



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

ELABORACIÓN DE CERVEZAS CON FRUTOS ROJOS Y LEVADURAS ACIDIFICANTES TIPO LAMBIC

Rubén Bartolomé Perea

Junio 2024



UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE MADRID



Master Universitario
Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

ELABORACIÓN DE CERVEZAS CON FRUTOS ROJOS Y LEVADURAS ACIDIFICANTES TIPO LAMBIC

Autor: Rubén Bartolomé Perea

Tutor: Antonio Dionisio Morata Barrado

Cotutora: Carmen López Díaz

Junio 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora Carmen López por su orientación, consejos, supervisión y por todo el apoyo recibido durante la elaboración de este proyecto y a mi tutor Antonio Morata por sus valiosos consejos, su experiencia y la pasión que inspira.

Por otro lado, me gustaría agradecer al personal del laboratorio el buen ambiente de trabajo, toda la ayuda y facilidades que me han brindado a lo largo de estos últimos meses desarrollando la parte experimental, en especial a Marina y Cristina por su paciencia, su apoyo y por todo lo que me han enseñado.

Además, agradecer a los compañeros del máster SALINA por todo el apoyo y motivación que me han brindado estos meses.

Y por supuesto, dar las gracias a toda mi familia y amigos por confiar en mí, motivarme y ser un apoyo en el día a día.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	7
2.	ABSTRACT	8
3.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	9
3.1	Objetivos.....	10
4.	MARCO TEÓRICO	11
4.1	Cerveza: Historia y Tipos	11
4.2	Cerveza artesanal	13
4.3	Proceso de elaboración de la cerveza	13
4.4	Fermentación y levaduras	14
4.5	<i>Lachancea thermotolerans</i>	15
4.6	Uso de fruta en la cerveza.....	16
5.	METODOLOGÍA.....	18
5.1	Malta.....	18
5.2	Lúpulo.....	18
5.3	Cepas de levaduras y medios de cultivo.....	18
5.4	Elaboración del mosto cervecero.....	19
5.5	Fermentación	21
5.6	Guarda	22
5.7	Embotellado y segunda fermentación.....	23
5.8	Análisis instrumental	24
5.9	Análisis sensorial.....	28
5.10	Análisis estadístico	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1	Parámetros del mosto: densidad, pH y concentración de glucosa.....	30
6.2	Parámetros durante la fermentación	32

6.3	Parámetros de la cerveza acabada	35
6.4	Compuestos volátiles.....	37
6.5	Análisis sensorial.....	43
6.6	Correlación entre compuestos volátiles y análisis sensorial.....	48
7.	CONCLUSIONES Y PROSPECTIVA.....	52
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9.	ANEXOS.....	59
9.1	Corrección del efecto de la temperatura sobre el grado alcohólico medido por ebullición y densimetría (OIV).....	59
9.2	Hoja de cata para el análisis sensorial	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Código de los distintos fermentadores.....	21
Tabla 2. Volúmenes de reactivos para el análisis de contenido en glucosa.	25
Tabla 3. Resultados del análisis de la cerveza acabada.	37
Tabla 4. Concentración de alcoholes superiores volátiles (mg/l) en la cerveza acabada..	39
Tabla 5. Concentración de ésteres volátiles (mg/l) en la cerveza acabada.	40
Tabla 6. Concentración de compuestos carbonílicos volátiles (mg/l) de la cerveza acabada.	41
Tabla 7. Umbrales de percepción de los principales compuestos volátiles producidos durante la fermentación en matrices de cerveza.....	42
Tabla 8. Resultados del análisis sensorial para los cuatro tipos de cerveza.	47
Tabla 9. Correlaciones (Test de Pearson) entre el análisis de volátiles y el análisis sensorial.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de los principales (sub)productos de fermentación en <i>L.</i> <i>thermotolerans</i>	16
Figura 2. Proceso de embotellado e inoculación para la 2º fermentación.	24
Figura 3. Evolución de la densidad en los procesos de maceración, lavado y cocción..	30
Figura 4. Evolución del pH en los procesos de maceración, lavado y cocción.....	31
Figura 5. Evolución de la concentración de glucosa (g/l) en los procesos de maceración, lavado y cocción.	32
Figura 6. Evolución de la densidad (kg/m ³) durante la fermentación.....	33
Figura 7. Evolución del pH durante la fermentación.....	34
Figura 8. Evolución de la concentración de glucosa (g/l) durante la fermentación.	35
Figura 9. Gráfico de radar para el análisis sensorial de los parámetros visuales.	44
Figura 10. Gráfico de radar para el análisis sensorial de los parámetros olfativos.	45
Figura 11. Gráfico de radar para el análisis sensorial de los parámetros gustativos.	47
Figura 12. Análisis de componentes principales (ACP) de los compuestos volátiles en las cervezas por GC-FID.....	50
Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP) del análisis sensorial.....	51

1. RESUMEN

La demanda de cervezas artesanales y con perfiles innovadores ha crecido notablemente en los últimos años, impulsada por consumidores que buscan experiencias sensoriales únicas y productos diferenciados. En esta investigación se aborda la elaboración de cervezas artesanales utilizando dos tipos de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Lachancea thermotolerans* en combinación con frutos rojos. Se exploró el uso de la levadura *Lachancea thermotolerans*, conocida por su capacidad para producir ácidos orgánicos que aportan acidez y complejidad a la cerveza, similar a las características organolépticas de las cervezas Lambic. La metodología incluyó la elaboración del mosto cervecero, la fermentación, la guarda, el embotellado y una segunda fermentación, seguido de análisis instrumentales y sensoriales. Los resultados mostraron que la adición de frutos rojos en combinación con *Lachancea thermotolerans* influye significativamente en las propiedades fisicoquímicas al disminuir el pH y reducir el amargor y en las propiedades sensoriales de la cerveza, mejorando su perfil aromático y gustativo. Las conclusiones indican que es posible desarrollar cervezas artesanales con características similares a las Lambic utilizando métodos controlados de fermentación y la incorporación de frutas, ofreciendo así una alternativa innovadora en el mercado cervecero artesanal.

2. ABSTRACT

The demand for craft beers and beers with innovative profiles has grown significantly in recent years, driven by consumers seeking unique sensory experiences and differentiated products. This research addresses the brewing of craft beers using two types of yeast, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* in combination with red berries. The use of the yeast *Lachancea thermotolerans*, known for its ability to produce organic acids that provide acidity and complexity to the beer, similar to the organoleptic characteristics of Lambic beers, was explored. The methodology included brewing wort, fermentation, storage, bottling and secondary fermentation, followed by instrumental and sensory analyses. The results showed that the addition of red berries in combination with *Lachancea thermotolerans* significantly influences the physicochemical properties by lowering pH and reducing bitterness and the sensory properties of the beer, improving its aromatic and taste profile. The conclusions indicate that it is possible to develop craft beers with similar characteristics to Lambic beers using controlled fermentation methods and the incorporation of fruits, thus offering an innovative alternative in the craft beer market.

3. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El Real decreto 678/2016, del 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta define la cerveza como “Alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales.” (1). Por otra parte, la RAE la define como “Bebida alcohólica hecha con granos germinados de cebada u otros cereales fermentados en agua, y aromatizada con lúpulo, boj, casia, etc.”

El sector cervecero en España ha demostrado ser una parte significativa del panorama agroalimentario del país. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España se encuentra entre los principales productores de cerveza a nivel mundial, ocupando el noveno lugar y el segundo puesto en Europa solo por detrás de Alemania, produciendo un total de 41,1 millones de hectolitros anuales, según los datos de 2023.

La elaboración de cerveza artesanal ha experimentado un auge significativo en los últimos años, debido a la creciente demanda de productos únicos y de alta calidad. Este proyecto de fin de máster se centra en la elaboración de cervezas artesanales con frutos rojos y levaduras acidificantes tipo Lambic. La elección de este tema surge por la necesidad de investigar nuevas áreas en la elaboración de cerveza artesanal, combinando métodos tradicionales y modernos. Las levaduras no convencionales como *Lachancea thermotolerans* son conocidas por su capacidad de producir ácidos orgánicos que aportan acidez y complejidad a la cerveza, características comunes en las cervezas tipo Lambic. Debido a que la fermentación en este ensayo no ha sido de manera espontánea con levaduras y otros microorganismos presentes en el ambiente, no se podría definir la cerveza elaborada como tipo Lambic, pero sí se han utilizado levaduras que producen características organolépticas similares a este estilo de cerveza, como es el caso de *Lachancea thermotolerans* la cual se encuentra de manera natural en la flora autóctona de la uva.

Además, la adición de frutos rojos contribuye en la formación de sabores y aromas frutales en la cerveza, característica también común en las cervezas tipo Lambic. Por otro lado, la adición de este tipo de bayas no solo enriquece el perfil aromático y gustativo de la cerveza, sino que también mejora su perfil nutricional introduciendo compuestos beneficiosos para la salud como los antioxidantes.

3.1 Objetivos

El principal desafío de este estudio es comprender cómo diferentes cepas de levadura y la adición de frutos rojos afectan a las características fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza. Para ello se llevarán a cabo análisis de los diferentes parámetros de la cerveza, de los volátiles y se evaluará el impacto de estos ingredientes en la percepción sensorial mediante una cata.

Objetivo general del proyecto: evaluar la influencia de *Lachancea thermotolerans* y *Saccharomyces cerevisiae* y la adición de frutos rojos en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la cerveza artesanal.

Los objetivos parciales son los siguientes:

- Comparar la influencia de *Lachancea thermotolerans* y de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación de la cerveza.
- Comparar la influencia de la adición de frutos rojos en la fermentación de la cerveza.
- Contrastar el efecto de la levadura utilizada en las propiedades fisicoquímicas de la cerveza.
- Contrastar el efecto de la adición de fruta en las propiedades fisicoquímicas de la cerveza.
- Determinar la influencia de la levadura utilizada en el perfil sensorial de la cerveza.
- Determinar la influencia de la adición de frutos rojos en el perfil sensorial de la cerveza.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Cerveza: Historia y Tipos

A lo largo de la historia, la cerveza siempre ha sido una parte importante de la vida humana: era y sigue siendo un valioso alimento básico que ha sido constantemente mejorado y adaptado a las necesidades humanas (2). Existen manuscritos que afirman que ya se elaboraba cerveza 4.000 años a.C. por parte de la cultura Sumeria en la antigua Mesopotamia (3). También se ha demostrado que los antiguos egipcios utilizaban trigo malteado y cebada como ingredientes en la elaboración de cerveza en torno al 3500 a.C. produciéndola incluso a gran escala (4).

Al principio de su historia, la cerveza tenía una baja graduación alcohólica y era una fuente importante de vitaminas, como la vitamina B o la riboflavina, oligoelementos y otros ingredientes beneficiosos para la salud. Esto cobraba importancia especialmente en poblaciones que vivían principalmente de pan o gachas; o marineros que vivían de alimentos pobres en vitaminas durante largos periodos de tiempo, para quienes, la cerveza, era un buen complemento en su dieta, aportando micronutrientes y siendo beneficioso para su salud (2).

Durante la edad media y el principio de la era moderna, pasó de producirse cerveza a pequeña escala en los hogares a producirse a media-gran escala en los monasterios y las grandes casas de campo. A finales del siglo XVII, más de la mitad de la cerveza producida era de elaboración doméstica, pero a partir del siglo XIX, debido al crecimiento demográfico de las ciudades y a las mejoras en tecnología e investigación científica comenzó la producción de cerveza a gran escala (5).

Con el tiempo, las técnicas de elaboración basadas en el uso de agua, cereales, levadura y lúpulo se han ido perfeccionando y extendiendo por todo el mundo. Hoy en día, la cerveza es la bebida alcohólica más consumida en el mundo, en una cantidad muy superior a la del vino, aunque con diferencias significativas entre países (6).

La cerveza, legislada actualmente en España por El Real decreto 678/2016, del 16 de diciembre se puede clasificar de muchas maneras, según el cereal utilizado, según el estilo o la región, según el color, según el contenido alcohólico etc. Para este estudio es importante diferenciar los tipos de cerveza existentes según la levadura utilizada para la fermentación.

4.1.1 Cervezas tipo Ale

Son cervezas elaboradas con levaduras de fermentación alta como *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras actúan en la parte superior del fermentador, formando una capa espumosa y produciendo una fermentación rápida, de entre tres y cinco días. Este tipo de fermentación da como resultado cervezas con sabores y aromas complejos.

Estas levaduras se caracterizan por tener propiedades específicas como la baja floculación o la tolerancia al etanol y requieren temperaturas que oscilan entre 15 y 25°C para una fermentación óptima (7).

4.1.2 Cervezas tipo Lager

Son cervezas elaboradas con levaduras de fermentación baja como *Saccharomyces pastorianus*. Estas levaduras se depositan en el fondo del fermentador durante el proceso de fermentación, el cual es más largo que en las cervezas tipo Ale, en torno a dos semanas. El resultado son unas cervezas conocidas por su sabor limpio, fresco y suave.

Las levaduras utilizadas para elaborar cerveza Lager fermentan a temperaturas más bajas, entre 8-12°C y se diferencian de las levaduras de fermentación alta en su capacidad de metabolizar la maltotriosa y en su alta floculación (7).

4.1.2 Cervezas tipo Lambic

También conocidas como cervezas de generación espontánea, se basan en un proceso fermentativo incontrolado, realizado por microorganismos residentes en el ambiente de las cervecerías que contaminan el mosto. El proceso de elaboración y maduración de esta cerveza puede llegar a durar varios meses (8).

Debido a la variedad de microorganismos que actúan, a su tipo de fermentación y dado que las cervezas fermentan y maduran en las mismas vasijas, se consigue un perfil de sabor y de aromas únicos. Algunos compuestos responsables del aroma característico de la Lambic, envejecida durante 1 a 2 meses, son el 2,3-butanodiol; acetato de etilo; alcoholes superiores; y los ácidos acético, láctico y succínico que son producidos por enterobacterias presentes durante este proceso (9).

4.2 Cerveza artesanal

En la actualidad, hay un gran interés en la elaboración de cerveza artesanal, que se presenta como una opción diferente a la cerveza tradicional. La cerveza artesanal se refiere a la producción de cerveza a pequeña escala, menos de 6 millones de barriles de cerveza (bbl) al año según la Brewers Association de EE. UU.; y que se enfoca en preservar las características sensoriales originales, priorizando la calidad y la diversidad (10). La diversidad de sabores y aromas en las cervezas artesanales incrementa la probabilidad de que sean percibidas como de mayor calidad en comparación con la cerveza comercial (11). Este tipo de cervezas están experimentando un gran crecimiento, y en la actualidad se reconocen hasta 150 estilos de cerveza diferentes (12).

Los cuatro ingredientes principales de la cerveza artesanal son el agua, la malta, el lúpulo y la levadura. Partiendo de estos cuatro compuestos, existen diversas formas de lograr perfiles sensoriales únicos, eligiendo cada ingrediente entre las múltiples opciones que existen de malta, lúpulo e incluso la calidad del agua. Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de los compuestos aromáticos activos de la cerveza dependen de la levadura seleccionada para la fermentación (8,13,14).

4.3 Proceso de elaboración de la cerveza

La elaboración de cerveza o “brewing” en inglés, se podría definir como la elaboración de una bebida alcohólica mediante infusión, ebullición y fermentación de cuatro componentes principales: agua, cereales malteados (principalmente cebada), lúpulo y levadura, además de adjuntos específicos de cada tipo de cerveza (5). La primera etapa de la elaboración consiste en la formación de un mosto fermentable a partir de las materias primas comentadas anteriormente mediante múltiples operaciones unitarias tales como: molienda, maceración, filtración, ebullición, agitación y enfriamiento (10). En esta primera etapa, las enzimas de la malta (α -amilasas y β -amilasas) transforman el almidón en azúcares fermentables durante la maceración, potenciando la efectividad enzimática cuando se aumenta la temperatura hasta los 67-68°C, debido a que las dos enzimas tienen temperaturas óptimas diferentes. La posterior ebullición favorece la esterilización; la extracción de compuestos amargos del lúpulo; la coagulación del exceso de proteínas y taninos para formar partículas sólidas (hot trub), que se retirarán en el remolino; y la

formación de color y sabor. A continuación, la cerveza se enfría a la temperatura de fermentación, que dependerá del tipo de levadura que se vaya a utilizar y se añade la levadura en el recipiente de fermentación. El mosto se deja fermentando durante el tiempo requerido hasta completarse la fermentación y posteriormente se extrae el exceso de levadura sedimentada. Luego la cerveza debe acondicionarse para producir un producto estable y de calidad, mediante el proceso de envejecimiento, el cual aporta clarificación, carbonatación y maduración del sabor. Después del acondicionamiento las cervezas pueden filtrarse y embotellarse. Cabe destacar que existen otros métodos de acondicionamiento, como en la cerveza artesanal, en el que se lleva a cabo en la botella final, realizando una segunda fermentación para producir el CO₂ (5).

