencia de espuma y la baja efervescencia en las cervezas puede deberse a una fermentación secundaria poco efectiva.

Todas las cervezas se percibieron con una intensidad similar, con valores medios (de 3,1 a 3,3 sobre 5). La calidad aromática percibida fue mayor en el caso de las cervezas fermentadas con *Saccharomyces* con fruta y *Saccharomyces* sin aditivos, probablemente porque el perfil aromático es más similar a las cervezas que se consumen de manera convencional. Las cervezas con menor calidad aromática fueron las cervezas con antocianos, aunque las diferencias entre las muestras no son significativas. Las cervezas fermentadas con *Saccharomyces* se perciben con una intensidad media-alta de aroma a malta, diferenciándose claramente de las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia*, que presentan aromas más florales, y de las cervezas elaboradas con frutas, que se perciben con una intensidad aromática floral y frutal muy alta (superior a 4). En otros estudios similares, las cervezas elaboradas con *Lachancea thermotolerans* también se percibieron con una mayor intensidad de aromas florales y frutales debido a la producción de ésteres asociados a estos aromas (102). En ninguna de las cervezas se percibieron aromas que indicasen la oxidación ni la reducción de la cerveza.

A nivel gustativo, todas las cervezas se percibieron con valores medio-bajos de cuerpo (alrededor de 2-3), lo que quiere decir que son cervezas secas con pocas dextrinas. En general, en todas ellas la efervescencia fue baja (al igual que se percibió de manera visual) y con

valores de amargor similares, siendo las menos amargas LM y 7.VA.F. A pesar de que las cervezas con frutas presentan una concentración inferior de α -isoácidos, esta diferencia no se percibe a nivel sensorial de manera significativa, aunque en la bibliografía existente la percepción de amargor en boca fue inferior en el caso de las cervezas elaboradas con *L. thermotolerans* con respecto a las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae*, ya que la acidez enmascara el amargor de la cerveza (102,123). Las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* fueron ligeramente más astringentes que las cervezas elaboradas con *Saccharomyces*, pero la diferencia no fue significativa. A nivel gustativo, el carácter diferencial viene de la acidez, siendo las cervezas elaboradas con fruta y con *Lachancea-Metschnikowia* significativamente más ácidas que las cervezas con otros aditivos y elaboradas con *Saccharomyces*. Estos resultados se corresponden con los resultados analíticos, y la percepción en boca de mayor intensidad en la acidez puede deberse tanto a la producción de ácido láctico por parte de *L. thermotolerans* como a la acidez de la propia fruta. Esta diferencia es la que permite obtener cervezas *sour* sustituyendo la acidificación bacteriana por acidificación por levaduras, y se observa repetidamente en otros análisis sensoriales recogidos en bibliografía disponible (44,89,123).

La percepción global de las cervezas tuvo valores medio-altos, de aproximadamente 3 sobre 5. Todas las muestras presentan valores de percepción similares entre sí, siendo la peor percibida *Saccharomyces* con antocianos (7.VA.A – 2,88 sobre 5) y la mejor percibida *Saccharomyces* sin aditivos (7.VA – 3,38), aunque de nuevo las diferencias entre las muestras no parecen significativas.

4.9. Correlación entre perfil de compuestos volátiles y perfil sensorial

Para plasmar de forma gráfica la relación entre el perfil de volátiles se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) de los resultados obtenidos mediante GC-FID y de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial. Las figuras 17 y 18 muestran el ACP de volátiles y el ACP para la evaluación sensorial.

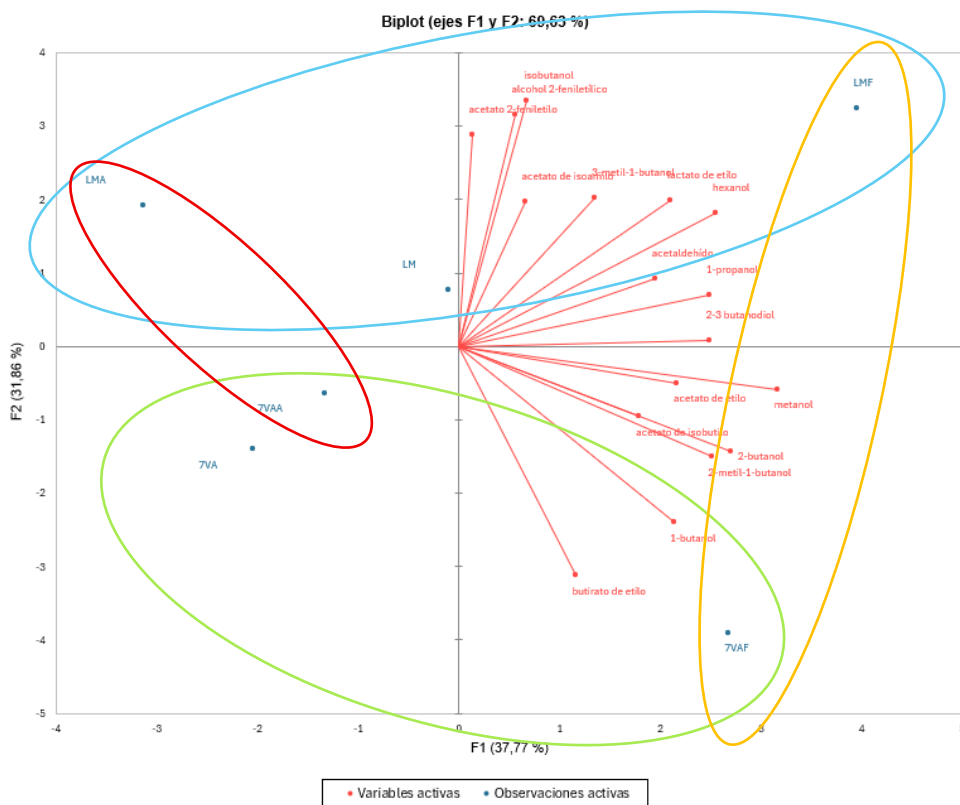


Figura 17. Análisis de componentes principales (ACP) del perfil de volátiles analizado mediante GC-FID.