4.4 Fermentación y levaduras

La fermentación se podría definir como un proceso exotérmico en el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol, dióxido de carbono y otros compuestos involucrados en el sabor y el aroma (15). El proceso de fermentación se ve influenciado por parámetros como la tasa de inoculación de las levaduras, el oxígeno disuelto en el mosto y la temperatura (16). Las temperaturas de fermentación van a depender del tipo de cerveza que se elabore; además, temperaturas muy altas pueden suponer la pérdida excesiva de volátiles y la formación de compuestos no deseados (17).

Desde el punto de vista biotecnológico, las levaduras productoras de alcohol son uno de los factores más importantes para producir cerveza de calidad y con características organolépticas atractivas. Estas levaduras probablemente son un producto de la civilización y domesticación humanas ya que las levaduras productoras de alcohol son una rareza entre los microorganismos (2). Según lo estudiado por Meußdoerffer y Zarnkow (2014), las levaduras evolucionaron para metabolizar mejor diversos azúcares en alcohol, lo que constituye un mecanismo de protección al convertir el exceso temporal de azúcar de las frutas maduras en un compuesto que muchos microorganismos competidores no son capaces de utilizar. La levadura de panadería y cervecería *Saccharomyces cerevisiae*, en particular, desarrolló la capacidad de utilizar el azúcar de malta, que es uno de los azúcares más raros en la naturaleza (18).

Actualmente, la gran mayoría de cervezas se fermentan con diferentes especies y cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Para el 99% de las cervezas del mundo el género

Saccharomyces es el único inóculo microbiano utilizado (19). Esta levadura se considera óptima para la producción de cerveza por aspectos como su eficiencia en la producción de etanol, el uso prioritario de la fermentación como ruta metabólica y su buena tolerancia al etanol (20).

La aparición de otras levaduras diferentes a *Saccharomyces* se reporta comúnmente en algunos estilos de cerveza peculiares producidos por fermentaciones espontáneas, como las cervezas ácidas belgas (Lambic, Gueuze y Rodenbach), y la American Coolship Ale. Además, las levaduras no-*Saccharomyces* se utilizan comúnmente en la producción de cerveza con bajo contenido de alcohol (0,5-1,2%, v/v) y cerveza sin alcohol (<0,5%, v/v) (21). Las levaduras no-*Saccharomyces* también se han utilizado en fermentaciones controladas y de forma conjunta con levaduras *Saccharomyces* para obtener productos únicos con sabores y aromas distintos (22).

4.5 Lachancea thermotolerans

Recientemente, se han realizado numerosos estudios acerca de *Lachancea thermotolerans* (anteriormente *Kluyveromyces thermotolerans*) para su uso en bebidas alcohólicas como vino y cerveza, especialmente por su capacidad para disminuir el pH mediante la producción de ácido láctico. *K. thermotolerans* fue separada de las otras especies de *Kluyveromyces* y colocada en el género *Lachancea* debido a distintas diferencias genéticas y metabólicas y debido a su similitud genética con otros miembros del género *Lachancea* (23).

Lachancea thermotolerans tiene la capacidad de transformar el azúcar del mosto en ácido L-láctico a través de la enzima lactato deshidrogenasa. El contenido de ácido láctico producido varía dependiendo de la cepa y las condiciones del medio. Esta característica provoca la disminución del pH en varias décimas aumentando la acidez total de la cerveza. La transformación de parte de los azúcares en lactato reduce el rendimiento etanol/azúcar en comparación con otras levaduras como *S. cerevisiae*, la cual consume 16-17 g de azúcar para producir 1% v/v de etanol, a diferencia de *L. thermotolerans* que debe consumir de media 21,5 g de azúcar para producir 1% v/v de etanol (24).

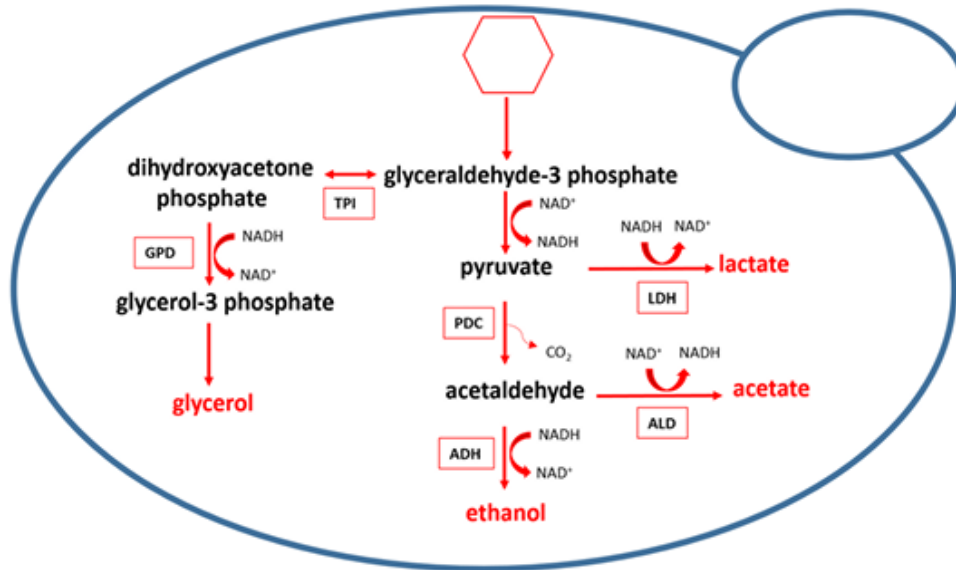


Figura 1. Producción de los principales (sub)productos de fermentación en *L. thermotolerans*

El comportamiento fermentativo de *Lachancea thermotolerans* difiere mucho dependiendo de la matriz alimentaria que fermenta, las condiciones de fermentación y la cepa seleccionada. Sin embargo, se han observado ciertas tendencias comunes como la presencia de azúcares residuales, y concentraciones de etanol más bajas debido a su tasa de fermentación más baja. Se ha observado que *L. thermotolerans* persiste hasta las fases media y final de la fermentación durante fermentaciones de cultivos mixtos con *S. cerevisiae*. La inoculación simultánea y secuencial de *L. thermotolerans* tiene como consecuencia una disminución de la velocidad de fermentación (25).

L. Thermotolerans se distingue de otros géneros de levadura por su habilidad para generar ácido láctico, lo cual podría influir en el sabor y en la textura de la cerveza (26). Distintas cepas con alta producción de ácido láctico podrían utilizarse en la elaboración de cerveza agria sin la necesidad de añadir bacterias, lo que simplificaría y aceleraría el proceso ya que la cerveza agria se lleva a cabo involucrando diferentes microorganismos como levaduras y bacterias y con un largo proceso de envejecimiento (27).

4.6 Uso de fruta en la cerveza

La utilización de frutas en la producción de cerveza ha atraído la atención de los investigadores en los últimos tiempos, ya que no solo aportan nuevos colores y sabores

al producto, sino que también puede aumentar el contenido de sustancias bioactivas y la estabilidad oxidativa (28). Las frutas han sido utilizadas durante siglos como alimento, pero su adición como materia prima en el desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria ha sido poco explorada. Actualmente se ha incrementado la demanda de productos que combinen características sensoriales agradables y beneficiosas para la salud (29). Estas tendencias han obligado a la industria alimentaria a adaptarse a estos novedosos segmentos de mercado y buscar nuevas formulaciones y productos alimentarios innovadores ligados al destino consciente y sostenible de sus residuos (30).

Según da Cunha et al. (2023), las cervezas adicionadas con diversas frutas pueden considerarse algo más que simples bebidas, ya que diferentes parámetros físicos, químicos, sensoriales y nutricionales las catalogan como alimentos funcionales al incorporar compuestos bioactivos de interés para el mantenimiento del organismo. Además, se descubrió que el momento en el que se adiciona la fruta durante el proceso es crucial y presenta resultados importantes en la cerveza acabada (30).

Según un estudio realizado por Nedyalkov et al. (2023) en el que se añadió orujo de cereza en la producción de cerveza, se obtuvo un aumento de notas frutales y de compuestos fenólicos en la cerveza. Además, se observó un aumento de la vida útil del producto al aumentar el contenido en polifenoles aportado por la adición de frutas (31).

5. METODOLOGÍA

5.1 Malta

Para la elaboración de este experimento, se adquirió directamente malta deshidratada y molturada. Se utilizó malta Château Pilsen 2RS del comerciante Castle Malting (Beloeil, Bélgica). Se trata de una malta con humedad máxima del 4,5%, extracto seco de 81,5% y con un color claro de 4,0 EBC. Está bien modificada y resulta fácil de macerar con una infusión simple, de una sola temperatura. Tiene un sabor de malta fuerte y dulce a la vez, y contiene una potencia enzimática suficiente como para ser utilizada como malta base.

Además, se empleó malta tostada Carafa Tipo 1 de la marca comercial Weyermann (Bamberg, Alemania). Es una malta de 900 EBC y aporta un sabor amargo-dulce similar al chocolate, añade agradables características quemadas y aporta un profundo color rubí negro. En este caso, la malta tostada no estaba triturada y se procedió a molturarla mediante un molino manual de discos.

5.2 Lúpulo

Para aportar amargor y aroma a la cerveza se añadió lúpulo Lemondrop en forma de pellets, el cual tiene un 7,1% de α -ácidos, molécula responsable de su amargor. Este tipo de lúpulo ofrece un carácter cítrico con aromas y sabores a limón, menta, florales o herbales.

5.3 Cepas de levaduras y medios de cultivo

Para la primera fermentación del mosto se utilizaron dos levaduras diferentes. Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*, en concreto la cepa 7VA, y *Lachancea thermotolerans*, la cepa L3.1. Las levaduras utilizadas fueron aisladas y conservadas en el Departamento de Microbiología de la ETSIAAB (UPM) en forma de cultivo en tubos.

Las levaduras se conservaron en tubos en un medio YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 2%) y Agar al 1,5% en el congelador. Posteriormente, se realizó un primer crecimiento en el mismo medio en placas Petri. A los tres días, se pasaron las levaduras a medio líquido. El medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento de ambas levaduras fue un medio YPD que contiene extracto de levadura al

1%, peptona al 2% y glucosa al 2%. El medio de cultivo preparado se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizado y enfriado, se inocularon las dos levaduras con un asa de siembra desde la placa Petri en condiciones estériles y se dejó dos días a 28°C en una estufa para favorecer el crecimiento de las levaduras.

Para la segunda fermentación en botella se utilizó una levadura seca activa de *Saccharomyces cerevisiae* QA23™ (Lallemand Iberia, Madrid, España).

5.4 Elaboración del mosto cervecero

5.4.1 Maceración

El agua utilizada para el proceso de maceración fue obtenida del grifo del departamento de Microbiología de la ETSIAAB (UPM), y fue previamente hervida y adicionada con sulfato de calcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) hasta conseguir una concentración de 90 mg/l de Ca. Partiendo de que el agua del grifo inicialmente tenía 14,5 mg/l de Ca, se debieron añadir 75,5 mg/l de Ca. Para ello se adicionaron 5,85 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para los 18 l de agua de maceración.

Tras el acondicionamiento previo, el agua se calentó en un calentador de 20 l de capacidad de la marca comercial Grainfather (Auckland, Nueva Zelanda), hasta llegar a 72°C. Una vez alcanzada la temperatura, se añadió el agua caliente al macerador y se añadieron 6 kg de malta triturada, 37,5 g de malta tostada triturada y se reguló el macerador para mantener la temperatura constante a 68°C durante el proceso.

Para la elaboración del mosto se utilizó un macerador de la marca comercial Grainfather (Auckland, Nueva Zelanda) con capacidad para 40 l, provisto con una bomba de recirculación del agua/mosto y una camisa de calor para mantener la temperatura ajustada a las condiciones deseadas. La bomba de recirculación fue activada para asegurar que toda la malta estuviera en contacto con el agua caliente.

El proceso de maceración duró 60 minutos y durante este periodo se tomaron muestras del mosto a los 0 minutos, 20 minutos, 40 minutos y 60 minutos para analizar presencia de almidón, densidad, pH y glucosa a 20°C, disminuyendo su temperatura con una bandeja con hielo cuando fue necesario.

5.4.2 Lavado

Concurrida una hora desde el inicio de la maceración se llevó a cabo el lavado del mosto. El lavado se realizó en el mismo macerador, levantando la cuba filtrante interior para que el líquido se filtrara por abajo.

Para el lavado se utilizaron 16,5 l de la misma agua utilizada para la maceración, previamente ajustada la concentración de calcio a 90 mg/l. En este caso se añadieron 5,36 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El agua de lavado se calentó en el calentador hasta los 77°C y se añadió al macerador en tres tandas, dos de 6 l y una de 4,5 l esperando hasta que escurriera toda el agua entre cada tanda.

Una vez lavado el mosto, se retiró el bagazo y se procedió a realizar un análisis de pH, densidad y glucosa al mosto resultante.

El objetivo tras el lavado fue obtener una densidad del mosto de 1050 kg/m³, si fuera mayor tendría que corregirse añadiendo agua y si fuera inferior se debería aumentar el tiempo de cocción posterior para concentrar el mosto.

5.4.3 Cocción

Una vez acabado el proceso de lavado se llevó a cabo la cocción del mosto. En este proceso se elevó la temperatura del macerador hasta los 100°C y una vez alcanzada la temperatura, el mosto se mantuvo en ebullición 75 minutos. Tras los primeros 15 minutos de cocción se añadieron 30 g de lúpulo para que éste estuviera en contacto con el mosto durante la última hora del proceso, asegurando así el aporte de amargor y evitando la pérdida de compuestos volátiles que proporcionan aroma y sabor.

Una vez finalizados los 75 minutos de cocción, se midió densidad, pH y glucosa del mosto a 20°C, disminuyendo su temperatura con hielo cuando fue necesario.

5.4.4 Whirlpool

Posterior al proceso de cocción, el mosto se removió circularmente con una paleta creando un remolino durante un minuto. Este vórtice generado favoreció el movimiento

de las partículas y los sólidos hacia el centro de la cuba ayudando a obtener un mosto más limpio. Tras el removido se dejó reposar el mosto durante 25 minutos.

5.5 Fermentación

Tras el Whirlpool, se dejó reposar el mosto hasta alcanzar una temperatura de 20°C. Una vez alcanzada la temperatura, se bombeó el mosto en 12 botellas diferentes de 2 l de capacidad, esterilizadas previamente en autoclave a 121°C 15 minutos. El bombeo se realizó a través de la propia bomba incorporada en el macerador hasta llenar un volumen de 1700 ml en cada botella.

Las botellas de 2 l se utilizaron posteriormente como fermentadores y se marcó cada una con un código correspondiente al tipo de cerveza que iba a fermentar como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Código de los distintos fermentadores.

Código	Levadura	N.º de triplicado	Fruta
L31.1	<i>Lachancea thermotolerans</i> (Cepa L3.1)	1	No
L31.2	<i>Lachancea thermotolerans</i> (Cepa L3.1)	2	No
L31.3	<i>Lachancea thermotolerans</i> (Cepa L3.1)	3	No
L31.1F	<i>Lachancea thermotolerans</i> (Cepa L3.1)	1	Sí
L31.2F	<i>Lachancea thermotolerans</i> (Cepa L3.1)	2	Sí
L31.3F	<i>Lachancea thermotolerans</i> (Cepa L3.1)	3	Sí
7VA.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa 7VA)	1	No
7VA.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa 7VA)	2	No
7VA.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa 7VA)	3	No
7VA.1F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa 7VA)	1	Sí
7VA.2F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa 7VA)	2	Sí
7VA.3F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Cepa 7VA)	3	Sí

Una vez el mosto contenido en las botellas alcanzó una temperatura de 20°C, se añadió fruta en seis de ellas (L31.1F, L31.2F, L31.3F, 7VA.1F, 7VA.2F, 7VA.3F). Se pesaron 195 g de una mezcla de frutos rojos de la marca Hacendado (Valencia, España) elaborados por Congelados de Navarra (Fustiñana, Navarra, España), la cual contiene fresas,

grosellas rojas, frambuesas, moras, grosellas negras y arándanos y se introdujeron en cada una de estas seis botellas.

A continuación, se procedió a la inoculación de las levaduras en condiciones estériles. Se añadieron, con la ayuda de una pipeta, 34 ml de levadura en cada botella, para conseguir así un contenido de levaduras del 2% del volumen total de mosto de cada botella. Seis de ellas se inocularon con *Saccharomyces cerevisiae* y las otras seis con *Lachancea thermotolerans*. A cada botella se le puso un tapón de fermentación con una válvula que contenía glicerina en su interior para permitir la salida del CO₂ de la fermentación, pero no permitir la entrada de contaminantes al producto.

Los fermentadores se llevaron a una estufa para mantenerlos a una temperatura constante de 20°C durante 8 días. A su vez, se fueron tomando datos de densidad y pH cada dos días para controlar la fermentación, la cual se dio por terminada cuando la densidad de todas las cervezas alcanzó un valor en torno a 1012 kg/m³. Además, se recogieron muestras en tubos Eppendorf de 5 ml de cada una de las cervezas cada dos días para su posterior análisis del contenido de glucosa.

Debido a que tres de las muestras no estaban fermentando correctamente (L31.1, L31.2 y L31.3) y su densidad no disminuía de 1032 kg/m³ se decidió volver a añadir levadura para completar la fermentación hasta que su densidad disminuyera a 1012 kg/m³. En este caso se añadió una levadura seca activa de *Saccharomyces cerevisiae* QA23™ (Lallemand Iberia, Madrid, España). Se añadió la proporción, indicada por el fabricante, de 0,4 g de levadura por litro de cerveza, lo que hacía un total de 1,8 g de levadura, que se hidrató previamente con 10 veces su volumen de agua a 35°C y se agitó durante 20 minutos. De los 18 g de la solución de levadura con agua se añadieron 6 g en cada botella fermentadora.

Una vez fermentadas todas las cervezas, con densidades en torno a 1012 kg/m³ se llevaron a una cámara frigorífica a 4°C y se dejaron guardando durante 7 días para favorecer la precipitación de la levadura y de los restos sólidos.

5.6 Guarda

Finalizado el proceso de fermentación, se traspasó el contenido de cada botella a otra limpia y estéril extrayendo las levaduras y los restos sólidos para reducir la turbidez. A

continuación, se llevaron las cervezas a una cámara frigorífica a 4°C durante 3 días para que volvieran a sedimentar las levaduras y los restos sólidos restantes y se repitió el proceso de trasvase un total de tres veces cada dos días.

5.7 Embotellado y segunda fermentación

Para el embotellado de la cerveza final se prepararon botellas de 330 ml de capacidad de color ámbar con boca apta para tapón de corona y se esterilizaron en autoclave a 121°C 15 minutos.

La elaboración de este tipo de cerveza artesanal requiere de una segunda fermentación en botella, la cual generará el CO₂ característico del producto y la espuma. Para esta segunda fermentación se utilizó una levadura seca activa de *Saccharomyces cerevisiae* QA23™ (Lallemand Iberia, Madrid, España). Se añadieron en cada cerveza 0,4 g/l de levadura, la cual se hidrató previamente con 10 veces su volumen de agua a 35°C y se agitó durante 20 minutos. Finalmente se añadieron 1,32 ml de la solución de levadura a cada una de las botellas de 330 ml. Una vez preparada la levadura, se preparó el azúcar necesario para la segunda fermentación, elaborando una disolución de 400 g de azúcar por litro de agua. Posteriormente se añadieron 4,125 ml de la solución de azúcar en cada una de las botellas de 330 ml de cerveza, para alcanzar una proporción de 5 g/l de azúcar en la cerveza.

El llenado de cada botella con 330 ml de cerveza se hizo a través de una bomba lobular con un filtro de papel de celulosa acoplado de grado 54 (retención de partículas de 20-25 µm). El procedimiento realizado fue: en primer lugar, adicionar 4,125 ml de la solución de agua con azúcar en cada botella; en segundo lugar, bombear 330 ml de cerveza; en tercer lugar, añadir 1,32 ml de la levadura hidratada y en cuarto lugar chapar la botella con tapones de corona mediante una chapadora manual. El procedimiento seguido se refleja en la Figura 2.



Figura 2. Proceso de embotellado e inoculación para la 2^o fermentación.

La cerveza embotellada se guardó en una cámara frigorífica a 4° durante 15 días para realizar la segunda fermentación hasta que se comenzaron las pruebas analíticas.

5.8 Análisis instrumental

5.8.1 Densidad

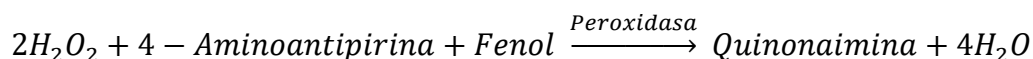
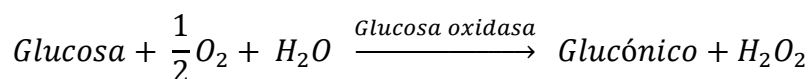
La densidad de las muestras de mosto y cerveza se analizó a 20°C en una probeta de 50 ml con densímetros con rangos de 1000 a 1050 kg/m³ y de 1050 a 1100 kg/m³. Se utilizó una bandeja con hielo para bajar la temperatura de las muestras cuando fue necesario.

5.8.2 pH.

Todas las muestras se midieron a 20°C con un pHímetro de la marca Crison micropH 2000 (Barcelona, España), previamente calibrado.

5.8.3 Glucosa

El análisis de la concentración de glucosa se llevó a cabo mediante un método enzimático en el cual se emplea un reactivo que contiene enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa que actúan como se indica en la siguiente fórmula:



Se empleó un reactivo que contiene: fosfatos 100 mmol/l, fenol 5 mmol/l, glucosa oxidasa >10 U/ml, peroxidasa > 1 U/ml, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/l, pH 7,5 y un patrón primario que contiene: glucosa 100 mg/dl, urea 50 mg/dl y creatinina 2 mg/dl.

El procedimiento consistió en pipetear en tubos Eppendorf los volúmenes indicados en la Tabla 2:

Tabla 2. Volúmenes de reactivos para el análisis de contenido en glucosa.

Reactivos	Blanco	Patrón	Muestra
Reactivo	1ml	1ml	1ml
Patrón primario	-	10 µl	-
Muestra	-	-	10µl

Una vez preparadas las muestras en los tubos Eppendorf, se agitaron durante 10 minutos en un vórtex y posteriormente se midió su absorbancia a 500 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV-Visible UV-2005 J.P. SELECTA (Barcelona, España).

La concentración de glucosa en cada muestra se calculó a partir de su absorbancia con la siguiente fórmula:

$$C_{muestra} = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{patrón}} \times C_{patrón}$$

5.8.4 Color

El color de las cervezas se analizó midiendo espectrofotométricamente cada muestra. En primer lugar, a 430 nm y en segundo lugar a 700 nm de longitud de onda. Cuando la absorbancia obtenida a 700 nm fue mayor de 0,039 veces la absorbancia obtenida a 430 nm, se consideró que las muestras estaban turbias, por lo que se procedió a filtrarlas con un filtro de jeringa de éster de celulosa mixta (MCE) con poro de 0,45 µm. Una vez libres

de turbidez se repitió la medida de absorbancia en el espectrofotómetro, hasta cumplir dicha condición.

Se utilizaron dos unidades de medida diferentes para el color: Standard Reference Method (SRM) y European Brewery Convention (EBC) y se obtuvieron mediante las siguientes fórmulas:

$$SRM = 12,7 \times Abs_{430} \times factor\ de\ dilución$$

$$EBC = 1,97 \times SRM$$

El equipo utilizado para medir la absorbancia fue un espectrofotómetro UV-Visible UV-2005 J.P. SELECTA (Barcelona, España).

5.8.5 Grado alcohólico

Para determinar la concentración de etanol de cada muestra se llevó a cabo el método combinado de destilación basado en las diferentes temperaturas de ebullición del etanol (78,4°C) y el agua (100°C) y análisis del destilado por densimetría, que se basa en la diferencia de densidades entre el etanol (0,79074 g/ml) y el agua (0,99829 g/ml).

En primer lugar, se midieron 200 ml de cada cerveza en un matraz aforado y se introdujeron en el matraz de destilación junto a unas piedras pómez para regular la ebullición y se añadieron 7 ml de lechada de cal para neutralizarla. El matraz aforado utilizado para medir la cerveza se lavó dos veces con 50 ml de agua destilada la cual se añadió también al matraz de destilación. Una vez preparadas las muestras, se montó el equipo de destilación y se preparó un matraz aforado para recoger la solución hidroalcohólica. Al matraz colector se le añadió agua destilada hasta el punto en el que se sumergió la alargadera para evitar así pérdidas de vapores de alcohol. La destilación finalizó al recogerse el volumen equivalente a 2/3 de la capacidad del matraz colector.

A continuación, se enrasó el matraz colector a 200 ml con agua destilada y se pasó a una probeta de 250 ml donde se midió la temperatura y el grado alcohólico mediante un alcoholímetro. Como la temperatura medida no era de 20°C se realizó una corrección utilizando una tabla de correlaciones de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).

5.8.6 Amargor

El análisis del amargor se realizó mediante un método espectrofotométrico que permite conocer la concentración de los α -ácidos, principales compuestos que aportan amargor a la cerveza provenientes del lúpulo. Se añadieron 10 ml de cada cerveza en tubos de centrífuga de 50 ml, además, se añadió 1 ml de HCl 3M, 20 ml de isooctano y 50 μ l de octanol. Se agitaron las muestras durante 15 minutos en un vórtex y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 15 minutos para asegurar la total separación de sus fases. A continuación, se separó la fase orgánica y se midió la muestra en el espectrofotómetro a 275 nm de longitud de onda usando una cubeta de 1 cm de cuarzo y preparando un blanco con una mezcla de 20 ml de isooctano y 50 μ l de octanol.

Finalmente, se calculó el amargor, en IBUs (International Bitterness Units) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Amargor} = 50 \times \text{Abs}_{275\text{nm}}$$

El equipo utilizado para medir la absorbancia fue un espectrofotómetro UV-Visible UV-2005 J.P. SELECTA (Barcelona, España).

5.8.7 Determinación de compuestos volátiles

Para determinar la concentración de los distintos compuestos volátiles presentes en las cervezas se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 (GC System Network) equipado con un detector de ionización de llama (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE. UU). Se utilizó una columna DB-624 (60 m x 250 mm x 1,4 mm). La temperatura de la columna fue de 40°C durante los primeros 5 minutos y posteriormente fue aumentando 10°C por minuto hasta llegar a 250°C. La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector fue de 300°C. Como gas portador se utilizó hidrógeno.

El método utilizado se calibró con los siguientes estándares externos: acetaldehído, metanol, 1-propanol, diacetilo, acetato de etilo, 2-butanol, alcohol isobutílico, 1-butanol, acetoína, 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. Como patrón interno se utilizó 4-metil-2-pentanol.

Para la preparación de las muestras, se filtró cada cerveza con un 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 con septo de PTFE/silicona. Además, se añadió en cada vial 100 μl de estándar interno (4-metil-2pentanol). Los viales se colocaron en el cromatógrafo programado para inyectar automáticamente 1 μl de cada muestra y el límite de detección fue de 0,1 mg/l. Los resultados se obtuvieron en forma de cromatogramas, en los cuales se realizó la integración de cada señal para conocer la concentración de cada uno de los compuestos.

5.9 Análisis sensorial

La evaluación sensorial se realizó con un panel de 10 catadores (7 mujeres y 3 hombres) del Departamento de Química y Tecnología de alimentos de la ETSIAAB (UPM). Cada panelista cató cuatro cervezas, correspondientes a las cuatro formulaciones distintas realizadas en esta configuración experimental. Cada panelista evaluó, mediante una hoja de cata, 20 atributos descriptivos tanto visuales, como olfativos, gustativos, retrogusto y percepción general. Los atributos se evaluaron con una escala de cinco puntos, siendo (1) baja percepción y (5) alta percepción. La cata se llevó a cabo en una sala especializada para ello, provista de luz blanca, con una temperatura controlada de 21°C, ventilada y con una sala de preparación para las muestras. En cada puesto se colocó un mantel blanco y cuatro copas de cata con cada muestra a evaluar. Además, se proporcionó un vaso de agua a cada juez.

En cuanto a la fase visual de la cata, el color se evaluó siendo los valores más bajos colores dorado, ámbar y cobrizo y los valores más altos color frambuesa o cereza. La turbidez se midió en función de la gama de transparencia, siendo opaco el valor más alto. La efervescencia se calificó en función del flujo de CO_2 en la cerveza, siendo el valor más bajo un flujo bajo y el valor más alto, un flujo alto. La consistencia de la espuma se evaluó en función del tamaño de la burbuja, burbujas grandes (muy ligera) sería el valor más bajo y burbujas pequeñas (cremosa) para el valor más alto. La persistencia de la espuma se midió en función de la duración de la espuma entre duración baja (valor más bajo) y duración alta (valor más alto). El color de la espuma se evaluó como el valor más bajo para blanco, un valor medio para ámbar y el valor más alto para marrón.

En cuanto a la fase olfativa, se analizaron parámetros como: intensidad aromática, malta, frutal, floral y oxidación-reducción, siendo el valor más bajo la ausencia o un olor muy ligero y el valor más alto un olor intenso de cada atributo.

En cuanto al sabor, se analizaron los siguientes atributos: cuerpo, dulzor, acidez, amargor, astringencia, efervescencia y retrogusto. Siendo sabores suaves o inexistentes el valor más bajo y sabores intensos y fuertes el valor más alto.

Para comparar los datos se elaboró un diagrama de radar con los valores medios de cada tipo de cerveza.

5.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se calcularon las medias y las desviaciones estándar de las muestras preparadas por triplicado. Además, se estudiaron las diferencias significativas en las distintas cervezas mediante un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial considerando dos factores: el tipo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* 7VA o *Lachancea thermotolerans* L.31) y la presencia de frutos rojos (sí o no). Además, se realizó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD). El nivel de significación utilizado en el estudio estadístico se fijó en 0,05 ($p < 0,05$). Todos los cálculos y el análisis estadístico se realizaron mediante el software Statgraphics v.16.2.04 (Graphics Software System, Rockville, MD, United States). Por último, se realizó una prueba de correlación de Pearson entre los datos obtenidos en el análisis de volátiles y en la prueba sensorial; y un análisis de componentes principales (PCA) mediante el software estadístico XLSTAT (Addinsoft, París, Francia) como complemento de Excel.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Parámetros del mosto: densidad, pH y concentración de glucosa

Se evaluaron tres parámetros durante las etapas de maceración, lavado y cocción del mosto: densidad, pH y concentración de glucosa.

En relación con la densidad, se observó un aumento gradual durante la etapa de maceración de 1045 a 1064 kg/m³. Tras el lavado, la densidad disminuyó hasta 1050 kg/m³, valor que se mantuvo constante hasta después de la cocción (Figura 3). El aumento de densidad del mosto durante la primera etapa de maceración se debe a la transformación del almidón en azúcares fermentables por las enzimas α y β amilasas presentes en la malta. Estos azúcares se solubilizan aumentando la concentración de sólidos en el mosto. Además, otros compuestos solubles como algunas proteínas, sales minerales y algunos lípidos de la malta pasan a la fase líquida aumentando la densidad. (32). Previo a la fase de lavado se separó la parte sólida proveniente de la malta y posteriormente, la dilución del mosto con el agua de lavado produjo una disminución de la viscosidad y la densidad de éste hasta llegar al valor deseado de 1050 kg/m³ donde se mantuvo constante hasta después de la cocción (33).