Las dos componentes principales del ACP para volátiles por GC-FID (figura 17) representan el 69,39% de la variabilidad de los datos. Las cervezas se dividen claramente en cuatro grupos, marcados sobre la figura con distintos colores.

Las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* se agrupan en la parte superior (la zona indicada está delimitada en color azul sobre la figura 17), en valores positivos del eje F2; y sobre todo las cervezas LM y LM.F se asocian a una mayor producción de acetato-2-feniletílico, alcohol-2-feniletílico, acetato de isoamilo e isobutanol. Estos compuestos aportan aroma a fruta, plátano, rosas y manzanas, por lo que estas cervezas deberían estar asociadas a aromas frutales y florales.

Por otro lado, las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* se agrupan en la parte inferior de la gráfica (delimitada en verde), hacia valores negativos del eje F2. Estas cervezas están asociadas a la producción de compuestos como el butirato de etilo y el 1- butanol, sobre todo las cervezas 7.VA.F.

El tercer grupo que se puede apreciar en la figura está delimitado en amarillo y son las cervezas elaboradas con fruta, que se colocan en la parte derecha de la gráfica, alrededor

de los valores más altos del eje F1. Estas cervezas presentan mayor producción de metanol, 2-butanol y 2-metil-1-butanol. 7.VA.F está estrechamente asociada a la producción de 1-butanol (que se encuentra por debajo del umbral de percepción) y butirato de etilo, por lo que estas cervezas se percibirán con olores afrutados y tropicales. Respecto a LM.F, presenta mayor producción de lactato de etilo (aunque por debajo del umbral de percepción), hexanol, alcohol-2-feniletílico y acetato de 2-feniletilo, por lo que se percibirán como cervezas con aroma a rosas, florales, a miel y a fruta.

Finalmente, se han agrupado las cervezas con extracto de antocianos (en la figura 17 en color rojo). Estas cervezas se sitúan en la parte negativa del eje F1, y se caracterizan por una producción en general baja de compuestos aromáticos y por un perfil de volátiles poco definido, sin aromas predominantes.

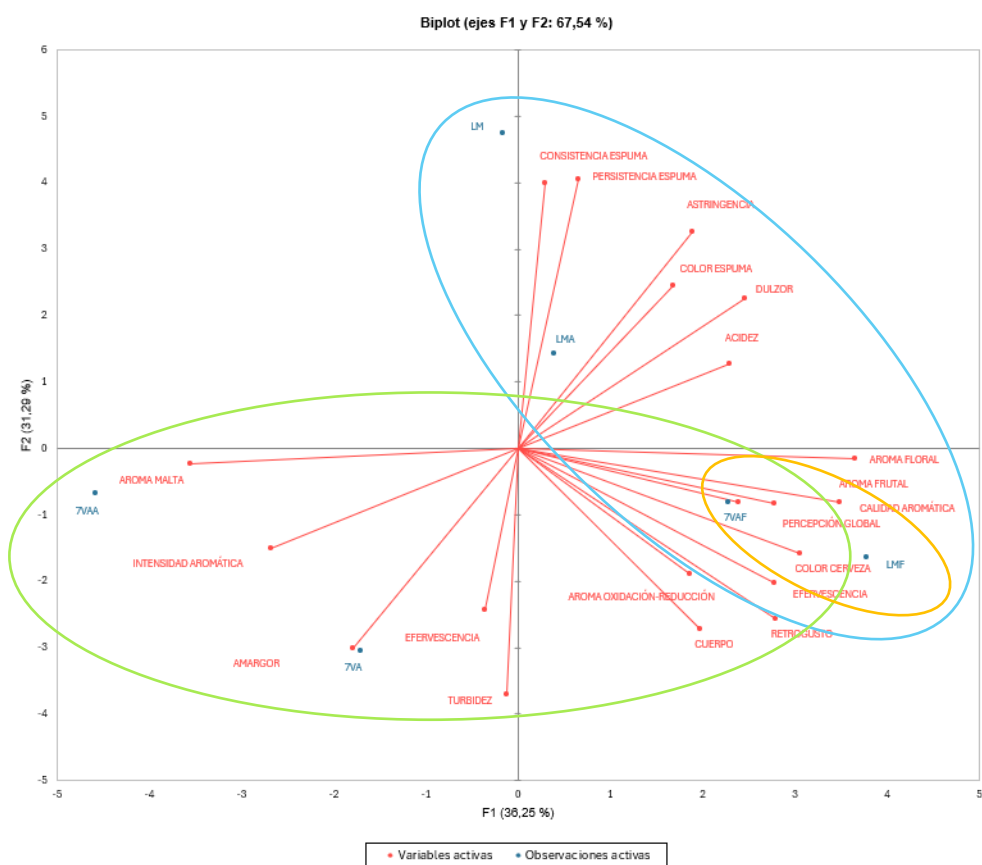


Figura 18. Análisis de componentes principales (ACP) de los resultados de la evaluación sensorial.