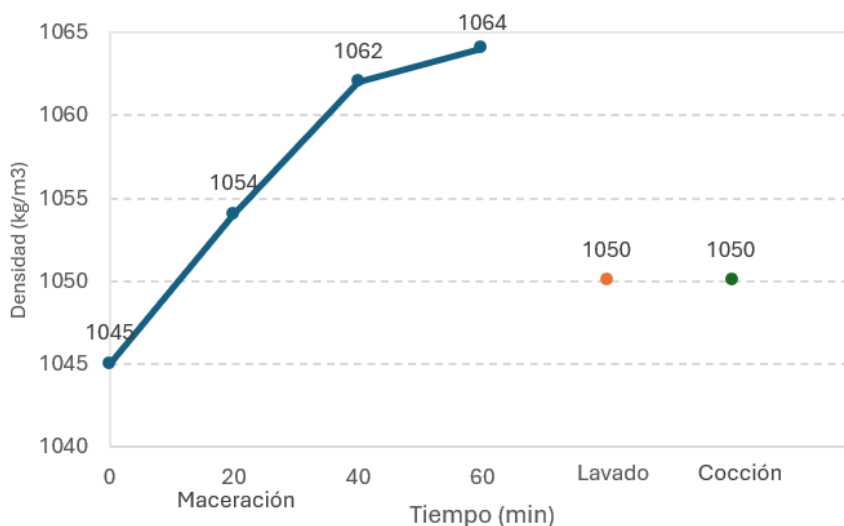


Figura 3. Evolución de la densidad en los procesos de maceración, lavado y cocción

En relación al pH, durante la maceración se registró una disminución inicial desde 5,53 a 5,43 antes de estabilizarse en 5,49 (Figura 4). Esta primera disminución es debida a que, en esta etapa, la malta libera la enzima fitasa que, especialmente a temperaturas entre 30 y 52°C transforma el ácido fítico en mioinositol y ácido fosfórico. Este ácido, en presencia de iones calcio y magnesio, forma fosfatos insolubles liberando iones hidrógeno y disminuyendo el pH (34). En la etapa de lavado, el pH sufrió un ligero aumento hasta 5,51 y posteriormente, en el proceso de cocción, el pH disminuyó hasta 5,27. La disminución del pH durante la cocción es debido al carácter ácido de las melanoidinas formadas por las “reacciones de Maillard” y al carácter acidificante del lúpulo (34). Los valores de pH obtenidos durante estos procesos son normales y óptimos para asegurar la acción de las enzimas que intervienen en la maceración y en la futura fermentación. Valores de pH por debajo de 4.9 podrían reducir la fermentabilidad del mosto inactivando enzimas como la α -amilasa (35).

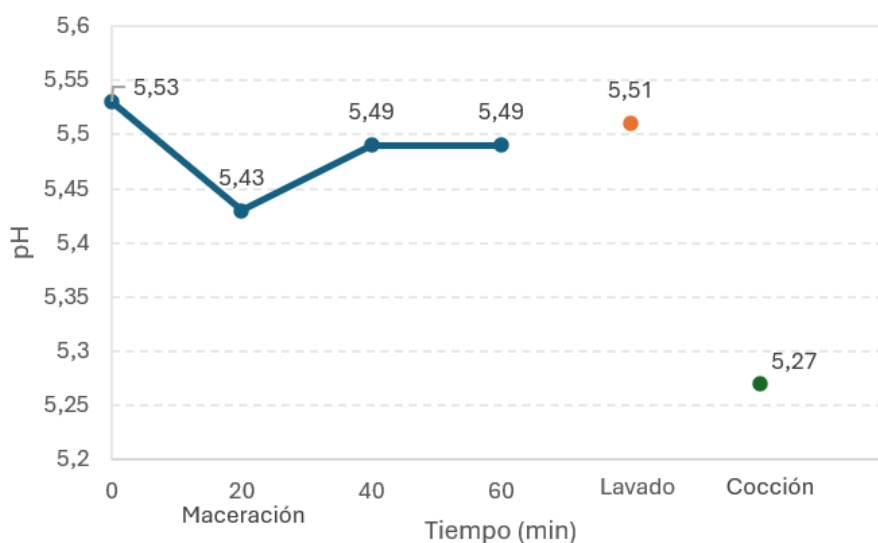


Figura 4. Evolución del pH en los procesos de maceración, lavado y cocción.

La concentración de glucosa durante el proceso de maceración disminuyó desde 4,89 g/l iniciales hasta 4,10 g/l en los primeros 40 minutos y a continuación, aumentó hasta 4,60 g/l durante los siguientes 20 minutos (Figura 5). Se realizó una prueba de presencia de almidón al principio de la maceración dando resultado negativo, lo que indica que las amilasas de la malta actuaron rápido transformando el almidón en glucosa (36). Por esta

razón, la variación de la glucosa a lo largo de la maceración es muy pequeña. En la etapa de lavado, la concentración de glucosa disminuyó significativamente hasta 2,63 g/l. Esto se debe fundamentalmente al proceso de dilución que ocurre al adicionar agua de lavado (37). Finalmente, durante la cocción, la concentración de glucosa experimentó un ligero aumento hasta 2,83 g/l, posiblemente debido a la concentración por evaporación del agua (34).

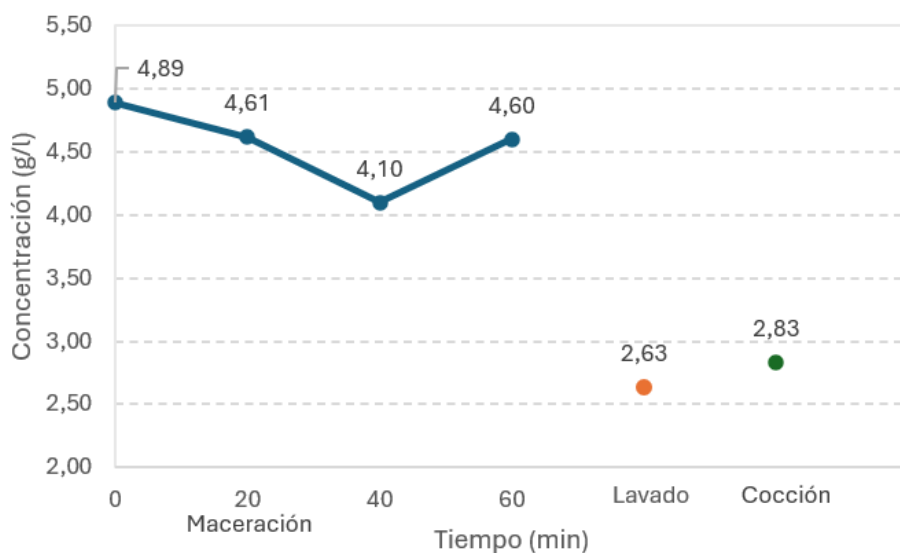


Figura 5. Evolución de la concentración de glucosa (g/l) en los procesos de maceración, lavado y cocción.

6.2 Parámetros durante la fermentación

Una vez inoculado el mosto con las levaduras seleccionadas (*Saccharomyces cerevisiae* y *Lachancea thermotolerans*) se produjo la primera fermentación durante los siguientes días. Durante este periodo de tiempo se tomaron datos de densidad, pH y concentración de glucosa para controlar la fermentación de los 12 tipos de cerveza elaborados, como se muestra en las Figuras 6, 7 y 8.

La densidad del mosto al inicio de la fermentación se encontraba a 1050 kg/m³ y como se muestra en el gráfico, todas las cervezas sufrieron una disminución progresiva a lo largo del tiempo hasta que se estabilizaron en torno a 1012 kg/m³, valor establecido como final de la fermentación. Las cervezas que más rápido disminuyeron su densidad fueron las de 7VA con frutos, seguidas de las muestras de L31 con frutos, indicando que las muestras a las que se les añadió frutos rojos fermentaron antes. Además, se confirmó el poder fermentativo superior de *S. cerevisiae* en comparación con *L. thermotolerans* (38).

Cabe destacar que tres de las muestras (L31.1, L31.2 y L31.3) no disminuyeron su densidad en los primeros días, a diferencia de las otras muestras, por un problema de fermentación, por lo que se decidió añadirles de nuevo levaduras hasta conseguir que su densidad disminuyera hasta 1012 kg/m³.

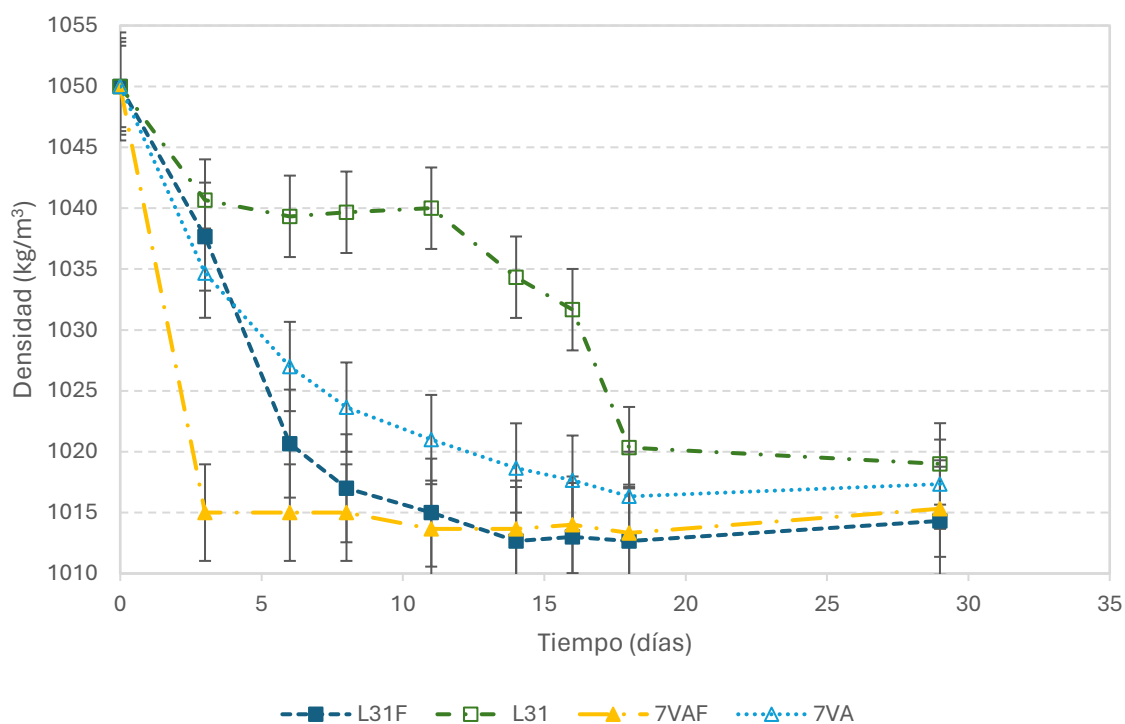


Figura 6. Evolución de la densidad (kg/m³) durante la fermentación.

En cuanto a la evolución del pH durante la primera fermentación, las doce cervezas mantuvieron los valores más o menos constantes o sufrieron ligeras disminuciones con el paso de los días. Cada tipo de cerveza muestra una tendencia similar de disminución del pH a lo largo del tiempo, lo que es consistente con el proceso de fermentación en el que los azúcares se metabolizan en alcohol y dióxido de carbono, produciendo ácidos que reducen el pH, como es el caso del ácido L-láctico en la fermentación de *L. thermotolerans*. Aunque todas las cervezas muestran una tendencia general de disminución del pH, existen variaciones sutiles entre los diferentes tipos. Algunas cervezas parecen tener una disminución más rápida del pH, lo que podría indicar un mayor contenido de azúcar inicial, como es el caso de las cervezas con frutos rojos, que supondría la producción de mayor número de ácidos como el L-láctico manifestando otras rutas metabólicas de transformación de azúcares y disminuyendo el pH más rápido.

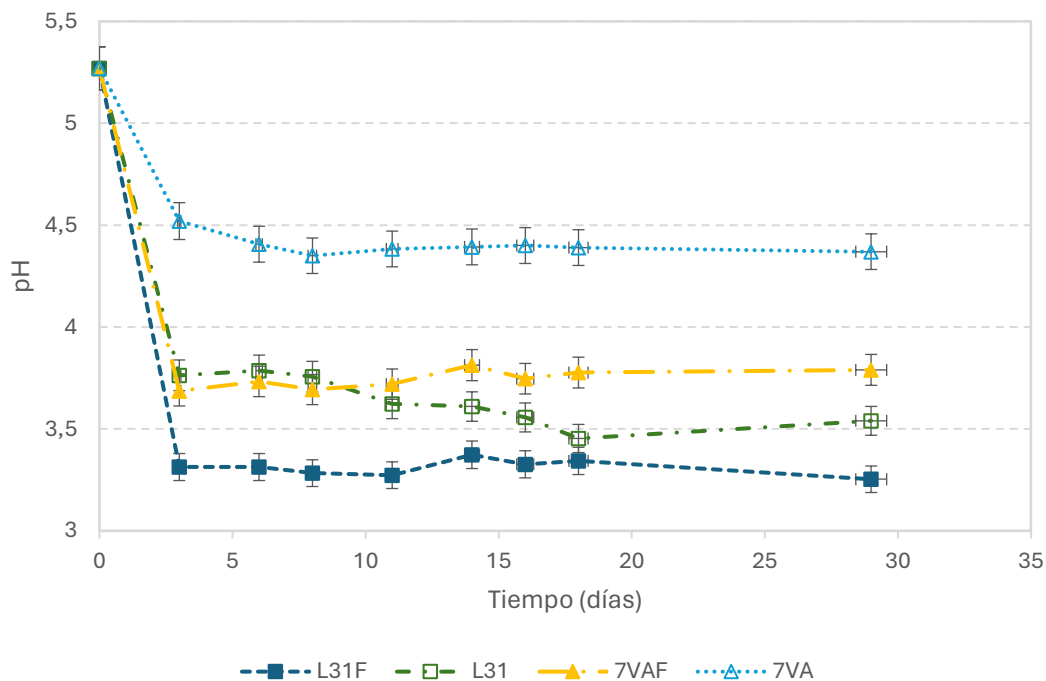


Figura 7. Evolución del pH durante la fermentación

Por último, la concentración de glucosa durante la fermentación presenta una disminución casi total en los primeros días, causada por la fermentación de las levaduras que transforman esta glucosa en etanol. *L. thermotolerans* demostró una disminución de la actividad debido al agotamiento de los azúcares disponibles, mientras que *S. cerevisiae* siguió fermentando, posiblemente utilizando los azúcares fermentables que quedaban en la solución como la maltosa y la maltotriosa (39). Los picos de incremento de contenido en glucosa que se pueden identificar en la [figura X](#) se pueden explicar y que la concentración de azúcares obtenida es muy pequeña y se encuentran por debajo de la sensibilidad del método de medida (0,23 mg/dl).

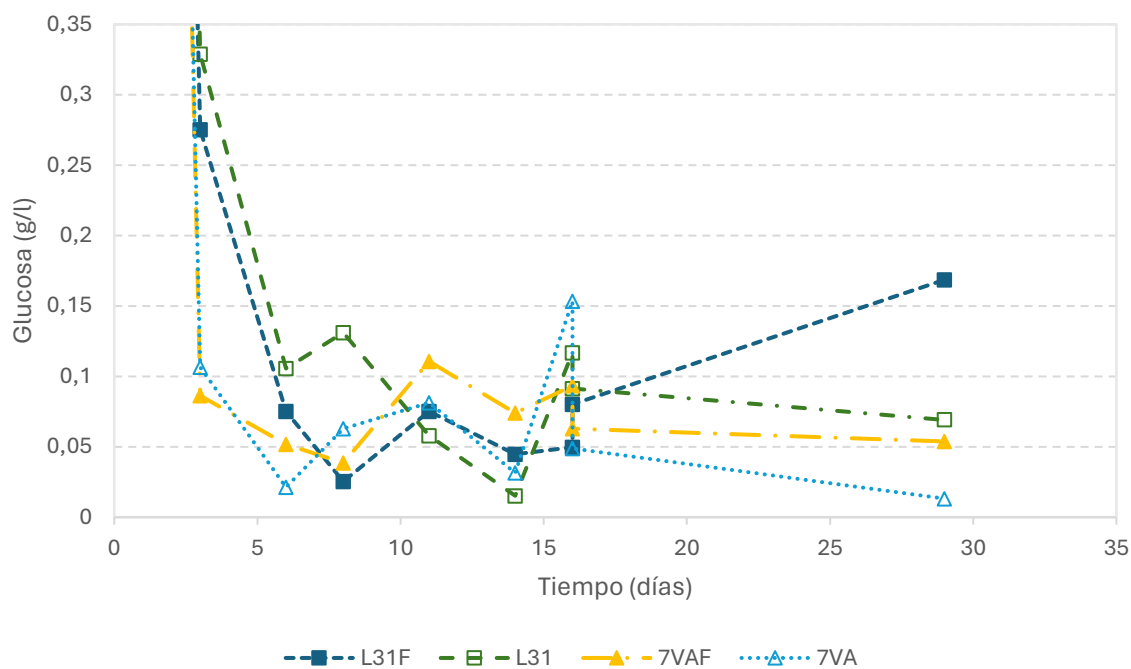


Figura 8. Evolución de la concentración de glucosa (g/l) durante la fermentación.

6.3 Parámetros de la cerveza acabada

Los resultados obtenidos de los análisis realizados a la cerveza acabada tales como el amargor, la concentración de glucosa, la densidad, el pH, el color y el contenido de alcohol se presentan en la Tabla 3. El análisis estadístico reveló que tanto el tipo de levadura como la incorporación de frutos rojos tuvieron efectos significativos en varios aspectos de la composición y características organolépticas de la cerveza. Por ejemplo, en lo que respecta al amargor, la cerveza más amarga fue la fermentada con *Saccharomyces cerevisiae* 7VA sin frutos rojos y la menos amarga fue la fermentada con *Lachancea thermotolerans* L.31 con frutos rojos. Estos datos indican que la cepa de levadura influye en el amargor, ya que las cervezas realizadas con *S. cerevisiae* son un 43,77% más amargas que las fermentadas con *L. thermotolerans*. La variedad y la cantidad de lúpulo fueron constantes en todas las cervezas ya que se elaboraron a partir del mismo mosto, por lo tanto, las diferencias observadas en los valores de amargor pueden deberse a la influencia de las cepas de levadura utilizadas. Algunos estudios sugieren que las moléculas de α -ácidos del lúpulo podrían adherirse a las paredes celulares de las levaduras, que se depositarían en el fondo del fermentador reduciendo así el amargor de la cerveza (40). La adición de frutos rojos también se presenta como un factor determinante en el amargor, siendo las cervezas sin fruta un 53,9 % más amargas

que las cervezas con fruta, datos que concuerdan con otros estudios revisados en los que se añadían frutos a la cerveza (41,42). De la misma manera que con el tipo de levadura utilizada, los α -ácidos podrían adherirse a las paredes celulares de las frutas disminuyendo el amargor en este tipo de cervezas.

En cuanto a la concentración de glucosa, no se mostraron efectos significativos ni del tipo de levadura utilizado, ni de la presencia de frutos rojos, ni de su interacción. Los valores de glucosa restantes en la cerveza final fueron muy bajos, indicando que ambas cepas de levadura consumieron casi toda la glucosa disponible durante la fermentación.

La densidad final de la cerveza no mostró diferencias significativas en relación al tipo de levadura utilizada ni en relación a la adición de frutos rojos. Las cervezas elaboradas con *Saccharomyces* presentaron una densidad ligeramente mayor con valores entre 1015 y 1017 kg/m³ en comparación con las elaboradas con *Lachancea* con una densidad entre 1015 y 1013 kg/m³, pero la diferencia no se establece como significativa para este parámetro.

El pH de las cervezas elaboradas con *L. thermotolerans* resultó ser más ácido, con valores entre 3,3 y 3,6 en comparación con el pH obtenido de las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* con valores entre 3,7 y 4,4 por lo que se puede concluir que el tipo de levadura utilizado influye significativamente en el pH. Esto se debe a la alta producción de ácido láctico por parte de *L. thermotolerans* lo que hace disminuir el pH (23). Los valores de pH obtenidos en las cuatro configuraciones de cerveza se encontraron en el intervalo hallado por Polshin et al. (43) los cuales se encontraban entre 3,35 y 4,56 para cervezas artesanales. La presencia de frutos rojos también tuvo una influencia significativa en el pH, siendo las cervezas con frutos las que presentaron un valor de pH más bajo. Esto es debido al mayor contenido en azúcar inicial aportado por las frutas, lo que supone en una mayor producción de ácidos por parte de las levaduras y en una disminución del pH.

El color de la cerveza, medida con el sistema de color europeo (EBC) mostró variaciones significativas con relación a la presencia o ausencia de frutos rojos. La presencia de frutos rojos durante la fermentación aportó colores más intensos en la cerveza, en comparación con las muestras que no tenían frutos rojos. El color rojo obtenido en las muestras L31F y 7VAF concuerda con el obtenido por Ducruet et al. (2017) en sus estudios de elaboración de cerveza artesanal con adición de bayas al principio de la fase de ebullición. Estos autores observaron la extracción de compuestos de las bayas debido a la alta

temperatura y a la formación de melanoidinas resultantes de la reacción de Maillard (28). Sin embargo, el tipo de levadura utilizada no tuvo un efecto significativo en el color, lo que sugiere que la variabilidad del color depende más de los ingredientes adicionales que del proceso de fermentación.

El análisis del contenido en alcohol no mostró una influencia significativa del tipo de levadura utilizada ni de la adición de frutos rojos en el porcentaje alcohólico de las cervezas (%v/v). Esto se puede deber a que la mayor potencia fermentadora de *Saccharomyces* frente a *Lachancea* no es tan visible en cervezas ya que presentan contenidos alcohólicos bajos entre 3-5% (v/v), a diferencia del vino donde es más apreciable la diferencia entre ambas levaduras. Los datos obtenidos no concuerdan con los obtenidos en otros estudios como Callejo et al. (2019) en el que el contenido de etanol en la cerveza producida por *S. cerevisiae* (1,9 mg/l) era superior al contenido de etanol obtenido en la cerveza producida por *L. thermotolerans* (1,4 mg/l) (44). En el mismo sentido, los valores de etanol observados por Postigo et al. (2023) en sus estudios oscilaban entre 3,85 a 5,35 % (v/v) para las cepas de *Lachancea* mientras que para la cepa control de *Saccharomyces* el valor fue de 6,27% (v/v); por tanto, el contenido de alcohol fue superior en las cervezas producidas por *Saccharomyces* (45).

Tabla 3. Resultados del análisis de la cerveza acabada.

	Amargor (IBUs)	Glucosa (g/l)	Densidad (kg/m ³)	pH	Color (EBC)	Alcohol (%v/v)
L31F	8,58 ± 0,10 ^a	0,096 ± 0,00046 ^a	1015,33 ± 0,58 ^a	3,37 ± 0,03 ^a	18,35 ± 0,81 ^a	3,91±0,15 ^b
L31	11,47 ± 0,91 ^b	0,075 ± 0,00039 ^a	1013,33 ± 1,15 ^a	3,59 ± 0,03 ^b	13,65 ± 0,63 ^b	4,37±0,30 ^d
7VAF	10,72 ± 0,81 ^b	0,055 ± 0,00023 ^a	1015,33 ± 0,58 ^a	3,74 ± 0,01 ^c	18,14 ± 0,46 ^a	4,02±0,16 ^c
7VA	18,65 ± 1,13 ^c	0,031 ± 0,00014 ^a	1017 ± 1,00 ^a	4,33 ± 0,02 ^d	13,73 ± 0,26 ^b	3,79±0,12 ^a

*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). L31F: *Lachancea thermotolerans* con fruta; L31: *Lachancea thermotolerans* sin fruta; 7VAF: *Saccharomyces cerevisiae* con fruta; 7VA: *Saccharomyces cerevisiae* sin fruta.

6.4 Compuestos volátiles

En este apartado se detallan los resultados obtenidos del GC-FID para la determinación de compuestos volátiles resultantes tanto de la primera fermentación como del

acondicionamiento en botella (Tablas 4, 5 y 6). Los resultados se analizaron según los límites de percepción de cada compuesto resumidos en la Tabla 7. Los compuestos volátiles analizados se dividieron en tres grupos:

- Alcoholes superiores: 1-propanol, 2-butanol, isobutanol, 1-butanol, 3-metil-1butanol, 2-metil-1butanol, hexanol y alcohol-1-feniletílico.
- Ésteres: acetato de etilo, acetato de isobutilo, butirato de etilo, lactato de etilo, acetato de isoamilo y acetato 2-feniletilo.
- Compuestos carbonílicos: acetaldehído, diacetilo y acetoína.

6.4.1 Alcoholes superiores

En la Tabla 4 se muestran las medias y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos de alcoholes superiores en cada tipo de cerveza.

El metanol, relacionado con aromas a alcohol y disolvente, presentó concentraciones muy superiores al umbral de percepción (0,5-3,0 mg/l) obteniéndose resultados entre 13,9 y 19,5 mg/l. El 1-propanol, compuesto que aporta sabor y aroma a alcohol, se encuentra en todos los casos en valores superiores al umbral de percepción (3,0 mg/l). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Kobayashi et al. (2008) en los que se obtuvieron valores de 1-propanol entre 8 y 15 mg/l en cervezas artesanales (46). El 2-butanol y el 1-butanol no se detectaron en el análisis cromatográfico. En cuanto al isobutanol, las cuatro cervezas presentaron valores por debajo del límite de percepción (100 mg/l), siendo valores entre 14 y 21 mg/l, lo que significa que este compuesto no es perceptible en las cervezas. En relación con el 3-metil-1 butanol, compuesto que aporta aromas relacionados con vinoso y plátano, solo la muestra L31 presenta valores superiores al umbral de percepción (30,0-70,0 mg/l), mientras que las otras tres muestras presentan valores ligeramente por debajo del umbral, en torno a 22 -26 mg/l. En cuanto al 2-metil-1butanol, compuesto que aporta aromas similares al anterior, todas las muestras de cerveza presentaron valores superiores al límite de percepción (8,0 mg/l). Las concentraciones de 2-metil-1-butanol concuerdan con las obtenidas por Ocvirk et al. (2018) en su estudio con cervezas tipo lager (47). El hexanol, compuesto relacionado con olores herbáceos, presentó concentraciones superiores al umbral de percepción (4 mg/l) para las muestras elaboradas con *Lachancea thermotolerans*: 5,88 y 4,32 mg/l, mientras que en las muestras elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae*, las concentraciones son ligeramente inferiores al umbral de

percepción: 3,05 y 3,97. Este compuesto podría ser característico de *L. thermotolerans* ya que al igual que en este estudio, los datos obtenidos por Peces-Pérez et al. (2022) fueron similares en cuanto al contenido de hexanol superior en muestras de *L. thermotolerans* que en muestras de *S. cerevisiae*. Por último, el alcohol 2-feniletílico, el cual aporta aromas a pétalo de rosa y perfume, presentó concentraciones por encima del umbral de percepción (8,0-35,0 mg/l) en las cuatro configuraciones distintas, por lo que este tipo de aromas serían perceptibles en todas las cervezas.

Tabla 4. Concentración de alcoholes superiores volátiles (mg/l) en la cerveza acabada..

	L31F	L31	7VAF	7VA
Metanol	19,58±14,48 ^c	15,27±7,22 ^b	19,03±14,06 ^c	13,92±0,71 ^a
1-propanol	11,05±7,26 ^a	23,52±1,54 ^c	11,47±7,34 ^a	14,40±3,21 ^b
2-butanol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Isobutanol	14,93±10,49 ^a	21,65±1,17 ^d	15,51±11,00 ^c	14,34±0,16 ^b
1-butanol	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
3-metil-1-butanol	22,96±17,98 ^a	36,68±2,08 ^d	26,92±21,42 ^c	24,99±1,13 ^b
2-metil-1-butanol	13,71±9,42 ^a	20,45±0,18 ^d	17,06±12,43 ^c	16,65±1,03 ^b
Hexanol	5,88±4,00 ^c	4,32±0,27 ^b	3,05±2,68 ^a	3,97±0,44 ^b
Alcohol 2-feniletílico	13,15±3,91 ^b	20,87±3,11 ^d	15,26±5,80 ^c	12,80±0,24 ^a

*Los datos representan el valor promedio ± desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada fila son significativamente diferentes (P<0,05). L31F: *Lachancea thermotolerans* con fruta; L31: *Lachancea thermotolerans* sin fruta; 7VAF: *Saccharomyces cerevisiae* con fruta; 7VA: *Saccharomyces cerevisiae* sin fruta.

6.4.2 Ésteres

En la Tabla 5 se muestran las medias y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos de ésteres en cada tipo de cerveza.

En primer lugar, el acetato de etilo, compuesto que aporta un aroma afrutado, presenta concentraciones superiores al umbral de percepción (10 mg/l) en las cuatro cervezas elaboradas, siendo las cervezas fermentadas con *L. thermotolerans* las que presentan valores dos veces superiores a los obtenidos en las elaboradas con *S. cerevisiae*. En estos

ensayos se obtuvieron concentraciones de acetato de etilo muy superiores a las obtenidas por Pavslar y Buiatti (2009), que estuvieron en el rango de 8-13 mg/l (48). El acetato de isobutilo, que aporta aromas afrutados, dulces y a plátano, se percibe a partir de 2 mg/l, por lo que se percibiría en tres de las cuatro cervezas, a excepción de la muestra 7VAF que presenta una concentración de este compuesto de 1,23 mg/l. Los datos obtenidos son ligeramente superiores a los obtenidos por Xu et al. (2017) en su estudio con cervezas lager, donde la concentración de acetato de isobutilo fue de 0,3-2,4 mg/l (49). En cuanto al butirato de etilo, compuesto que se relaciona con aromas a frutas tropicales, no se ha detectado en el análisis cromatográfico de estas cervezas. El lactato de etilo, compuesto ligeramente dulce, afrutado y mantecoso se percibe en concentraciones superiores a 154 mg/l, por lo que no se alcanzaría el nivel de percepción en ninguna de las cuatro cervezas elaboradas, las cuales presentan concentraciones entre 2 y 13 mg/l. Por otro lado, el acetato de isoamilo, compuesto que aporta aroma a plátano, afrutado y dulce presenta un umbral de percepción a partir de 0,5 mg/l por lo que sería perceptible en todas las muestras de cerveza que presentan valores de entre 2,02 y 2,89 mg/l, concentraciones ligeramente superiores a las obtenidas por Kobayashi et al. (2008) (46). Finalmente, el acetato de 2-feniletilo, que aporta aromas asociados a miel, rosas, manzanas y dulce tiene un umbral de percepción a partir de 2,0 mg/l por lo que se podría percibir en todas las cervezas elaboradas ya que todas las muestras presentan concentraciones superiores al límite de percepción, con valores entre 5,9 y 7,9 mg/l.

Tabla 5. Concentración de ésteres volátiles (mg/l) en la cerveza acabada.

	L31F	L31	7VAF	7VA
Acetato de etilo	20,31±16,94 ^c	34,73±2,51 ^d	17,58±14,73 ^b	16,59±0,79 ^a
Acetato de isobutilo	2,12±2,38 ^b	2,63±2,32 ^c	1,23±1,34 ^a	2,99±1,65 ^d
Butirato de etilo	0,00±0,00 ^a	00,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Lactato de etilo	13,38±9,90 ^d	5,69±5,65 ^b	2,28±3,95 ^a	9,38±3,59 ^c
Acetato de isoamilo	2,36±0,98 ^b	2,57±0,27 ^c	2,89±1,83 ^d	2,03±0,23 ^a
Acetato 2-feniletilo	5,91±1,15 ^a	6,97±0,45 ^b	7,92±4,15 ^c	7,92±0,48 ^c

*Los datos representan el valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada fila son significativamente diferentes (P<0,05). L31F: *Lachancea thermotolerans* con fruta; L31: *Lachancea thermotolerans* sin fruta; 7VAF: *Saccharomyces cerevisiae* con fruta; 7VA: *Saccharomyces cerevisiae* sin fruta.

6.4.3 Compuestos carbonílicos

En la Tabla 6 se muestran las medias y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos de compuestos carbonílicos en cada tipo de cerveza.