El ACP para la evaluación sensorial (figura 18) cubrió el 67,54% de la variabilidad de los datos. En este caso, las cervezas se agruparon diferenciándose en 3 grupos.

Las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* se agrupan en la diagonal superior derecha del diagrama, marcadas en azul. En conjunto, se asocian a una mayor acidez, astringencia y dulzor. Estas cervezas resultaron ser menos turbias, amargas y con menor efervescencia que el resto. Entre ellas, LM se relacionó con valores elevados de consistencia y persistencia de la espuma, diferenciándose claramente del resto de cervezas del grupo. Por otro lado, LM.F se caracterizó por tener un color más oscuro, mayor calidad aromática y un retrogusto más intenso que las otras dos cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia*, debido a la adición de fruta.

Las cervezas fermentadas con *S. cerevisiae* se agrupan en la parte inferior del diagrama, en valores negativos del eje F2. En general, estas cervezas fueron más turbias, y más amargas y efervescentes. Entre todas ellas, la cerveza más amarga fue la muestra 7.VA, lo que se corresponde con los resultados analíticos (tabla 6), mientras que 7.VA.A fue la cerveza percibida con mayor intensidad aromática a malta y menor a frutas y flores, tal y como ocurría en el ACP del GC-FID.

Las cervezas elaboradas con frutas se agrupan en color amarillo en la figura 18. Estas cervezas se caracterizan por tener los valores más altos de calidad aromática, aromas frutal y floral, el color más oscuro y los valores más altos de percepción global, por lo que fueron las que más gustaron al conjunto de panelistas. La cerveza con *Lachancea-Metschnikowia* (LM.F) tuvo valoraciones ligeramente más altas que la cerveza con *S. cerevisiae*, por lo que la percepción global fue mayor en las cervezas de *Lachancea* con frutas que en el resto de las muestras.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de la selección de levaduras y de la incorporación de dos aditivos diferentes (arándanos y extracto de antocianos) sobre la microbiología de la fermentación y las características fisicoquímicas y sensoriales de las cervezas finales. A lo largo de la investigación, se analizaron variables como el pH, amargor, color, producción de volátiles, perfil de antocianos, capacidad antioxidante y evaluación sensorial de las distintas muestras en estudio.

En general, las cervezas elaboradas con *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima* fueron más ácidas que las elaboradas con *S. cerevisiae*, debido a la producción de ácido láctico. No se observa un efecto significativo de *M. pulcherrima* en las cervezas finales, probablemente debido a un descenso importante de la población a partir del día 5 de fermentación, ya que *L. thermotolerans* es mejor biocompetidor en mosto de cerveza. Las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* fueron en general más ácidas, más amargas y menos dulces que las elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae*. A pesar de que no hubo diferencias en la graduación alcohólica final, *Lachancea-Metschnikowia* presentó un poder fermentativo muy inferior a *S. cerevisiae*, tardando el doble de tiempo en fermentar el mosto y siendo necesaria una re-inoculación en mitad del proceso. Con respecto al perfil aromático, las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* se asociaron a una mayor producción de acetato-2-feniletílico, alcohol-2-feniletílico, acetato de isoamilo e isobutanol, por lo que presentaron un perfil aromático más frutal y floral, con ligeras notas a miel y manzana. Las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* se asociaron a la producción de compuestos como el butirato de etilo y el 1- butanol, y se percibieron con mayor intensidad a malta, a excepción de las cervezas con frutas.

El parámetro que más influyó el perfil final de las cervezas fue el tipo de aditivo, ya que las cervezas con frutas fueron significativamente menos amargas, y menos dulces que el resto de las cervezas. Las cervezas con antocianos resultaron ligeramente más oscuras que las cervezas sin aditivos, pero mucho más claras que las cervezas con arándanos, que adquirieron un color rojo cereza. La presencia de arándanos o antocianos no influyó en la graduación alcohólica de la cerveza, pero aumentó de manera significativa el índice de polifenoles totales, la concentración y perfil de antocianos, y la capacidad antioxidante de las cervezas, siendo mayor en ambos casos en las cervezas con frutas.

La evaluación sensorial destacó a las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* y con frutas como las mejor percibidas, seguidas de las *S. cerevisiae* con frutas. Las cervezas elaboradas con fueron, en general, percibidas como más turbias y amargas, mientras que las cervezas elaboradas con *Lachancea-Metschnikowia* se percibieron como más dulces, más ácidas, y con mayor consistencia y persistencia de espuma. Las cervezas frutales se percibieron más oscuras, con más cuerpo, con mayor calidad aromática, y con aromas frutales y florales. Al contrario, las cervezas de antocianos se percibieron como las de menor calidad y mayor intensidad aromática, destacando por sus notas a malta.