El acetaldehído, asociado a olores de manzana y hojas verdes, tiene un umbral de percepción entre 2,0 - 20,0 mg/l, lo que supone que es perceptible en las cuatro cervezas elaboradas que presentan valores entre 2,42 y 7,77 mg/l. La muestra con mayor concentración de este compuesto fue la L31 elaborada con *L. thermotolerans* con 7,77 ppm, más de dos veces la concentración de este compuesto en la muestra 7VA elaborada con *S. cerevisiae* que presentó 3,08 ppm. Según Peces-Pérez et al. (2022), la concentración de acetaldehído era cuatro veces superior en las muestras de vino elaboradas con *S. cerevisiae* que en las elaboradas con *L. thermotolerans* (50). Por otro lado, la concentración de diacetilo, responsable del aroma a mantequilla, supera el umbral de percepción (0,01-0,04 mg/l) en las cuatro muestras, siendo superior a 0,99 mg/l la cerveza con menor contenido en diacetilo que fue la muestra 7VAF. Por último, el contenido en acetoína, molécula asociada a aromas afrutados, mohosos y amaderados, se encuentra por encima del umbral de percepción que es 1,0-10,0 mg/l en las cuatro muestras de cerveza.

Tabla 6. Concentración de compuestos carbonílicos volátiles (mg/l) de la cerveza acabada.

	L31F	L31	7VAF	7VA
Acetaldehído	3,03 \pm 2,09 ^b	7,77 \pm 3,91 ^c	2,42 \pm 1,58 ^a	3,08 \pm 0,54 ^b
Diacetilo	1,39 \pm 0,22 ^b	1,65 \pm 0,15 ^c	0,99 \pm 0,92 ^a	1,74 \pm 0,37 ^c
Acetoína	5,20 \pm 0,63 ^b	5,46 \pm 0,16 ^{bc}	3,27 \pm 2,86 ^a	5,62 \pm 0,46 ^c

*Los datos representan el valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada fila son significativamente diferentes (P<0,05). L31F: *Lachancea thermotolerans* con fruta; L31: *Lachancea thermotolerans* sin fruta; 7VAF: *Saccharomyces cerevisiae* con fruta; 7VA: *Saccharomyces cerevisiae* sin fruta.

Tabla 7. Umbrales de percepción de los principales compuestos volátiles producidos durante la fermentación en matrices de cerveza

Compuestos Volátiles	Categoría	Umbral de percepción (mg/l)	Olores asociados
Acetaldehído	Aldehído	2.0-20.0	Manzana, hojas verdes
Metanol	Alcohol	0,5-3,0	Alcohol
1-propanol	Alcohol	3,0-16,0	Alcohol
Diacetilo	Carbonilo	0,01-0,4	Mantequilla
Acetato de etilo	Ester	10,0-60,0	Afrutado
Isobutanol	Alcohol	100	Alcohol
Acetoína	Carbonilo	1,0-10,0	Afrutado, mohoso, amaderado
3-metil-1-butanol	Alcohol	30,0-70,0	Alcohol, vinoso, plátano
2-metil-1-butanol	Alcohol	8,0-30,0	Alcohol, vinoso, plátano
Acetato de isobutilo	Ester	2	Plátano, dulce, fruta
2-3 butanodiol	Alcohol	50,0-150,0	Dulce
Hexanol	Alcohol	4	Herbáceo
Alcohol 2-feniletílico	Alcohol	8,0-35,0	Pétalo de rosa, amargo, perfume
Acetato-2-feniletilo	Ester	0,05-2,0	Rosas, miel, manzana, dulce

*Fuente: Biomodulation of Physicochemical Parameters, Aromas, and Sensory Profile of Craft Beers by Using Non-*Saccharomyces* Yeasts

6.5 Análisis sensorial

Los datos obtenidos a partir de la cata, en la que se evaluaron 20 atributos puntuados de 0 a 5 relacionados con la vista, el olfato y el gusto se resumen en la Tabla 8. Los valores representados son las medias y las desviaciones estándar obtenidas de los 10 jueces que realizaron el análisis sensorial. En las Figuras 9, 10 y 11 se muestran gráficos de radar que representan las puntuaciones de los distintos atributos en la fase visual, olfativa y gustativa.

En cuanto a los atributos visuales, las cervezas a las que no se les añadieron frutos rojos (L31 y 7VA) presentaron colores similares a dorado y ámbar, siendo la fermentada con *L. thermotolerans* ligeramente más oscura que la fermentada con *S. cerevisiae*. Las cervezas a las que sí se les añadieron frutos rojos presentaron un color final con tonalidades similares a frambuesa y cereza, siendo la muestra L31F más oscura y parecida al color de la cereza que la muestra 7VAF, que es ligeramente más clara y de color similar a frambuesa. El análisis estadístico determinó el tipo de levadura utilizado y la adición de frutas como factores significativos en la evaluación de color. Por otro lado, los resultados obtenidos analíticamente del color, medido en unidades EBC, reflejaron un efecto significativo de la presencia de frutos rojos, pero no una variación debida a la levadura empleada. Se debe tener en cuenta que el valor de EBC se analiza a una sola longitud de onda (430 nm) y no tiene en cuenta, por lo tanto, matices en cuanto a tonalidad.

En lo relativo a la turbidez, las cuatro muestras se mantuvieron en un nivel medio-bajo con valores entre 2,6 y 3,3, siendo las cervezas con frutos rojos (L31F y 7VAF) las que presentaron mayor turbidez, como era de esperar al haber fermentado con fruta, lo que provoca la suspensión de mayor número de partículas sólidas provenientes de la fruta. La muestra L31 fue la que más efervescencia presentó con diferencia respecto a las otras tres muestras, que obtuvieron valores bajos en este atributo. Tanto la consistencia como la persistencia de la espuma fueron muy bajas en las cervezas elaboradas con frutos rojos, que obtuvieron la mínima puntuación de este atributo; por el contrario, las cervezas sin frutos presentaron mayor consistencia y persistencia de espuma, siendo la muestra L31 la que mayor puntuación obtuvo en ambos parámetros. El ANOVA mostró una relación significativa entre la adición de fruta con la efervescencia, la consistencia y la persistencia de la espuma. El color de la espuma obtuvo valores similares en las cuatro cervezas indicando un color blanco en las cuatro muestras, lo que significa que la levadura y la fruta no afectan al color de la espuma.

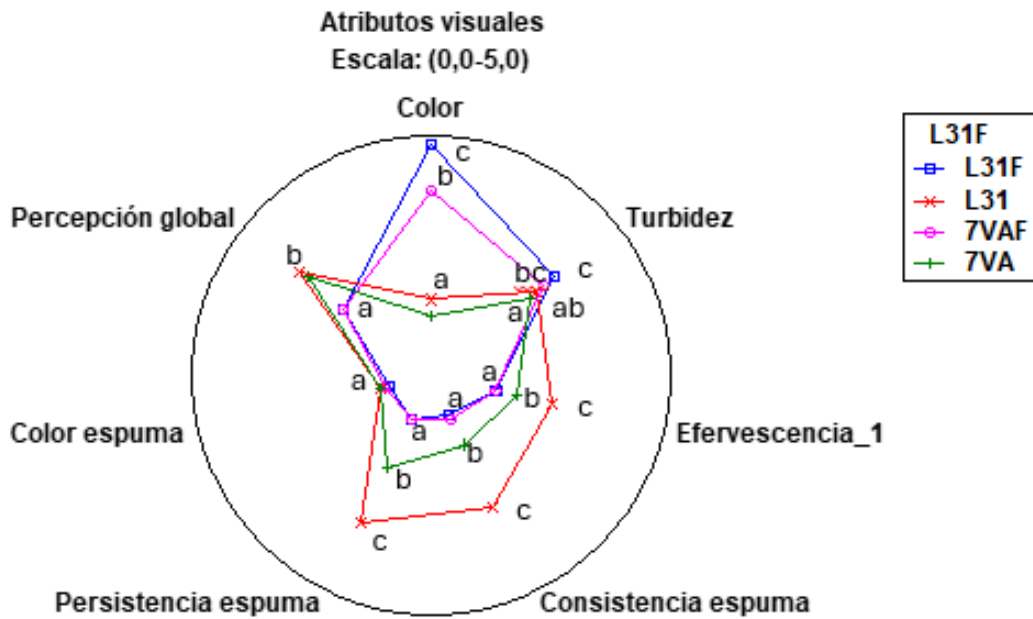


Figura 9. Gráfico de radar para el análisis sensorial de los parámetros visuales.

Con respecto a los parámetros olfativos, la intensidad aromática de las cuatro cervezas en este análisis sensorial se mantuvo en niveles medios (2,7-3,8) siendo la muestra 7VA la más intensa seguida de la L31. Las cervezas a las que se les añadieron frutos rojos (L31F y 7VAF) presentaban una intensidad aromática inferior, siendo L31F la menos intensa. En cuanto a la calidad aromática, la muestra L31 obtuvo la mayor puntuación seguida de 7VA y siendo la muestra 7VAF la que menos calidad aromática presentó. Esto indica que las cervezas sin frutos rojos tienen una mayor calidad aromática que las que sí tienen frutos y que las cervezas elaboradas con *Lachancea thermotolerans* tienen mayor calidad aromática que las elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae*. Estadísticamente, se comprobó que la adición de fruta afecta significativamente a la intensidad y a la calidad aromática. El aroma a malta fue notable en las muestras sin frutos rojos, siendo 7VA en la que mayor percepción se tuvo de este aroma. Por el contrario, las muestras con fruta presentaron valores bajos de aroma a malta, como era de esperar por su mayor complejidad aromática, y aromas más frutales derivados de las bayas añadidas. El aroma floral se percibió en mayor medida en las cervezas sin frutos, siendo L31 la que mayor puntuación obtuvo de este atributo. El aroma frutal presentó valores altos en las muestras L31F y 7VAF. Las muestras L31 y 7VA obtuvieron puntuaciones de 2,3 y 2,2

respectivamente en el atributo frutal, quizá aportado por el lúpulo utilizado que se caracterizaba por aportar aromas cítricos y florales a la cerveza final. En cuanto a la oxidación-reducción, las muestras presentaron puntuaciones neutras (cercanas a 3), lo que significa que no estaban ni oxidadas ni reducidas, a excepción de la muestra 7VAF la cual se percibió ligeramente reducida, posiblemente debido a la presencia de alguna levadura o bacteria en las bayas, que no eran estériles.

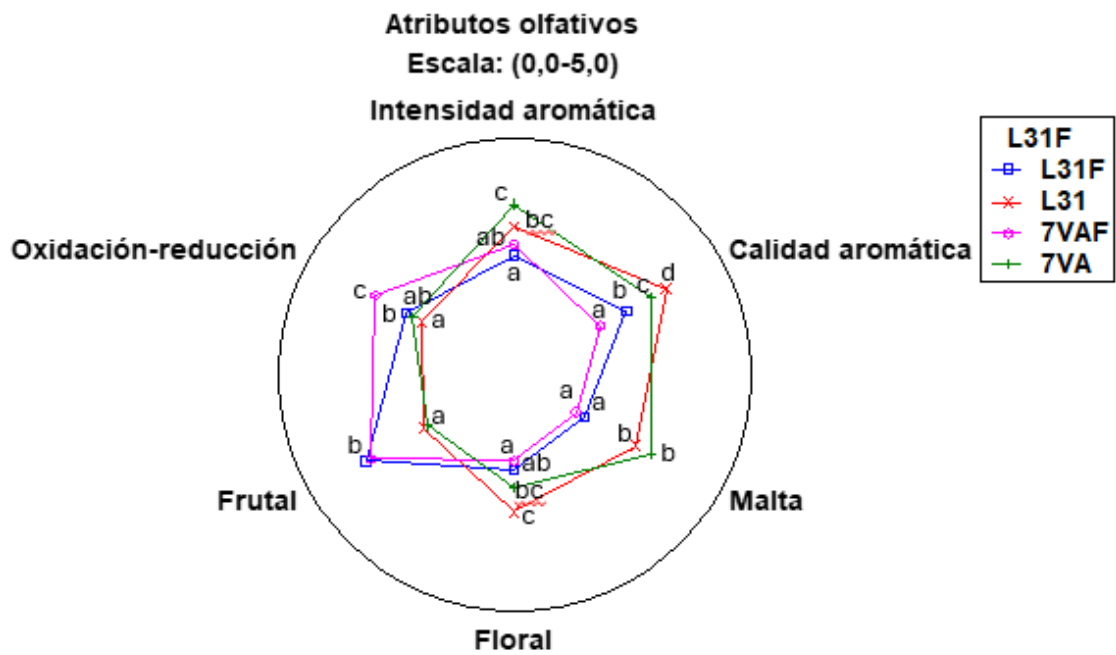


Figura 10. Gráfico de radar para el análisis sensorial de los parámetros olfativos.

En lo referente a los parámetros gustativos de la cata, las cuatro cervezas elaboradas presentaron un cuerpo medio-bajo. La muestra con más cuerpo fue la L31, seguida de la L31F y la 7VAF y la muestra con menos cuerpo fue la 7VA. Estos datos no indican ninguna relación entre la adición de fruta en la cerveza y el cuerpo, pero sí se podría afirmar que las cervezas elaboradas con *Lachancea thermotolerans* tienen más cuerpo que las elaboradas con *Saccharomyces cerevisiae*. En cuanto al dulzor, las muestras con frutos rojos tuvieron una puntuación más alta que las otras muestras, sin embargo, se obtuvieron puntuaciones bajas (1,7-2,2) en general en este atributo. La cerveza que presentó mayor acidez en boca fue L31F, seguida de 7VAF y de L31 respectivamente.

Estos datos demuestran que las cervezas que mayor acidez presentaron fueron las que se añadieron frutos debido a que son mayores productoras de ácidos por la mayor presencia de azúcares de la fruta; además de las elaboradas con *Lachancea thermotolerans* debido a su alta producción de ácido láctico y acidez volátil. Los datos obtenidos del análisis sensorial concuerdan con la medida analítica de pH en cuanto a la cerveza más ácida, que fue L31F y la menos ácida que fue 7VA. Sin embargo, en el análisis sensorial se detectó la muestra 7VAF más ácida que la L31 cuando su pH era superior en la medida analítica.

En cuanto al amargor, las cuatro muestras obtuvieron puntuaciones medias-bajas, siendo la más amarga 7VA y la menos amarga la L31F, indicando que las cervezas sin frutas se percibieron más amargas que las que sí llevaban y las cervezas fermentadas con *S. cerevisiae* fueron más amargas que las fermentadas con *L. thermotolerans*. Estos datos obtenidos en la cata concuerdan con los obtenidos en el análisis de amargor espectrofotométricamente. La astringencia obtuvo valores bajos y similares en las cuatro configuraciones siendo 7VA la más astringente y L31F la menos, sin embargo, no se podría afirmar la influencia significativa del tipo de levadura o de la adición de fruta en la valoración de este atributo. La efervescencia en boca coincide con los resultados de la efervescencia evaluada en la fase visual, siendo las cervezas sin frutas más efervescentes y las elaboradas con *Lachancea thermotolerans* también más efervescentes. Por último, el retrogusto de las cervezas presentó valores medios, siendo la muestra L31 la que mayor retrogusto presentaba y la muestra 7VAF la que menos, indicando que las cervezas que no se les añadieron frutos rojos y las fermentadas con *L. thermotolerans* tienen más retrogusto que las contrarias.

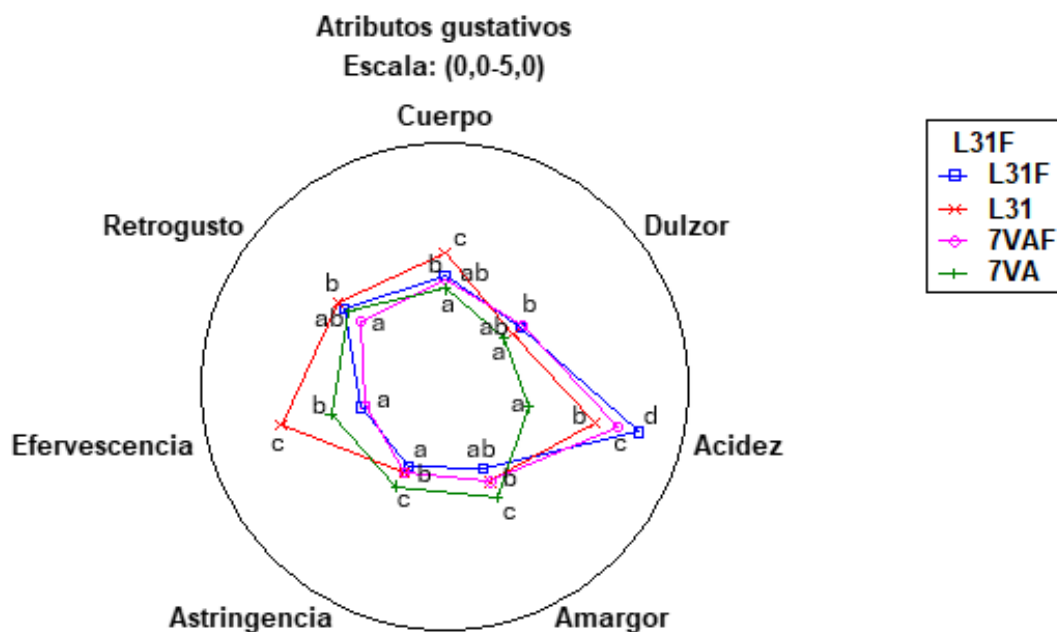


Figura 11. Gráfico de radar para el análisis sensorial de los parámetros gustativos.

Tabla 8. Resultados del análisis sensorial para los cuatro tipos de cerveza.

Medias	L31F	L31	7VAF	7VA
Color	4,8±0,42 ^c	1,6±0,52 ^a	3,9±0,32 ^b	1,3±0,48 ^a
Turbidez	3,3±0,95 ^c	2,8±1,03 ^{ab}	3±1,15 ^{bc}	2,6±1,26 ^a
Efervescencia	1,4±0,70 ^a	2,6±0,84 ^c	1,4±0,70 ^a	1,8±1,14 ^b
Consistencia espuma	0,9±0,57 ^a	3±0,82 ^c	1±0,47 ^a	1,6±0,97 ^b
Persistencia espuma	1±0,67 ^a	3,4±0,70 ^c	1±0,47 ^a	2,1±1,10 ^b
Color espuma	0,9±0,74 ^a	1,1±0,32 ^a	1±0,67 ^a	1,1±0,57 ^a
Intensidad aromática	2,7±0,95 ^a	3,3±0,67 ^{bc}	2,9±0,99 ^{ab}	3,8±0,92 ^c
Calidad aromática	2,9±1,10 ^b	3,9±0,57 ^d	2,2±1,14 ^a	3,5±1,08 ^c
Malta	1,8±0,79 ^a	3,1±1,20 ^b	1,6±0,70 ^a	3,5±0,85 ^b
Floral	2,1±1,10 ^{ab}	3±1,25 ^c	1,9±0,99 ^a	2,5±1,08 ^{bc}
Frutal	3,8±0,63 ^b	2,3±1,16 ^a	3,7±1,57 ^b	2,2±0,92 ^a
Oxidación-reducción	2,8±0,42 ^b	2,4±1,17 ^a	3,6±1,26 ^c	2,6±1,51 ^{ab}
Cuerpo	2,5±1,08 ^b	3±0,67 ^c	2,4±0,70 ^{ab}	2,2±0,92 ^a
Dulzor	2,1±1,29 ^b	1,9±0,99 ^{ab}	2,2±1,40 ^b	1,7±0,95 ^a
Acidez	4,4±0,70 ^d	3,4±0,70 ^b	3,9±1,29 ^c	1,9±0,74 ^a
Amargor	2±0,94 ^{ab}	2,3±0,82 ^b	2,3±1,34 ^b	2,7±0,95 ^c
Astringencia	1,9±0,88 ^a	2,1±0,88 ^b	2,1±0,74 ^b	2,4±1,17 ^c
Efervescencia	1,9±1,29 ^a	3,7±0,82 ^c	1,8±0,92 ^a	2,6±1,07 ^b
Retrogusto	2,8±1,48 ^{ab}	3±1,25 ^b	2,4±1,17 ^a	2,7±1,34 ^{ab}
Percepción global	2,3±1,06 ^a	3,5±0,53 ^b	2,3±0,82 ^a	3,3±1,16 ^b

*Los datos representan el valor promedio \pm desviación estándar (n=3). Los datos con diferentes letras dentro de cada fila son significativamente diferentes (P<0,05). L31F: *Lachancea thermotolerans* con fruta; L31: *Lachancea thermotolerans* sin fruta; 7VAF: *Saccharomyces cerevisiae* con fruta; 7VA: *Saccharomyces cerevisiae* sin fruta.

6.6 Correlación entre compuestos volátiles y análisis sensorial

En la Tabla 9 se muestra la correlación entre la concentración de volátiles obtenida por cromatografía de gases y el análisis sensorial evaluado en la cata. La relación estadística se ha calculado mediante el coeficiente de correlación de Pearson en el software Excel. Los valores iguales a cero significan que no hay relación entre las dos variables, los valores superiores a cero significan una correlación positiva entre variables y los valores menores que cero, negativa. Los parámetros marcados en color verde se consideran parámetros directamente relacionados, y los marcados en rojo se consideran parámetros inversamente relacionados.

En cuanto a la intensidad aromática, se han obtenido correlaciones positivas con los siguientes compuestos: diacetilo, ácido acético, acetato de isobutilo y 2-3butanodiol. Estos compuestos aportan aromas como mantequilla, plátano, dulce, fruta por lo que tiene sentido que estén altamente relacionados con la intensidad aromática de la cerveza. En cuanto a la calidad aromática, presentó correlaciones positivas con los siguientes compuestos: acetaldehído, 1-propanol, diacetilo, ácido acético, acetoína, acetato de isobutilo y 2-3butanodiol. El aroma a malta se vio relacionado directamente con compuestos como: diacetilo, ácido acético, acetoína, acetato de isobutilo y 2-3butanodiol. El atributo de aroma floral está directamente relacionado con algunos compuestos lógicos por su aporte de aromas florales y herbáceos como acetaldehído, acetato de etilo, acetoína o acetato de isobutilo, aunque también presenta relación directa con otros compuestos como 1-propanol, diacetilo, isobutanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, y 2-3butanodiol los cuales aportan aromas de alcohol o frutales. En cuanto al atributo frutal, está directamente relacionado con el metanol e indirectamente relacionado con: 1-propanol, diacetilo, ácido acético, acetato de isobutilo y 2-3butanodiol. Estos datos no presentan mucha lógica en cuanto a los aromas asociados a cada compuesto, ya que el

aroma frutal debería correlacionarse con acetoína, 3-metil-1-butanol, 2-metil-2-butanol, y acetato de isoamilo, todos ellos relacionados con aromas afrutados.

Tabla 9. Correlaciones (Test de Pearson) entre el análisis de volátiles y el análisis sensorial.

	Intensidad aromática	Calidad aromática	Malta	Floral	Frutal
acetaldehído	0,219	0,771	0,491	0,901	-0,586
metanol	-0,968	-0,801	-0,986	-0,775	0,988
1-propanol	0,419	0,816	0,638	0,948	-0,736
diacetilo	0,736	0,944	0,912	0,816	-0,850
Acetato de etilo	0,019	0,656	0,310	0,801	-0,411
isobutanol	0,063	0,590	0,305	0,779	-0,433
Ácido acético	0,992	0,734	0,972	0,680	-0,955
1-butanol	-0,173	-0,241	-0,206	-0,511	0,382
acetoína	0,518	0,883	0,749	0,712	-0,657
3-metil-1-butanol	0,215	0,572	0,390	0,784	-0,534
2-metil-1-butanol	0,437	0,525	0,508	0,743	-0,657
acetato de isobutilo	0,769	0,908	0,918	0,762	-0,844
lactato de etilo	-0,059	0,264	0,102	-0,005	0,066
2-3 butanodiol	0,945	0,857	0,999	0,800	-0,983
acetato de isoamilo	-0,623	-0,567	-0,672	-0,313	0,524
hexanol	-0,355	0,266	-0,089	0,078	0,207
alcohol 2-feniletílico	0,031	0,471	0,227	0,696	-0,376
acetato 2-feniletilo	0,598	-0,133	0,309	-0,029	-0,378

Para ilustrar mejor los resultados, se realizaron análisis de componentes principales (ACP) tanto de los compuestos volátiles analizados como de los datos obtenidos del análisis sensorial para las distintas configuraciones de la cerveza.

En el primer PCA relacionado con los compuestos volátiles adquiridos en el GC-FID (Figura 12), los dos primeros componentes principales explicaban el 64,83% de la varianza, cubriendo el primer componente principal el 43,16% de los datos. Se obtuvieron siete grupos diferenciados de los cuales cuatro se situaron en la parte positiva del eje del componente 1 representando las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* sin fruta, las elaboradas con *L. thermotolerans* sin fruta y alguna muestra de las elaboradas con ambas levaduras y con fruta. Estas cervezas presentan mayor producción de acetaldehído, 1-propanol, diacetilo, acetato de etilo, acetoína, 2-metil-1-butanol, acetato de isobutilo, 2-3 butanodiol, hexanol y alcohol-2-feniletílico.

Los otros tres grupos se sitúan en la parte negativa del eje y representan dos muestras de la cerveza elaborada con *S. cerevisiae* con fruta y dos muestras de la cerveza elaborada con *L. thermotolerans* con fruta. Estas cervezas presentaron mayor producción de metanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol, acetato de isoamilo y acetato-2-feniletilo.

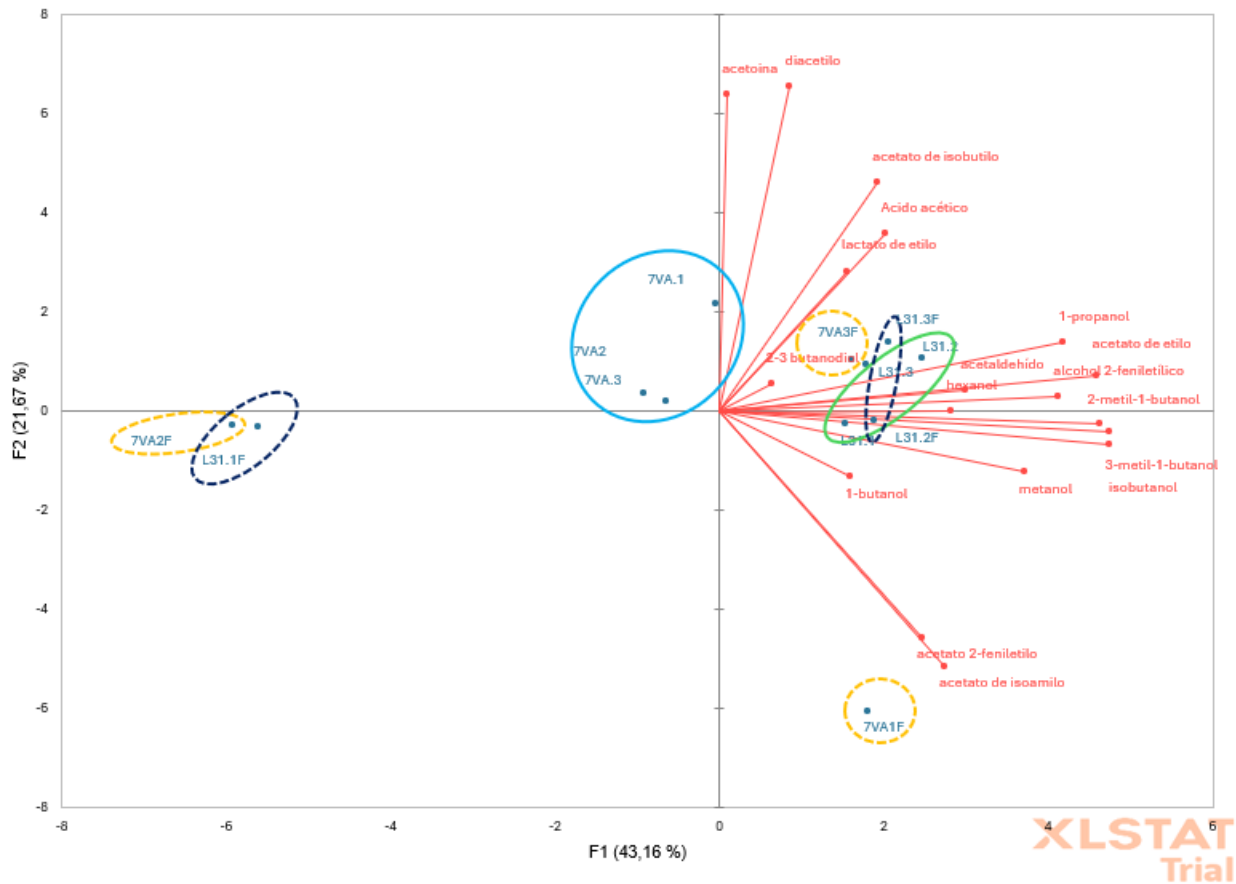


Figura 12. Análisis de componentes principales (ACP) de los compuestos volátiles en las cervezas por GC-FID

Por otro lado, en el segundo PCA relacionado con los datos obtenidos del análisis sensorial (Figura 13), los dos primeros componentes principales explicaban el 94,4% de la varianza, cubriendo el primer componente principal el 70,91% de los datos. Las cuatro configuraciones diferentes se situaron en los cuatro ejes distintos del gráfico. La cerveza elaborada con *L. thermotolerans* sin frutas (L31), situada en los ejes positivos de los componentes 1 y 2 está más relacionada con atributos como cuerpo, retrogusto, efervescencia, consistencia y persistencia de la espuma, calidad aromática, aroma floral y percepción global. La cerveza elaborada con *L. thermotolerans* con fruta (L31F), situada en el eje positivo del componente 1 y en el negativo del componente 2 está más relacionada con atributos como acidez, turbidez, dulzor, color y aroma frutal. Por otro lado, la cerveza elaborada con *S. cerevisiae* sin fruta (7VA), situada en el eje negativo del componente 1 y en el eje positivo del componente 2, se vio más relacionada con atributos como color de la espuma, intensidad aromática, aroma a malta, amargor y astringencia.

Por último, la cerveza elaborada con *S. cerevisiae* con fruta (7VAF), situada en ambos ejes negativos, se vio relacionada con el atributo de reducción.

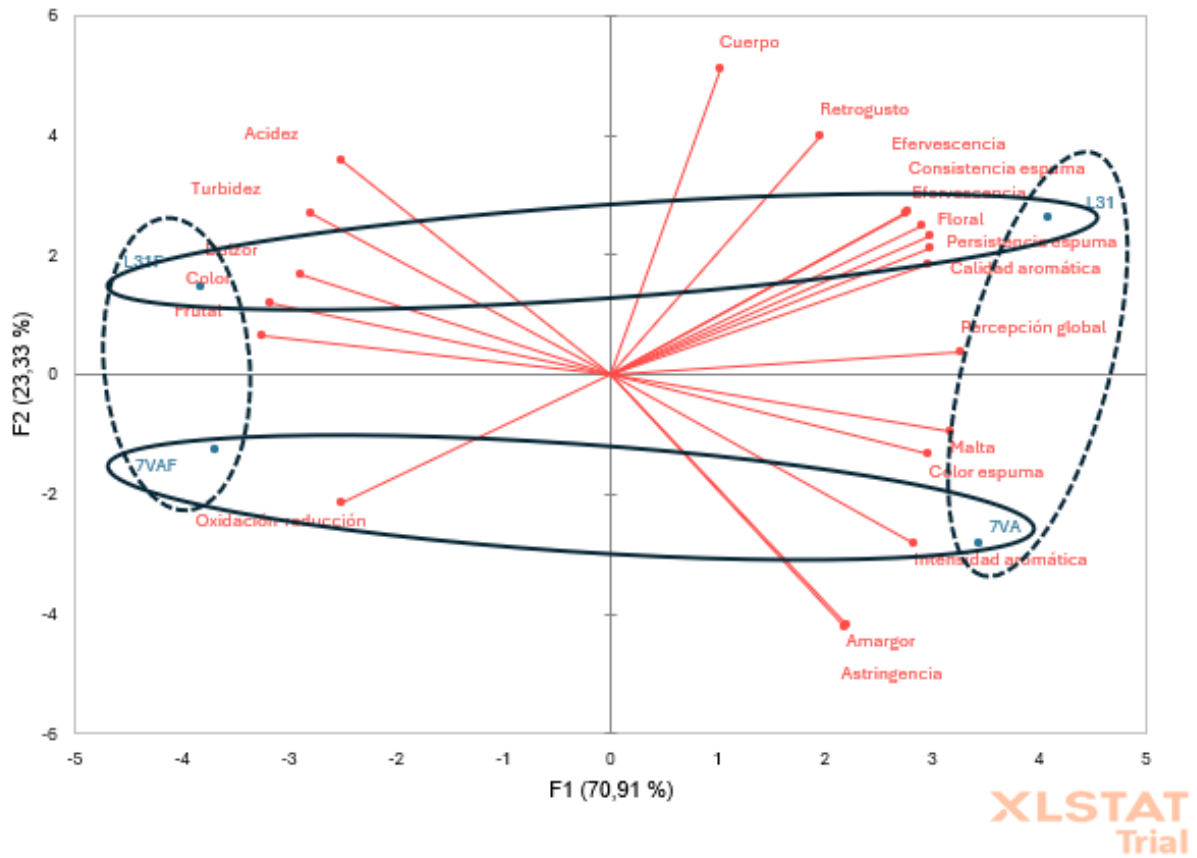


Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP) del análisis sensorial.