Las perspectivas futuras en el estudio de *Lachancea thermotolerans* y *Metschnikowia pulcherrima* en la elaboración de cervezas artesanas apuntan al desarrollo de productos con perfiles sensoriales únicos, baja acidez volátil y mayor estabilidad microbiológica. Estas levaduras no convencionales presentan un gran potencial para diversificar estilos cerveceros mediante fermentaciones más complejas. Debido a su menor capacidad fermentativa, un posible campo de estudio podría ser la co-inoculación de estas levaduras con *Saccharomyces cerevisiae*, para elaborar cervezas con perfiles sensoriales especiales manteniendo una alta eficiencia en el proceso fermentativo y reduciendo costes del proceso de elaboración. Asimismo, el estudio del uso de antocianos y frutas como aditivos naturales ofrece alternativas atractivas para mejorar el color, aroma y propiedades antioxidantes de la cerveza. En este contexto, el estudio de aditivos naturales alternativos para el diseño de cervezas como alimentos funcionales es una amplia materia de investigación para consolidar estrategias sostenibles y creativas en la producción cervecera artesanal.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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. (Boletín Oficial del Estado, número 304, de 17 de diciembre de 2016)
2. Hough JS. The biotechnology of malting and brewing. 1st ed. Cambridge: Press Syndicate of the University of Cambridge; 1985.
3. Dysvik A, La Rosa SL, De Rouck G, Rukke EO, Westereng B, Wicklund T. Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(14):e00566-20. doi: 10.1128/AEM.00566-20
4. Strong G, England K. Beer Judge Certification Program Style Guide [Internet]. Minnesota: BJCP; 2022 [citado 1 de junio de 2025]. Disponible en: www.bjcp.org
5. Klimczak K, Cioch-Skoneczny M, Ciosek A, Poreda A. Application of non-*Saccharomyces* yeast for the production of low-alcohol beer. *Foods.* 2024;13(20): 3214. doi: 10.3390/foods13203214
6. Raihofer L, Zarnow M, Gastl M, Hutzler M. A short history of beer brewing. *EMBO Rep.* 2022;23(12): e56355. doi: 10.15252/embr.202256355
7. Damerow P. Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient Mesopotamia. [Internet] Oxford: Cuneiform Digital Library Initiative; 2012 [citado el 4 de mayo de 2024] Disponible en: <https://cdli.earth/articles/cdlj/2012-2>
8. Farag MA, Elmassry MM, Baba M, Friedman R. Revealing the constituents of Egypt's oldest beer using infrared and mass spectrometry. *Sci Rep.* 2019;9(1):16199. doi: 10.1038/s41598-019-52877-0
9. De Roos J, Van der Veken D, De Vuyst L. The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(1): e02226-18.
10. De Roos J, Vandamme P, De Vuyst L. Wort Substrate Consumption and metabolite production during lambic beer fermentation and maturation explain the successive growth of specific bacterial and yeast species. *Front Microbiol.* 2018;9:2763. doi: 10.3389/fmicb.2018.02763
11. Martens H, Dawoud E, Verachtert H. Wort enterobacteria and other microbial populations involved during the first month of lambic fermentation. *JIB.* 1991;97(6):435–9.
12. Van Oevelen D, Spaepen M, Timmermans P, Verachtert H. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze, *JIB.* 1977;83(6):356–60.
13. Tolosa JJM, Prieto SM. Non-*Saccharomyces* yeasts: an enzymatic unexplored world to be exploited. En: Tolosa JJM, Prieto SM, editors, *Enzymes in Food Biotechnology.* 1st ed. Elsevier; 2019. p.433–50. doi: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00025-6
14. Palmer JJ. How to brew. Everything you need to know to brew great beer every time. 4th ed. Colorado: Brewers Publications; 2017.

15. Anderson K. The emergence of lower-alcohol beverages: the case of beer. *Journal of Wine Economics*. 2023;18(1):66–86. doi:10.1017/jwe.2023.8
16. Burini JA, Eizaguirre JI, Loviso C, Libkind D. Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Rev Argent Microbiol*. 2021;53(4):359–77. doi: 10.1016/j.ram.2021.01.003
17. Rehberg AJ, Luther GE. Fermentation. En: Hardwick WA, editor. *Handbook of brewing*. 2nd ed. Nueva York: Marcel Dekker Inc.; 1995. p.487-525.
18. De Schepper CF, Courtin CM. Reassessing the importance of barley starch and amylolytic enzyme properties in malting and brewing. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2024;23(6). doi: 10.1111/1541-4337.70069
19. MacGregor AW, Bazin SL, Macri LJ, Babb JC. Modelling the Contribution of α -amylase, β -amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. *J Cereal Sci*. 1999;29(2):161–9. doi: 10.1006/jcers.1998.0233
20. Sammartino, M. Enzymes in Brewing. *MBAA TQ*. 2015;52(3):156-64. doi: 10.1094/TQ-52-3-0818-01
21. Enevoldsen BS, Bathgate GN. Structural analysis of wort dextrans by means of β -amylase and the debranching enzyme, pullulanase. *JIB*. 1969;75(5):433–43. doi: 10.1002/jib.332
22. Pires E, Brányik T. Springer briefs in biochemistry and molecular biology. *Biochemistry of Beer Fermentation*. 1st ed. Braga: Springer International Publishing; 2015.
23. Bhonsale S, Mores W, Van Impe J. Dynamic optimisation of beer fermentation under parametric uncertainty. *Fermentation*. 2021;7(4):285. doi: 10.3390/fermentation7040285
24. Rodman AD, Gerogiorgis DI. Multi-objective process optimisation of beer fermentation via dynamic simulation. *Food Bioprod. Process*. 2016;100:255–74. doi: 10.1016/j.fbp.2016.04.002
25. Meußdoerffer F, Zarnkow M. *Das Bier: eine Geschichte von Hopfen und Malz*. 1st Munich: C.H. Beck; 2014.
26. Gallone B, Mertens S, Gordon JL, Maere S, Verstrepen KJ, Steensels J. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;49:148–55. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.005
27. Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*; the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(7):1018–36. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x
28. Steensels J, Verstrepen KJ. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68(1):61–80. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-113025
29. Porter TJ, Divol B, Setati ME. *Lachancea* yeast species: origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Res Int*. 2019;119:378–89. doi: 10.1016/j.foodres.2019.02.003
30. Domizio P, House JF, Joseph CML, Bisson LF, Bamforth CW. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *JIB*. 2016;122(4):599–604. doi: 10.1002/jib.362
31. Pirrone A, Naselli V, Gugino IM, Porrello A, Viola E, Craparo V, et al. Use of *non*-conventional yeasts for enhancing the sensory quality of craft beer. *Food Res Int*. 2025;208: 116164. doi: 10.1016/j.foodres.2025.116164

32. Callejo MJ, García Navas JJ, Alba R, Escott C, Loira I, González MC, Morata, A. Wort fermentation and beer conditioning with selected non-*Saccharomyces* yeasts in craft beers. *Eur. Food Res. Technol.* 2019;245(6):1229–38. doi: 10.1007/s00217-019-03244-w
33. Tsaruk A, Filip K, Sibirny A, Ruchala J. Native and recombinant yeast producers of lactic acid: characteristics and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2025;26(5):2007. doi: 10.3390/ijms26052007
34. Malina C, Yu R, Björkeröth J, Kerkhoven EJ, Nielsen J. Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(51): e2112836118. doi: 10.1073/pnas.2112836118
35. Vicente J, Navascués E, Calderón F, Santos A, Marquina D, Benito S. An integrative view of the role of *Lachancea thermotolerans* in wine technology. *Foods.* 2021;10(11):2878. doi: 10.3390/foods10112878
36. Vilela A. *Lachancea thermotolerans*, the non-*Saccharomyces* yeast that reduces the volatile acidity of wines. *Fermentation.* 2018;4(3):56. doi: 10.3390/fermentation4030056
37. Galaz V, Franco W. *Lachancea quebecensis* a novel isolate for the production of craft beer. *Foods.* 2023;12(18):3347. doi: 10.3390/foods12183347
38. Franco W, Benavides S, Valencia P, Ramírez C, Urtubia A. Native yeasts and lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of seven grape cultivars from the Maule region (Chile). *Foods.* 2021;10(8):1737. doi: 10.3390/foods10081737
39. Benito Á, Calderón F, Palomero F, Benito S. Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules.* 2015;20(6):9510–23. doi: 10.3390/molecules20069510
40. Benito S. The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(16):6775–90.
41. Benito S. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 2015;241(5):707–17. doi: 10.1007/s00253-018-9117-z
42. Morata A, Loira I, Escott C, del Fresno JM, Bañuelos MA, Suárez-Lepe JA. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation.* 2019;5(3):63. doi: 10.3390/fermentation5030063.
43. Loira I, Morata A, Bañuelos MA, Suárez-Lepe JA. Isolation, selection, and identification techniques for non-*Saccharomyces* yeasts of oenological interest. In: *Biotechnological Progress and Beverage Consumption.* Elsevier; 2020. p. 467–508.
44. Postigo V, Sanz P, García M, Arroyo T. Impact of non-*Saccharomyces* wine yeast strains on improving healthy characteristics and the sensory profile of beer in sequential fermentation. *Foods.* 2022;11(14):2029. doi: 10.3390/foods11142029
45. Prior KJ, Bauer FF, Divol B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 2019;79:75–84. doi: 10.1016/j.fm.2018.12.002

46. Contreras A, Curtin C, Varela C. Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(4):1885–95. doi: 10.1007/s00253-014-6193-6
47. Morata A, Loira I, Escott C, del Fresno JM, Bañuelos MA, Suárez-Lepe JA. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation*. 2019;5(3):63. doi: 10.3390/fermentation5030063
48. Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*. 2011;28(5):873–82. doi: 10.1016/j.fm.2010.12.001
49. Combina M, Elía A, Mercado L, Catania C, Ganga A, Martinez C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol*. 2005;99(3):237–43. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017
50. Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S, Steyer D, Gallardo-Chacón JJ, Ballester J, Vichi S, Guérin-Schenider R, Caixach J, Alexandre H. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol*. 2012;32(2):243–53. doi: 10.1016/j.fm.2012.06.006
51. Oro L, Ciani M, Comitini F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol*. 2014;116(5):1209–17. doi: 10.1111/jam.12446
52. Zott K, Thibon C, Bely M, Lonvaud-Funel A, Dubourdieu D, Masneuf-Pomarede I. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *Int J Food Microbiol*. 2011;151(2):210–5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026
53. Sharma RJ, Gupta RC, Singh S, Bansal AK, Singh IP. Stability of anthocyanins and anthocyanidins enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* (‘jamun’). *Food Chem*. 2016;190:808–17. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.029
54. Chaves López C, Peralta-Ruiz Y, David C, Tovar G, Paparella A. Anthocyanins. Antioxidant properties sources and health benefits. Nueva York: Nova Science Publishers, Inc; 2020.
55. Wolfe KL, Liu RH. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J Agric Food Chem*. 2008;56(18):8404–11. doi: 10.1021/jf8013074
56. Morata A, López C, Tesfaye W, González C, Escott C. Anthocyanins as natural pigments in beverages. In: Value-added ingredients and enrichments of beverages: Volume 14: The Science of Beverages. Elsevier; 2019. p. 383–428. doi: 10.1016/B978-0-12-816687-1.00012-6
57. Giuseppe M, Miniati E. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. 1st ed. Nueva York: Taylor & Francis; 1993.
58. Aguilera-Otíz M, Reza-Vargas M del C, Chew-Madinaveita RG, Meza-Velázquez JA. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biocencia*. 2011;13(2):16. doi: 10.18633/bt.v13i2.81
59. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, P C Bickford. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry,

- spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.* 1999;19(18):8114–21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-18-08114.1999
60. Shukitt-Hale B, Galli RL, Meterko V, Carey A, Bielinski DF, McGhie T, Joseph JA. Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. *Age (Dordr).* 2005;27(1):49–57. doi: 10.1007/s11357-005-4004-9
 61. Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin XH, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S. Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(1):275. doi: 10.1167/iovs.04-0715
 62. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013;763:1–10. doi: 10.1016/j.aca.2012.11.051
 63. Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem.* 2000;35:1-62. doi: 10.1016/s0065-2423(01)35014-x.
 64. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118. doi: 10.4103/0973-7847.70902
 65. Luna-Vital D, Cortez R, Ongkowijoyo P, Gonzalez de Mejia E. Protection of color and chemical degradation of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) by zinc ions and alginate through chemical interaction in a beverage model. *Food Res Int.* 2018;105:169–77. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.009
 66. Karakaya S, Simsek S, Eker AT, Pineda-Vadillo C, Dupont D, Perez B, Viadel B, Sanz-Buenhombre M, Guadarrama A, Kertész Z, Hegyi A, Bordoni A, Nehir S. Stability and bioaccessibility of anthocyanins in bakery products enriched with anthocyanins. *Food Funct.* 2016;7(8):3488–96. doi: 10.1039/c6fo00567e
 67. Bridle P, Timberlake CF. Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chem.* 1997;58(1–2):103–9. doi: 10.1016/S0308-8146(96)00222-1
 68. Shu Y, Wang Y, Ni J, Gui Q, Gong Y, Zhou B, Zhang Y. Effects of adding *Rubus* fruits on the antioxidant properties, physicochemical indexes and aroma of craft beer. [Internet] *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering.* 2025 [citado el 5 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.sciopen.com/article/10.11975/j.issn.1002-6819.202410208>
 69. Samilyk M, Illiashenko Y, Rudichenko Y, Yevtushenko Y, Huba S, Tkachuk S, Ryzhkova T, Heida I, Lysenko H, Severin R. Determination of the antioxidant potential of processing products of osmotically dehydrated chokeberry fruits and beer enriched with them. *East.-Eur. J. Enterp. Technol.* 2024;2:11(128):26–33. doi: 10.15587/1729-4061.2024.301159
 70. Pérez-Alva A, Ramírez-Rodrigues MA, Martínez-Jiménez LA, García-Torres R, Ramírez-Rodrigues MM. Physicochemical and micronutrient characterization of commercial red fruit beers. *Food and Humanity.* 2023;1:271–80. doi: 10.1016/j.foohum.2023.06.004
 71. Luz BRT, da Silva CN, Hercos G de F de L, Ribeiro BD, Egea MB, Lemes AC. Innovative craft beers added with purple grape pomace: exploring technological, sensory, and bioactive characteristics. *Beverages.* 2024;10(3):80. doi: 10.1016/j.foohum.2023.06.004

72. Croonenberghs AP, Bongaerts D, Bouchez A, De Roos J, De Vuyst L. Fruit beers, beers with or without a co-fermentation step with fruits. *Curr Opin Biotechnol.* 2024;86:103081. doi: 10.1016/j.copbio.2024.103081
73. Ambra R, Pastore G, Lucchetti S. The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health. *Molecules.* 2021;26(2):486. doi: 10.3390/molecules26020486
74. Nardini M, Garaguso I. Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chem.* 2020;305:125437. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125437
75. Zapata PJ, Martínez-Esplá A, Gironés-Vilaplana A, Santos-Lax D, Noguera-Artiaga L, Carbonell-Barrachina ÁA. Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. *LWT.* 2019;103:139–46. doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.002
76. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9–10):1231–7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
77. Drosou F, Mamma D, Tataridis P, Dourtoglou V, Oreopoulou V. *Metschnikowia pulcherrima* in mono or co-fermentations in brewing. *BrSc.* 2022;75:69–78. doi: 10.23763/BrSc22-09drosou
78. Toh DWK, Chua JY, Lu Y, Liu SQ. Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *Int J Food Sci Technol.* 2020;55(5):2049–59. doi: 10.1111/ijfs.14399
79. Nikulin J, Vidgren V, Krogerus K, Magalhães F, Valkeemäki S, Kangas-Heiska T, Gibson B. Brewing potential of the wild yeast species *Saccharomyces paradoxus*. *Eur. Food Res. Technol.* 2020;246(11):2283–97. doi: 10.1007/s00217-020-03572-2
80. Carbonetto B, Ramsayer J, Nidelet T, Legrand J, Sicard D. Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast.* 2018;35(11):591–603. doi: 10.1002/yea.3350
81. Klein CJL, Olsson L, Nielsen J. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. *Microbiology.* 1998;144(1):13–24. doi: 10.1099/00221287-144-1-13
82. Vaquero C, Loira I, Heras JM, Carrau F, González C, Morata A. Biocompatibility in ternary fermentations with *Lachancea thermotolerans*, other non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to control pH and improve the sensory profile of wines from warm areas. *Front Microbiol.* 2021;12:656262. doi: 10.3389/fmicb.2021.656262
83. Langenaeken NA, De Schepper CF, De Schutter DP, Courtin CM. Different gelatinization characteristics of small and large barley starch granules impact their enzymatic hydrolysis and sugar production during mashing. *Food Chem.* 2019;295:138–46. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.045
84. Bamforth C. Barley and malt starch in brewing: a general review. *MBAA TQ.* 2003;40(2):89–97.
85. Hoff S, Damgaard J, Petersen MA, Jespersen BM, Andersen ML, Lund MN. Influence of barley varieties on wort quality and performance. *J Agric Food Chem.* 2013;61(8):1968–76. doi: 10.1021/jf304932v

86. Nally MC, Ponsone ML, Pesce VM, Toro ME, Vazquez F, Chulze S. Evaluation of behaviour of *Lachancea thermotolerans* biocontrol agents on grape fermentations. *Lett Appl Microbiol.* 2018;67(1):89–96. doi: 10.1111/lam.13001
87. Casalone E, Colella CM, Daly S, Gallori E, Moriani L, Polsinelli M. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 1992;22(6):435–40. doi: 10.1007/BF00326407
88. García-Ríos E, Guillamón JM. Sulfur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: beyond SSU1. *Microb Cell.* 2019;6(12):527–30. doi: 10.15698/mic2019.12.699
89. Postigo V, Esteban S, Arroyo T. *Lachancea thermotolerans*, an innovative alternative for sour beer production. *Beverages.* 2023;9(1). doi: 10.3390/beverages9010020
90. Brito Júnior MR de, Ugalde FZ, Gonzaga LV, Schulz M, Fett R, Costa ACO, Tribuzi G. Physicochemical characteristics and antioxidant potential of a fruit beer produced with Juçara (*Euterpe edulis Martius*) fruit pulp. *Braz. Arch. Biol. and Technol.* 2023;66. doi:10.1590/1678-4324-2023220324
91. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Material vegetal: arándano. [Internet] España: Ministerio de agricultura, pesca y educación. [citado 5 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=1173#:~:text=Necesita%20suelos%20muy%20%C3%A1cidos%2C%20de,%2C3%2D4%2C8>.
92. Zdaniewicz M, Satora P, Pater A, Bogacz S. Low lactic acid-producing strain of *Lachancea thermotolerans* as a new starter for beer production. *Biomolecules.* 2020;10(2):256. doi: 10.3390/biom10020256
93. Horincar G, Enachi E, Bolea C, Râpeanu G, Aprodu I. Value-added lager beer enriched with eggplant (*Solanum melongena L.*) peel extract. *Molecules.* 2020;25(3):731. doi: 10.3390/molecules25030731
94. Rodríguez I. Escala EBC (European Brewers Convention). Madrid: Momentos cervecedores; 2024. [citado el 7 de junio de 2025]. Disponible en: <https://momentoscervecedores.es/escala-ebc-european-brewers-convention>
95. Baigts-Allende DK, Pérez-Alva A, Ramírez-Rodrigues MA, Palacios A, Ramírez-Rodrigues MM. A comparative study of polyphenolic and amino acid profiles of commercial fruit beers. *J. Food Compos. Anal.* 2021;100(4):103921. doi: 10.1016/j.jfca.2021.103921
96. Belcar J, Kapusta I, Sekutowski TR, Gorzelany J. Impact of the addition of fruits of kamchatka berries (*L. caerulea var. kamtschatica*) and haskap (*L. caerulea var. emphyllocalyx*) on the physicochemical properties, polyphenolic content, antioxidant activity and sensory evaluation craft wheat beers. *Molecules.* 2023;28(10):4011. doi: 10.3390/molecules28104011
97. Rinaldi BJD, Montanher PF, Johann G. Brewing of craft beer enriched with freeze-dried cape gooseberry: a promising source of antioxidants. *Braz. J. Food Technol.* 2022;25. doi: 10.1590/1981-6723.01922
98. Kawa-Rygielska J, Adamenko K, Kucharska AZ, Prorok P, Piórecki N. Physicochemical and antioxidative properties of Cornelian cherry beer. *Food Chem.* 2019;281:147–53. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.093
99. Bamforth CW. Beer: health and nutrition. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2004.
100. Laws DRJ, McGuinness JD, Rennie H. The losses of bitter substances during fermentation. *JIB.* 1972;78(4):314–21. doi: 10.1002/j.2050-0416.1972.tb03454.x

101. Popescu V, Soceanu A, Dobrinas S, Stanciu G. A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process. *JIB*. 2013;119(3):111-5. doi: 10.1002/jib.82
102. Postigo V, Sánchez A, Cabellos JM, Arroyo T. New approaches for the fermentation of beer: non-*Saccharomyces* yeasts from wine. *Fermentation*. 2022;8(6):280. doi: 10.3390/fermentation8060280
103. Rodríguez Madrera R, Pando Bedriñana R, Suárez Valles B. Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* cider yeasts for use in brewing. *Eur. Food Res. and Technol.* 2021;247(4):819–28. doi: 10.1007/s00217-020-03665-y
104. Quifer-Rada P, Vallverdú-Queralt A, Martínez-Huélamo M, Chiva-Blanch G, Jáuregui O, Estruch R, Lamuela-Raventós R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* 2015;169:336–43. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.154
105. Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 2012;4(7):759–81. doi: 10.3390/nu4070759
106. Martínez-Gomez A, Caballero I, Blanco CA. Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. *Biomolecules*. 2020;10(3):400. doi: 10.3390/biom10030400
107. Ducruet J, Rébénague P, Diserens S, Kosińska-Cagnazzo A, Héritier I, Andlauer W. Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. *Food Chem.* 2017;226:109–18. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.047
108. Machado JC, Carvalho CD, Faria MA, Melo A, Martins ZE, Cancela M, et al. Impact of elderberry enrichment on beers: Effects of addition stage, pasteurization, filtration, production scale, and ageing on anthocyanin content, bioactivity, and sensory properties. *J. Food Compos. Anal.* 2025;145:107845. doi: 10.1016/j.jfca.2025.107845
109. Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Anthocyanins and betalains. Natural colorants for food and nutraceutical uses. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.
110. Wang E, Yin Y, Xu C, Liu J. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. *J Chromatogr A*. 2014;1327:39–48. doi: 10.1016/j.chroma.2013.12.070
111. Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT*. 2015 Jan;60(1):509–17. doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.033
112. de Rosas I, Ponce MT, Malovini E, Deis L, Cavagnaro B, Cavagnaro P. Loss of anthocyanins and modification of the anthocyanin profiles in grape berries of Malbec and Bonarda grown under high temperature conditions. *Plant Sci.* 2017;258:137–45. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.01.015
113. He F, Liang NN, Mu L, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ. Anthocyanins and Their Variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*. 2012;17(2):1571–601. doi: 10.3390/molecules17021571
114. Hughes PS, Baxter ED. Beer: quality, safety and nutritional aspects. Cambridge: RSC Paperbacks; 2001.

115. Meilgaard MC. Flavor chemistry of beer: part II: flavour and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA TQ*. 1975;12(3):151–68.
116. Kassemeyer HH, Berkelmann-Löhnertz B. Fungi of grapes. En: König H, Uden G, Fröhlich J, editors. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 61–87. doi: 10.1007/978-3-540-85463-0
117. Maarse H. *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. 1st ed. Nueva York: Routledge; 2017. doi: 10.1201/9780203734285
118. Peces-Pérez R, Vaquero C, Callejo MJ, Morata A. Biomodulation of physicochemical parameters, aromas, and sensory profile of craft beers by using non-*Saccharomyces* yeasts. *ACS Omega*. 2022;7(21):17822–40. doi: 10.1021/acsomega.2c01035
119. Liang M, Liang Y, Wu X, Zhou S, Jiang J. Mutation breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with lower methanol content and the effects of pectinase, cellulase and glycine in sugar cane spirits. *J Sci Food Agric*. 2015;95(9):1949–55. doi: 10.1002/jsfa.6908
120. Ohimain EI. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *Springerplus*. 2016;5(1):1607. doi: 10.1186/s40064-016-3303-1
121. Kobayashi M, Shimizu H, Shioya S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. *J Biosci Bioeng*. 2008;106(4):317–23. doi: 10.1263/jbb.106.317
122. Ocvirk M, MLinarič NK, Košir IJ. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *J Sci Food Agric*. 2018;98(10):3627–35. doi: 10.1002/jsfa.8840
123. Francesca N, Pirrone A, Gugino I, Prestianni R, Naselli V, Settanni L, Todaro A, Guzzon R, Maggio A, Porrello A, Bruno M, Farina V, Passafiume R, Alfonzo A, Moschetti G, Gaglio R. A novel microbiological approach to impact the aromatic composition of sour loquat beer. *Food Biosci*. 2023;55:103011. doi: 10.1016/j.fbio.2023.103011
124. Bortoleto GG, Gomes WPC, Ushimura LC, Bonanca RA, Novello EH. Evaluation of the profile of volatile organic compounds in industrial and craft beers. *J. microbiol., biotechnol. food sci*. 2022;12(2):e5532. doi: 10.55251/jmbfs.5532
125. Humia BV, Santos KS, Barbosa AM, Sawata M, Mendonça M da C, Padilha FF. Beer molecules and its sensory and biological properties: a review. *Molecules*. 2019;24(8):1568. doi: 10.3390/molecules24081568
126. Zdaniewicz M, Satora P, Kania P, Florkiewicz A. The impact of selected *Lachancea* yeast strains on the production process, chemical composition and aroma profiles of beers. *Molecules*. 2024;29(23). doi: 10.3390/molecules29235674

6. ANEXOS

6.1. Hoja de cata

Fecha: 18/06/2025						
Participante:						
Muestra:		Muestra:				
Atributos		1	2	3	4	5
Visual	Color cerveza					
	Turbidez					
	Efervescencia					
	Consistencia espuma					
	Persistencia espuma					
	Color espuma					
Olfativa	Intensidad aromática					
	Calidad aromática					
	Malta					
	Floral					
	Frutal					
	Oxidación-Reducción					
Gusto	Cuerpo					
	Dulzor					
	Acidez					
	Amargor					
	Astringencia					
	Efervescencia					
Retrogusto						
Percepción global						

Muestra:		Muestra:				
Atributos		1	2	3	4	5
Visual	Color cerveza					
	Turbidez					
	Efervescencia					
	Consistencia espuma					
	Persistencia espuma					
	Color espuma					
Olfativa	Intensidad aromática					
	Calidad aromática					
	Malta					
	Floral					
	Frutal					
	Oxidación-Reducción					
Gusto	Cuerpo					
	Dulzor					
	Acidez					
	Amargor					
	Astringencia					
	Efervescencia					
Retrogusto						
Percepción global						

COLOR → 1-DORADO; 2-AMBAR; 3-COBRIZO; 4-FRAMBUESA; 5-CEREZA

COLOR ESPUMA → 1-BLANCO; 3-AMBAR; 5-MARRÓN

CONSISTENCIA ESPUMA → 1-LIGERA; 2-POCO DENSA; 3-ESPESA; 4-CREMOSA; 5-COMPACTA

PERSISTENCIA ESPUMA → 1-SIN; 2-POCO; 3-PERSISTENTE; 4-MUY PERSISTENTE; 5-NO DESAPARECE

RETROGUSTO → 1-CORTO; 5-DURADERO

OXIDACION-REDUCCION → 1-MAS O