7. CONCLUSIONES Y PROSPECTIVA

Las cervezas elaboradas con *L. thermotolerans* destacaron por su pH más bajo debido a la producción de ácido láctico a partir de los azúcares del mosto. En lo referente al amargor, destacaron las cervezas elaboradas con *S. cerevisiae* siendo un 43,77% más amargas que las elaboradas con *L. thermotolerans*, posiblemente debido a la adherencia de los α -ácidos del lúpulo a las paredes celulares de estas levaduras. La graduación alcohólica no presentó diferencias significativas en relación con el tipo de levadura utilizado. En cuanto a los compuestos volátiles, las cervezas elaboradas con *Lachancea thermotolerans* destacaron por una mayor producción de hexanol, acetato de etilo y acetaldehído, compuestos relacionados con aromas herbáceos y afrutados, reforzando la hipótesis de que las cervezas elaboradas con *Lachancea* se asimilan a las cervezas tipo Lambic por la presencia de estos aromas afrutados. Las cervezas elaboradas con *Saccharomyces* destacaron por su mayor producción de acetato-2-feniletilo, relacionado con la calidad aromática. El análisis sensorial resaltó a las cervezas producidas con *L. Thermotolerans* como cervezas con más cuerpo y más acidez mientras que las producidas con *S. cerevisiae* se percibieron más amargas.

Las cervezas a las que se les añadieron frutos rojos presentaron menor amargor y un pH más ácido. En cuanto al contenido alcohólico, no hubo diferencias destacables relacionadas con la presencia o ausencia de frutos. En relación a los compuestos volátiles, las cervezas que tuvieron frutos rojos destacaron por su mayor contenido en metanol y en 1-propanol y su menor contenido en acetaldehído, acetato de isobutilo, diacetilo y acetoína. Por último, el análisis sensorial reveló una mayor puntuación en atributos como turbidez, aroma frutal, dulzor y acidez; para las cervezas elaboradas con frutos rojos. De igual forma, se percibió menor efervescencia, consistencia y persistencia en la espuma, intensidad y calidad aromática, aroma floral, amargor y menor retrogusto en este tipo de cervezas con fruta.

En general, el tipo levadura seleccionada tuvo una influencia cercana al 23% en los valores fisicoquímicos y sensoriales de la cerveza final, mientras que, la adición de frutas tuvo una influencia cercana al 71% en los valores sensoriales de la cerveza, presentándose así, como un factor importante a tener en cuenta en la elaboración de este tipo de cervezas. A pesar de que la percepción global fue superior en las cervezas sin frutos rojos, la adición de bayas puede ser un factor interesante para aportar valor y elaborar productos diferenciados y atractivos para un público más específico.

De cara al futuro, más investigaciones podrían enfocarse en las interacciones entre cepas de levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* en cultivos mixtos estudiando el impacto en los parámetros y perfiles sensoriales de las cervezas. También sería beneficioso evaluar diferentes variedades de frutos rojos y sus efectos tanto organolépticos como nutricionales en la cerveza, como por ejemplo el análisis de la capacidad antioxidante, contribuyendo al avance de la ciencia cervecera y a la diversificación del mercado.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Real Decreto 678/2016. 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. Boe. 2016;
2. Raihofer L, Zarnow M, Gastl M, Hutzler M. A short history of beer brewing. EMBO Rep. 2022;23(12).
3. Damerow P. Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient Mesopotamia. Cuneiform Digital Library Journal. 2012;2(January).
4. 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).
5. Callejo MJ, González C, Morata A. Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers. En: Brewing Technology. 2017.
6. Betancur MI, Motoki K, Spence C, Velasco C. Factors influencing the choice of beer: A review. Vol. 137, Food Research International. 2020.
7. Testa B, Coppola F, Letizia F, Albanese G, Karauli J, Ruci M, et al. Versatility of *Saccharomyces cerevisiae* 41CM in the Brewery Sector: Use as a Starter for “Ale” and “Lager” Craft Beer Production. Processes. 2022;10(12).
8. Capece A, Romaniello R, Siesto G, Romano P. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. Vol. 4, Fermentation. 2018.
9. Martens H, Dawoud E, Verachtert H. SYNTHESIS OF AROMA COMPOUNDS BY WORT ENTEROBACTERIA DURING THE FIRST STAGE OF LAMBIC FERMENTATION. Journal of the Institute of Brewing. 1992;98(5).
10. Salazar Tijerino MB, San Martín-González MF, Velasquez Domingo JA, Huang JY. Life Cycle Assessment of Craft Beer Brewing at Different Scales on a Unit Operation Basis. Sustainability (Switzerland). 2023;15(14).

11. Gómez-Corona C, Escalona-Buendía HB, García M, Chollet S, Valentin D. Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*. 2016;96.
12. Guido LF. *Brewing and craft beer*. Vol. 5, *Beverages*. 2019.
13. Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour JP, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, et al. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. Vol. 96, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003.
14. Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T, Vicente AA. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. Vol. 98, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014.
15. Bhonsale S, Mores W, Van Impe J. Dynamic optimisation of beer fermentation under parametric uncertainty. *Fermentation*. 2021;7(4).
16. Rodman AD, Gerogiorgis DI. Multi-objective process optimisation of beer fermentation via dynamic simulation. *Food and Bioproducts Processing*. 2016;100.
17. Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R. *Brewing: Science and Practice*. *Brewing: Science and Practice*. 2004.
18. Meußdoerffer F, Zarnkow M. *Das Bier*. *Das Bier*. 2014.
19. Bokulich NA, Bamforth CW. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013;77(2).
20. Steensels J, Verstrepen KJ. Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. Vol. 68, *Annual Review of Microbiology*. 2014.
21. Michel M, Meier-Dörnberg T, Jacob F, Methner FJ, Wagner RS, Hutzler M. Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. Vol. 122, *Journal of the Institute of Brewing*. 2016.
22. Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, Derdelinckx G. The chemistry of beer aging - A critical review. Vol. 95, *Food Chemistry*. 2006.

23. Domizio P, House JF, Joseph CML, Bisson LF, Bamforth CW. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2016;122(4).
24. Hranilovic A, Gambetta JM, Schmidtke L, Boss PK, Grbin PR, Masneuf-Pomarede I, et al. Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. *Sci Rep*. 2018;8(1).
25. Porter TJ, Divol B, Setati ME. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. Vol. 119, *Food Research International*. 2019.
26. Hill AE. Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. En: *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. 2015.
27. Tonsmeire M. American Sour Beers Innovative Techniques for Mixed Fermentations – Michael Tonsmeire. Vol. 3, Paper Knowledge . *Toward a Media History of Documents*. 2014.
28. 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.
29. Nunes Filho RC, Galvan D, Effting L, Terhaag MM, Yamashita F, Benassi M de T, et al. Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: A simplex-centroid mixture design approach. *Food Chem*. 2021;365.
30. da Cunha AC, Sautter CK, Ballus CA, Lopes ND, Barcia MT. Production and characterization of craft beers with different additions of native fruits and agro-industrial residues: a review. *Ciencia Rural*. 2023;53(9).
31. Nedyalkov P, Bakardzhiyski I, Shikov V, Kaneva M, Shopska V. Possibilities for Utilization of Cherry Products (Juice and Pomace) in Beer Production. *Beverages*. 2023;9(4).

32. Jagiełło K, Ludwig W. Towards computational fluid dynamics applications in brewing process. Vol. 250, European Food Research and Technology. 2024.
33. Kunze W. Technology brewing and malting. VLB Berlin. 2004;
34. JA Boto-Fidalgo, M Boto-Ordoñez. La cerveza: Ciencia, tecnología, ingeniería, producción, valoración. Universidad de León; 2017.
35. Jonatan Cristian Mendoza Marín. MEJORAS AL PROCESO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA PARA INCREMENTAR LA COMPETITIVIDAD DE LA EMPRESA”. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. 2016;
36. Viader RP, Yde MSH, Hartvig JW, Pagenstecher M, Carlsen JB, Christensen TB, et al. Optimization of beer brewing by monitoring α -amylase and β -amylase activities during mashing. Beverages. 2021;7(1).
37. Mosher M, Trantham K. Lautering and Sparging. En: Brewing Science: A Multidisciplinary Approach. 2021.
38. Morata A, Loira I, Tesfaye W, Bañuelos MA, González C, Suárez Lepe JA. *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. Vol. 4, Fermentation. 2018.
39. Fu X, Guo L, Li Y, Chen X, Song Y, Li S. Transcriptional Analysis of Mixed-Culture Fermentation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* for Natural Fruity Sour Beer. Fermentation. 1 de abril de 2024;10(4).
40. Postigo V, García M, Cabellos JM, Arroyo T. Wine *saccharomyces* yeasts for beer fermentation. Fermentation. 2021;7(4).
41. 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).

42. Rinaldi BJD, Montanher PF, Johann G. Brewing of craft beer enriched with freeze-dried cape gooseberry: A promising source of antioxidants. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2022;25.
43. Polshin E, Rudnitskaya A, Kirsanov D, Legin A, Saison D, Delvaux F, et al. Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer. *Talanta*. 2010;81(1-2).
44. Callejo MJ, García Navas JJ, Alba R, Escott C, Loira I, González MC, et al. Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*. 2019;245(6).
45. Postigo V, Esteban S, Arroyo T. *Lachancea thermotolerans*, an Innovative Alternative for Sour Beer Production. *Beverages*. 2023;9(1).
46. Kobayashi M, Shimizu H, Shioya S. Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation. *J Biosci Bioeng*. 1 de octubre de 2008;106(4):317-23.
47. 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).
48. Pavslar A, Buiatti S. Lager Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*. 1 de enero de 2009;31-43.
49. Xu Y, Wang D, Li H, Hao JQ, Jiang W, Liu Z, et al. Flavor contribution of esters in lager beers and an analysis of their flavor thresholds. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2017;75(3).
50. 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).

9. ANEXOS

9.1 Corrección del efecto de la temperatura sobre el grado alcohólico medido por ebullición y densimetría (OIV)

TABLE II (continued)
International alcoholic strength at 20°C

Table of Corrections to be applied to the apparent alcoholic strength to correct for the effect of temperature
Add or subtract from the apparent alcoholic strength at $t^{\circ}\text{C}$ (ordinary glass alcohol meter) the correction indicated below

		Apparent alcoholic strength at $t^{\circ}\text{C}$																	
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
Temperatures	To subtract	21°	0.23	0.25	0.26	0.28	0.29	0.30	0.31	0.33	0.34	0.35	0.35	0.37	0.38	0.38	0.39	0.39	0.40
		22°	0.47	0.49	0.52	0.55	0.57	0.60	0.62	0.65	0.67	0.70	0.72	0.74	0.75	0.76	0.78	0.79	0.80
		23°	0.70	0.74	0.78	0.82	0.86	0.90	0.93	0.97	1.01	1.04	1.07	1.10	1.12	1.15	1.17	1.18	1.19
		24°	0.94	0.99	1.04	1.10	1.15	1.20	1.25	1.29	1.34	1.39	1.43	1.46	1.50	1.53	1.55	1.57	1.59
		25°	1.19	1.25	1.31	1.37	1.43	1.49	1.56	1.62	1.68	1.73	1.78	1.83	1.87	1.90	1.94	1.97	1.99
		26°	1.43	1.50	1.57	1.65	1.73	1.80	1.87	1.94	2.01	2.07	2.13	2.19	2.24	2.28	2.32	2.35	2.38
		27°	1.68	1.76	1.84	1.93	2.01	2.10	2.18	2.26	2.34	2.41	2.48	2.55	2.61	2.66	2.70	2.74	2.77
		28°	1.93	2.02	2.11	2.21	2.31	2.40	2.49	2.58	2.67	2.76	2.83	2.90	2.98	3.03	3.08	3.13	3.17
		29°	2.19	2.29	2.39	2.50	2.60	2.70	2.81	2.91	3.00	3.09	3.18	3.26	3.34	3.40	3.46	3.51	3.55
		30°	2.45	2.56	2.67	2.78	2.90	3.01	3.12	3.23	3.34	3.44	3.53	3.62	3.70	3.77	3.84	3.90	3.95
	To add	31°	2.71	2.83	2.94	3.07	3.19	3.31	3.43	3.55	3.67	3.78	3.88	3.98	4.07	4.15	4.22	4.28	4.33
		32°	2.97	3.09	3.22	3.36	3.49	3.62	3.74	3.87	4.00	4.11	4.22	4.33	4.43	4.51	4.59	4.66	4.72
		33°	3.24	3.37	3.51	3.65	3.79	3.92	4.06	4.20	4.33	4.45	4.57	4.68	4.79	4.88	4.97	5.04	5.10
		34°	3.51	3.65	3.79	3.94	4.09	4.23	4.37	4.52	4.66	4.79	4.91	5.03	5.15	5.25	5.34	5.42	5.49
		35°	3.78	3.93	4.08	4.23	4.38	4.53	4.69	4.84	4.98	5.12	5.26	5.38	5.50	5.61	5.71	5.80	5.87
		36°	4.05	4.21	4.37	4.52	4.68	4.84	5.00	5.16	5.31	5.46	5.60	5.73	5.86	5.97	6.08	6.17	6.25
		37°	4.33	4.49	4.65	4.82	4.98	5.15	5.31	5.48	5.64	5.80	5.95	6.09	6.22	6.33	6.44	6.54	6.63
		38°	4.61	4.77	4.94	5.12	5.29	5.46	5.63	5.80	5.97	6.13	6.29	6.43	6.57	6.69	6.81	6.92	7.01
		39°	4.90	5.06	5.23	5.41	5.59	5.77	5.94	6.12	6.30	6.47	6.63	6.78	6.93	7.06	7.18	7.29	7.39
		40°	5.19	5.36	5.53	5.71	5.90	6.08	6.26	6.44	6.62	6.80	6.97	7.13	7.28	7.41	7.54	7.66	7.76

9.2 Hoja de cata para el análisis sensorial

Fecha: 10/05/2024													
Participante:													
Muestra:													
Atributos		1	2	3	4	5	Muestra:						
Atributos		1	2	3	4	5	Atributos		1	2	3	4	5
Visual	Color cerveza						Color cerveza						
	Turbidez						Turbidez						
	Efervescencia						Efervescencia						
	Consistencia espuma						Consistencia espuma						
	Persistencia espuma						Persistencia espuma						
	Color espuma						Color espuma						
Olfativa	Intensidad aromática						Intensidad aromática						
	Calidad aromática						Calidad aromática						
	Malta						Malta						
	Floral						Floral						
	Frutal						Afrutado						
	Oxidación-Reducción						Oxidación-Reducción						
Gusto	Cuerpo						Cuerpo						
	Dulzor						Dulzor						
	Acidez						Acidez						
	Amargor						Amargor						
	Astringencia						Astringencia						
	Efervescencia						Efervescencia						
Retrogusto							Retrogusto						
Percepción global							Percepción global						

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

OBSERVACIONES: