



Master Universitario
Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud



Departamento de Química y Tecnología de los alimentos.

TRABAJO FIN DE MASTER

**Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la
calidad de la cerveza en la refermentación en
botella y la influencia del tiempo de maduración.**

Autor: Enrique Arévalo Fernández

Fecha: 5/07/2018

Tutores: María Jesús Callejo y Antonio Morata



Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

ÍNDICE:

AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN:	9
Cervecería artesanal: un segmento en auge.....	9
Diferencias entre Cerveza industrial y artesanal.....	13
Ingredientes.....	13
Proceso de elaboración.	19
Tipos de cervezas y sus particulares características.....	21
Papel de las Levaduras <i>no-Saccharomyces</i> en la elaboración de cerveza.....	23
Características y principales usos.	23
La importancia de la “guarda” en botella.....	29
Objetivos del estudio.....	31
Objetivos concretos.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS:.....	32
Materiales:.....	32
Proceso de elaboración de la cerveza:	34
Ensayos previos y puesta a punto del protocolo.....	38
Ensayos definitivos.	39
Análisis instrumental:	46
Determinación del pH, densidad y temperatura.....	46
Determinación del grado alcohólico.	47
Determinación de los principales volátiles y productos metabólicos de las levaduras por GC-FID.....	48



Análisis sensorial.....	49
Análisis estadístico.....	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	52
Resultados instrumentales:.....	54
A las 4 semanas de maduración o guarda.....	55
A las 9 semanas de maduración o guarda.....	60
Resultados Sensoriales.....	63
A las 4 semanas de maduración o guarda.....	64
A las 9 semanas de maduración o guarda.....	68
Correlación entre los resultados obtenidos del análisis instrumental y sensorial.....	71
Influencia del tiempo de maduración en botella.....	74
CONCLUSIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	79
ANEXOS:.....	85

AGRADECIMIENTOS

A pesar de albergar dudas en la decisión de prolongar mis estudios un año más en Madrid, realizando el máster SALINA en la misma Universidad Politécnica donde apenas hace menos de 10 meses me graduaba del Grado en Ingeniería Alimentaria, el tiempo ha acabado por demostrarme que fue una decisión correcta. No solo por todo los conocimientos y aprendizajes que me llevo a nivel de asignaturas y materias, sino por como he crecido y madurado como persona dentro de un gran equipo de trabajo, como es el que componen las personas del departamento de Química y Tecnología de los alimentos. Laboratorio, que me abrió sus puertas hace 6 meses y en el cual he vivido una de las experiencias más bonitas, aunque a la vez una de las más duras de mi vida. Todo empezó con la posibilidad de pedir una beca de colaboración, idea que no me había planteado hasta que Antonio Morata me comentó acerca de ella, y por ello siempre se lo agradeceré. Una vez aceptada, comenzó mi andadura en el mundo de la cerveza, y vaya mundo, cuando más te vas introduciendo en el más complejo y fascinante se vuelve, sin duda alguna ha sido un tema perfecto para seguir perfilando y completando mis conocimientos profesionales. Agradecer también la paciencia y disposición de María Jesús Callejo, una profesora y tutora excepcionales, que ha sabido entender mi forma de estudio/trabajar y me ha ayudado siempre que lo he necesitado. Hacer mención a los diferentes profesores y profesoras (Felipe, Carmen, Karen, Isabel, Fernando...) que han participado en las 3 catas realizadas en este estudio, gracias a sus comentarios y a su interés. También agradecer al catedrático del departamento, J.A. Suarez-Lepe, por estar siempre ilustrándonos con su sabiduría. Así mismo, agradecer a todos los departamentos y profesores que han participado de alguna de las maneras en este estudio, sentirlos participes. A los técnicos Paco y Juan por estar siempre preparados para ayudarnos. Y, como no, agradecer también a todos los compañeros y compañeras del máster que me han querido desde un principio, a pesar de tener que escucharme hablar durante todo el día sobre cerveza, lo que ha permitido que el curso haya sido mucho más llevadero.

Quería hacer una mención aparte, para las personas con las que he estado más en el día a día, compartiendo risas, tensiones, problemas y demás banalidades de la vida. Momentos únicos, sin los cuales no hubiera sido ni la mitad de divertido. Gracias a Wendu por sus siempre amistosas charlas de fútbol, aunque seamos de otros equipos y por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Gracias a Cristian, el sheriff del laboratorio, que haríamos sin ti, echaré de

menos nuestras conversaciones. Gracias a Juanma, por abrirme las puertas de su despacho siempre que he tenido cualquier duda a consultar. Enhorabuena a la mamá Iris, que mientras ha estado en activo siempre me ha ayudado y escuchado. Por último y no menos importante a Carlos, mi hermano mayor del laboratorio, el que me ha ofrecido siempre su mano cuando más la he necesitado, gracias de verdad.

Para finalizar este apartado de agradecimientos, no puedo olvidar a mi familia, a pesar de tenerla lejos, siempre la siento cerca. Gracias a ellos, por ellos, este trabajo ha podido llegar a buen puerto. Gracias papá, por darme la oportunidad de seguir aumentando mis conocimientos, y estar siempre ahí. Gracias mamá por ser la voz de la experiencia y saber que decirme en todo momento. Mención especial a mi compañera de vida, la persona que desde hace 3 años y medio llena mis días. Sin ella este trabajo sí que no hubiese sido posible, siempre eres mi apoyo y mi inspiración. Gracias de corazón, Patricia.

RESUMEN

El gran desarrollo y crecimiento experimentado por el segmento de las cervezas artesanales en los últimos años junto a la creciente demanda por parte de los consumidores de un producto único, con una calidad y complejidad sensorial mayores, ha abierto una nueva línea de investigación. Hasta ahora, la levadura utilizada de forma genérica en la producción de cerveza ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, pero ante esta situación nueva, los investigadores proponen la posibilidad de utilizar levaduras del género *no-Saccharomyces*, principalmente, debido a sus aportaciones de compuestos metabólicos que participan de forma positiva en la calidad sensorial. El género *no-Saccharomyces* ha sido muy investigado y utilizado en el sector del vino desde hace años, sin embargo, en cerveza aún no está muy trabajado. Por ello el presente estudio, pretende evaluar la influencia de 4 cepas de especies de levadura *no-Saccharomyces*, frente a una cepa de *S. cerevisiae*, en la calidad final de la cerveza. Se partió de una misma cerveza verde, elaborada con una cepa industrial de *S. cerevisiae*, para posteriormente introducir las cepas elegidas en este estudio, en la etapa de refermentación en botella y maduración. Los géneros y especies utilizadas fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Squizosaccharomyces pombe*, *Lachancea thermotolerans* y *Torulaspora delbrueckii*. Para determinar su influencia en la calidad de las cervezas finales, han sido analizadas tanto instrumentalmente como sensorialmente. En comparación con la cepa control de *S. cerevisiae*, todas las levaduras mostraron diferencias en la calidad final de la cerveza. *S. pombe* fue la que más destacó por su capacidad fermentativa, su consistencia en espuma, su cuerpo y su complejidad en boca.

Además, se estudió la influencia del tiempo de maduración, a través de la comparación de dos análisis a tiempos diferentes, 4 y 9 semanas.

ABSTRACT

The great development and growth experienced by the craftbeer segment in recent years along with the growing demand by consumers of a single product, with a higher quality and sensory complexity, it has opened a new line of research. So far, the yeast generally used in the production of beer has been *Saccharomyces cerevisiae*, but at this new situation, the researchers suggest the possibility of using non-*Saccharomyces* yeast, mainly, due to their contributions of metabolic compounds involved positively in sensorial quality. The genus non-*Saccharomyces* has been highly researched and used in the wine sector for years, however, in beer it is not very elaborated yet. Therefore this study aims to evaluate the influence of 4 strains of yeast species non-*Saccharomyces* against a strain of *Saccharomyces cerevisiae*, in the ending quality of the beer. It split of a same green beer, elaborated with an industrial strain of *S. cerevisiae*, and after that, introduce the strains chosen in this study, the bottle re-fermentation and maturation stage. The genera and species used were: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Squizosaccharomyces pombe*, *Lachancea thermotolerans* y *Torulaspota delbrueckii*. To determine their influence on the quality of the final beer, they have been analyzed either instrumentally and sensually. Compared with the control of *S. cerevisiae* strain, all yeast showed differences in the final quality of the beer. *S. pombe* was the one that distinguished the most for its fermentation capacity, consistency in foam, its body and its palate complexity. In addition, it has also been studied the influence of the time of maturation, through the comparison of 2 analyses at different times, 4 and 9 weeks.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Cervecería artesanal: un segmento en auge.

El siglo XX nos ha mostrado la expansión de la industria cervecera, la consolidación de las grandes multinacionales y la homogenización de los tipos de cerveza. Sin embargo, el siglo XXI está marcado por la aparición y el crecimiento de un segmento cervecero, la cerveza artesanal (“Craft beer” en inglés) también conocida como microcervecería, cervecería especial o cervecería de local. (Callejo et al., 2017; Berning & McCullough, 2017).

Ante la ausencia de una definición oficial y concreta del término “cerveza artesanal”, se creó la GACBB (Global Association of Craft Beer Brewers), que se ha convertido en la primera organización internacional dirigida a prestar voz a los cerveceros artesanales y que están de acuerdo en que los principios más importantes en la definición de “artesanal” son que la cerveza artesanal es “pequeña” en referencia a la cantidad de producción anual (puede variar según el país), “tradicional” debido al uso de materias primas de calidad y procesado con carácter manual y por último “independiente” que no haya una gran empresa detrás. (Albán Cabaco et al., 2015).

Para Berning & McCullough, 2017, tres son los factores más significativos para el auge de este segmento:

- La demanda creciente de una gama más amplia de estilos de cerveza (frente a la homogenización que la industria de la cerveza había impuesto en el siglo anterior).
- Aumento significativo en el nº de consumidores de cerveza (máximo crecimiento una vez superada la crisis de 2008).
- La organización de consumidores en asociaciones ha ayudado a la experimentación y la información de diseminación sobre cervezas diferentes.

La revolución de la cerveza artesanal, fue precedida por un periodo de consolidación y homogenización de la industria cervecera a nivel mundial. Debido principalmente a la aparición de la ingeniería del frío, que permitió la mejora del proceso y la elaboración de cervezas tipo “Lager”. El número de industrias cerveceras se redujo fuertemente durante los años 90 del pasado siglo, debido principalmente al crecimiento de las grandes multinacionales cerveceras (que bien compraban las otras industrias o las sacaba de mercado por sus precios tan competitivos teniendo que cerrar posteriormente). Por ejemplo, en Bélgica, se pasó de 3000 industrias a solo 143 entre los años 1900-1980 o en Estados Unidos, de 421 en 1947 a 10 en

2014. Esto propició una homogenización del sector, con el fin de buscar el máximo número de consumidores y la máxima producción sin innovación ni variedad. (Tremblay, 2005; Swinnen, 2011; Berning & McCullough, 2017).

El inicio en la producción de las cervezas artesanales se atribuye a Reino Unido, alrededor de los años 1970 coincidiendo con el lanzamiento de la CAMRA (Campaign for Real Ale). Algo parecido ocurrió en Bélgica y Alemania (aunque debido a su tradición cervecera es más difícil especificar la fecha de creación de este segmento). En cuanto a Estados Unidos, aunque en un primer momento se fijó en Europa para iniciar su propia revolución, ha sabido generar un modelo de cervecería que le ha llevado a ser el máximo productor mundial y el máximo exportador de cerveza artesanal. Ahora es Europa la que se fija en Estados Unidos, muchos países siguen su modelo como indica que el 52% de las exportaciones de Estados Unidos recalen en Europa. (Albán Cabaco et al., 2015)

El comienzo y auge de la cerveza artesanal no ha sido idéntico en todos los países del mundo. Este crecimiento desigual queda perfectamente reflejado en la **Tabla 1**, los datos se obtienen de Garavaglia & Swinnen, 2017.

Tabla 1: Número de microcervecerías 1985-2015.

Pais	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015
Australia	3	34	26	43	93	172	358
China						20	46
Alemania	632	639	759	844	894	987	1058
Japón		1	7	61	129	313	669
Polonia						20	100
España		1				46	409
Estados Unidos	37	249	998	1469	1591	1756	3490
Eslovaquia						14	45

Se extraen dos conclusiones claras, la primera que Estados Unidos es el país que mayor crecimiento ha presentado en el segmento de las cervezas artesanales (Elzinga & Tremblay, 2015) y que son en los 10 últimos años aproximadamente donde mayor crecimiento se observa en los diferentes países. (The brewers of Europe, 2017).

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

A nivel europeo, y enfocando el punto de mira en los últimos 6 años, donde el crecimiento del segmento, como ya se ha comentado, ha sido totalmente exponencial, se presenta la **Tabla 2**, enfrentando los principales países productores con la evolución del número de microcervecerías en activo, también se añaden datos de Estados Unidos debido a su importancia en el mercado. Datos obtenidos de **The brewers of Europe, 2017** y de **GACBB, 2018**.

Tabla 2: Evolución del número de microcervecerías (2010-2016)

Pais	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Crecimiento (2010-2016)
Austria	101	97	92	109	109	114	123	22,78%
Republica Checa	65	90	200	207	238	202	350	538,17%
Alemania	646	659	666	673	682	723	738	14,24%
Francia	322	373	433	504	566	690	850	263,97%
Italia	294	336	407	491	505	540	718	244,21%
España	46	70	114	203	314	409	465	1010,86%
Reino Unido	778	898	1252	1442	1648	1828	2198	282,51%
Estados Unidos	1756	2.145	2.401	2.863	3.276	3490	3,812	217,08%
Suecia	280	313	328	363	440	573	703	251,07%

Como ya se ha comentado Estados Unidos es el país con mayor número de microcervecerías, seguido por Reino Unido (donde se inició el término de “microbrewery”, **Berning & McCullough, 2017**). En Alemania el crecimiento es muy liviano debido a su larga tradición histórica. El país que mayor crecimiento ha experimentado es España, superando 1000% en los últimos 6 años.

Los crecimientos en casi todos los países son bastante amplios 200-500% lo que refuerza la idea de que este segmento está en un auge constante en los últimos años (**Callejo et al., 2017**).

A nivel nacional y debido a su creciente importancia (como se ha visto en la tabla anterior), la normativa se ha visto modificada, y **el Real Decreto 53/1995 de 20 de enero**, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y de la malta líquida., quedó derogado por **el Real decreto 678/2016, de 16 de diciembre**, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. Estableciendo una referencia a la elaboración artesanal sin ser una definición concreta y oficial:

“la cerveza artesana es la que prioriza el uso de materias primas de buena calidad, normalmente producidas mediante un proceso que se desarrolle de forma completa en la misma instalación y en el que la intervención personal constituye el factor predominante, bajo la dirección de un maestro cervecero o artesano con experiencia demostrable y primando en su fabricación el factor humano sobre el mecánico, obteniéndose un resultado final individualizado, que no se produzca en grandes series, siempre y cuando se cumpla la legislación que le sea aplicable en materia de artesanía”. **(Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre)**.

En el 2008, España solo contaba con 21 microcervecías, el momento que se vivía recién entrada la crisis, empezó a despertar en los emprendedores una necesidad de buscar una salida laboral. Por ello, elaborar cervezas artesanas, con una cantidad de inversión inicial baja, una producción manual, sin muchos conocimientos científicos..., se presentó como una alternativa sólida. En este marco se entiende el inicio y posterior explosión de un segmento cervecero que en apenas 10 años (2017), ya cuenta con 511 empresas registradas, lo que supone un crecimiento de casi 2.500% alcanzando datos de producción de 170.000 hL, con un crecimiento del 36% respecto al 2016. En cuanto al valor, se consiguieron 47 millones de euros con un crecimiento del 31%. Este crecimiento se prevé que se mantenga en un corto y medio plazo. (previsión del 30% en 2018). **(Finalcial Food, 2018)**

Esto ha generado la creación de un nuevo nicho de mercado que antes no existía en España, lo que no se puede explicar como en otros países, Reino Unido, Alemania... que poseen una tradición importante en la elaboración de cervezas artesanas, ya que en España esa tradición no existe, sino que es un país más identificado con la producción y consumo de vino **(Arce de mena, 2017)**. Por lo que, en nuestro caso, la explicación se puede atribuir a diversos factores, entre los que se encuentran la creciente variedad de estilos, los costes poco elevados de empezar el negocio artesanal en casa y, por último, el marketing utilizado por los productores para crear nuevas marcas y envases que pretenden diferenciar y acercar el producto al público objetivo. **(Albán Cabaco et al., 2015)**.

En cuanto al N.º de empresas por comunidad autónoma **(Figura 1)**, la que cuenta con un mayor N.º, casi 200 microcervecías dentro de su territorio, es Cataluña. Andalucía le sigue con casi 100. En el ecuador del ranking la Comunidad Valenciana y Castilla y León, con 71 y 65 fábricas, respectivamente. La Rioja con 5 y Ceuta con 1 son las comunidades con menor número. **(Albán Cabaco et al., 2015)**

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

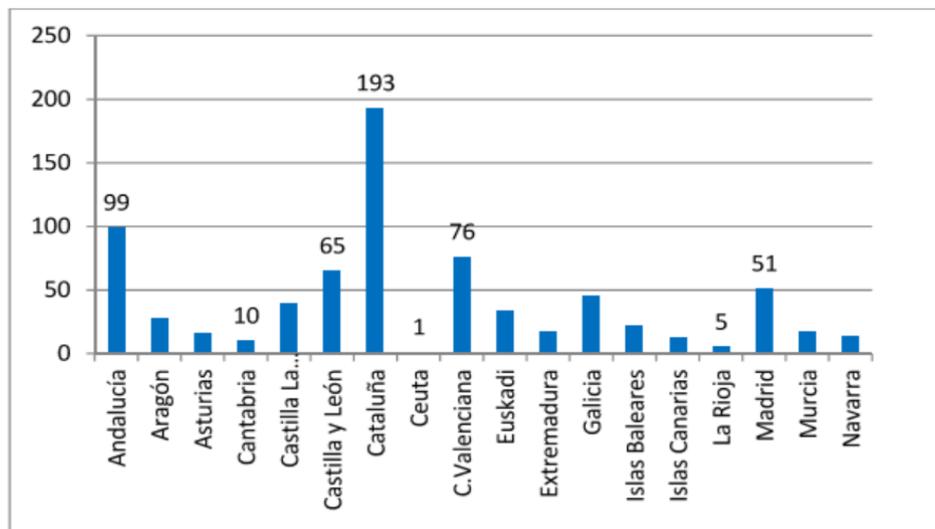


Figura 1: Número de empresas de cerveza artesana por comunidad autónoma (2015).

1.2. Diferencias entre Cerveza industrial y artesanal.

Las diferencias entre las cervezas producidas de forma industrial y artesanal se deben principalmente a dos motivos, la elección de los ingredientes y las etapas del proceso productivo.

1.2.1. Ingredientes.

Los 4 ingredientes esenciales en la cerveza son: agua, malta, lúpulo y levadura. (Briggs et al., 2004). Sin embargo, existe diferencia entre las materias primas utilizadas a nivel industrial y las materias primas utilizadas en la cerveza artesanal. La primera diferencia significativa es que, a nivel industrial, los ingredientes se eligen normalmente desde un punto de vista económico y de rentabilidad, de ahí la similitud entre las grandes industrias. Un ejemplo claro es la utilización de adjuntos o maltas de otros cereales más baratos que la cebada. En las cervezas artesanas el punto de vista está puesto en la calidad, lo que influye significativamente en la elección de ingredientes y por ende en la calidad final del producto. Otra de las diferencias destacadas entre la cerveza industrial y la artesanal, es que, en la primera, es frecuente el uso de conservantes, estabilizantes químicos y antioxidantes con el objetivo de alargar la vida útil, ingredientes que de ningún modo se añadirán en las cervezas artesanales. (Arce de mena, 2017).

Las características de los 4 ingredientes esenciales son comunes para ambos estilos de producción y se detallan a continuación:

- El Agua:

Es el principal ingrediente de la cerveza, constituyendo un 90-95% de la misma. (Sanchis et al., 2000; Sanchez, 2002; Palmer & Kaminski, 2013). La importancia del tipo de agua y sus principales características físico-químicas es un apartado decisivo que cualquier maestro cervecero debe conocer. El factor más apremiante y que hay que controlar en todo momento es el pH, ya que es clave en el proceso enzimático del macerado. El rango general debe estar entre 5,1-5,7, siendo el óptimo aproximadamente 5,2. Si el pH es excesivo fomenta la extracción de taninos (Huxley, 2011). El maestro cervecero debe elegir el tipo de agua y las modificaciones a realizar según el tipo de cerveza a elaborar, por ejemplo, la cerveza *pale ale* se elabora con agua rica en calcio, al contrario que la *pilsner* que lo hace con bajo contenido (Bamforth, 2007). En Kunze et al., 2004 se recogen los diferentes tratamientos que se le pueden realizar al agua para su uso en elaboración de cerveza.

Los parámetros fundamentales que se deben conocer del agua, según Huxley, 2011 y Strong, 2011, son los siguientes:

- Alcalinidad: Capacidad que posee el agua para soportar la acidificación. Se mide en contenido de bicarbonatos o en carbonatos. Se conocen como aguas duras las que poseen un contenido alto de estos compuestos.
- Dureza total: Es la suma de la dureza temporal y la permanente. Índica el tratamiento del agua más idóneo.
- Sales minerales: El calcio y magnesio pueden afectar al pH de la cerveza, ya que interaccionan con compuestos del mosto y precipitan. Es importante controlarlos, en particular el calcio, esencial para el crecimiento de las levaduras.
- Alcalinidad residual: Sirve para conocer el pH final del mosto.
- la concentración de cloro: Puede dificultar el proceso y frenar el crecimiento de las levaduras, se recomienda eliminarlo.

- Malta:

El grano utilizado para la elaboración de la malta puede ser cualquiera que tenga suficientes reservas de polisacáridos en su endospermo, aunque, el más utilizado es el de cebada. Esta decisión está justificada por dos motivos, el primero su gran contenido en polisacáridos en concreto almidón y en un segundo lugar, por presentar un grano vestido, es decir, que no se

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

separa tras la trilla y su cáscara o gluma continúa adherida al grano después del proceso de malteado. Esta última característica es repercute directamente en los procesos de maceración y filtrado mejorando los rendimientos. Otros granos que también pueden ser utilizados son: Trigo, arroz, centeno, sorgo, maíz ... (Hardwick, 2002; Briggs et al., 2004; Kunze et al., 2004; Mallet, 2014; Huxley, 2011).

El objetivo en el malteado es el de liberar los enzimas necesarios para la etapa posterior de macerado. Dicho proceso se resume en general las condiciones necesarias para que el grano germine y después ponerle fin con un golpe de calor (tostado). El control de la germinación, así como, del tiempo y la intensidad del tratamiento térmico proporcionarían diferentes maltas del mismo grano, generando distintas características en el producto final. Por ejemplo, utilizando las dos maltas de cebada, las cervezas tipo *Pilsen*, utilizan maltas claras, poco tostadas (es decir tiempos cortos de tratamiento térmico), con bajo contenido en polifenoles. Sin embargo, las cervezas tipo *Stout* utilizan maltas tostadas (Largos tiempos de tostado y mayor intensidad), con un gran poder ácido natural. (Palmer, 2006)

El maestro cervecero debe elegir cual es la malta que más le conviene según el tipo de cerveza a elaborar. Para ello debe conocer y controlar los parámetros básicos, que quedan descritos a continuación. Destacando que los (Briggs et al., 2004; Huxley, 2011; Strong, 2011):

- Contenido de humedad: No debe superar el 5%.
- Extracto potencial máximo: Se consideran valores superiores a 78% como aceptables.
- Diferencia entre extracto fino y grueso: es la relación fina (0,2 mm) y grueso (1 mm). Su valor indica el grado de modificación de la malta. Las maltas muy modificadas tienen una diferencia de 1, mientras que las que no han sido bien modificadas tienen un valor de 1,8-2.
- Cuantificación del color (EBC: Son las siglas de "European Brewery Convention" y es el sistema utilizado en Europa para definir el color de una sustancia.): El color de la cerveza proviene de compuestos denominados melanoidinas, formados durante el proceso de malteado y cocción del mosto. Parámetro clave a la hora de elaborar cervezas "tostadas" o "rubias".
- Poder diastático: Hace referencia a la capacidad enzimática que posee la malta para transformar el almidón en azúcares fermentables. Se basa en la medición de la cantidad de β -amilasa.

- Lúpulo:

El uso de lúpulo no se remonta a los inicios de la cerveza ya que antiguamente se utilizaban otro tipo de plantas, hierbas o incluso frutas para aromatizarla. Los orígenes de su utilización no están claros, pero la primera documentación que se encuentra en las escrituras sobre su uso, data del año 822 d.C., empleado por un abad en un monasterio del norte de Francia, el abad Adalhard. Su empleo genérico no se introdujo hasta el siglo XV. La demanda de los marineros y colonos de cerveza de calidad que llegase en buen estado hasta las colonias durante casi 3 meses que duraba el viaje, generó un movimiento de innovación por parte de los cerveceros británicos, que finalizó aumentando la cantidad de lúpulo y grado alcohólico para aumentar así las condiciones antibacterianas y que aguantase el viaje sin agriarse. De este proceso nacieron las cervezas tipo Indian Pale Ale (IPA). (Sanchis et al., 2000; Hardwick, 2002; Hieronymus, 2012; Steele, 2012).

El lúpulo se añade durante la etapa de cocción por sus propiedades bacteriostáticas, su carácter estabilizador de sabor y espuma y por aportar ese amargor tan característico de las cervezas. La planta del lúpulo es la *Humulus lupulus L.*, de la cual solo se utiliza las flores secas femeninas, ya que son las que contienen una gran cantidad de alfa-ácidos, compuestos resinosos responsables del amargor principalmente. Estos compuestos resinosos se disuelven durante la cocción, gracias a la acción del calor y se isomerizan en iso-alfa-ácidos. Dichos isómeros se pueden medir de forma específica y por cada mg/l que se obtenga eso equivale a un grado IBU (International Bittering Units), se conocen también como unidades de amargor. (Grant, 2002; Briggs et al., 2004; Palmer, 2006; Huxley, 2011; Hieronymus, 2012).

Otros compuestos del lúpulo que tienen su importancia en la elaboración de cerveza y en la calidad final del producto, son los aceites aromáticos, en los que se engloba gran cantidad de compuestos entre ellos aldehídos, ésteres, cetonas, fúseles, ácidos y terpenos entre otros. Son los que aportan ese aroma tan particular del lúpulo. Suelen actuar en sinergia y pueden ser modificados por las levaduras o el envejecimiento en botella. Por último, también cede taninos, estos son responsables del carácter antibacteriano, ya que dificulta el crecimiento de bacterias lácticas y acéticas. (Briggs et al., 2004; Palmer, 2006; Huxley, 2011).

El maestro cervecero deberá conocer y elegir el tipo de lúpulo según la cerveza final a elaborar. Además de los tiempos de adición del mismo en la etapa de cocción y de su cantidad, obtenida según el grado de amargor que se desee. (Huxley, 2011).

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- **Levadura:**

Hasta 1857, cuando Lois Pasteur no descubrió a las levaduras como responsables de la fermentación alcohólica, no se tenía constancia de la existencia de las levaduras. Es decir, las fermentaciones ocurrían de forma espontánea o bien mediante inóculos de otras cervezas ya terminadas (Sanchis et al.,2000; Hardwick, 2002). Fue entonces a partir del descubrimiento de las levaduras cuando los cerveceros pudieron controlar y mejorar el proceso de fermentación mejorando así la calidad final del producto. Aun así, hoy en día se siguen elaborando algunas cervezas de forma espontánea, por ejemplo, las cervezas estilo *Lambic*, que son cervezas elaboradas con levaduras y bacterias de origen natural que se encuentran en las barricas de roble donde se envejecen. (White & Zainasheff, 2010; Poelmans & Swinnen, 2011; Strong & England, 2015).

Las levaduras, según su definición son hongos normalmente unicelulares del reino eucariota, que se reproducen de forma vegetativa. Realizan la respiración aerobia, y la gran mayoría fermentan azúcares en condiciones anaerobias. La fermentación es la conversión de azúcares en alcohol y CO₂ y de subproductos o metabolitos e fermentación. Estos metabolitos pueden ser tanto intermedios como secundarios que se difunden en el medio. (Kurtzman & Fell, 1998; Briggs et al., 2004; Basso et al., 2016).

Los requerimientos de las levaduras una vez entran en contacto con el mosto son los siguientes (Sanchis et al., 2000; Hornsey, 2002; White & Zainasheff, 2010):

- Carbohidratos: Se encuentran en el mosto en gran cantidad y variedad. Maltosa, maltotriosa, glucosa, sacarosa, fructosa, en orden de mayor a menor % en un mosto tipo, son todos azúcares fermentables. Las dextrinas y carbohidratos más complejos son la parte no fermentable.
- Fuente de nitrógeno: Aminoácidos que se encuentran en el mosto.
- Oxígeno: Se debe introducir, normalmente en la etapa de enfriado. Debe controlarse para que no se añada en exceso, puesto que podría dar problemas de oxidación o de proliferación de microorganismos no deseados.

La levadura de fermentación más empleada en la elaboración de cerveza y en otros muchos alimentos y bebidas es el género *Saccharomyces*. Dentro de este género, y en cuanto a la elaboración de cerveza se refiere, se distinguen dos tipos: Las de tipo *Lager* y las de tipo *Ale*. Las diferencias básicas entre ellas son: La temperatura de crecimiento, metabolización de

meliobiosa, características de floculación, tipo de fermentación... (Hebly et al., 2015; Kopecká et al., 2016). Para reflejar mejor las diferencias entre los 2 tipos, se resumen sus principales características en la **Tabla 3**. Los datos se obtienen de **Petruzii et al., 2015**:

Tabla 3: Características generales de levaduras tipo Lager y Ale

Características	Cepa Lager	Cepa Ale
Tipo de fermentación	Baja	Alta
Floculación	Muy buena	Pobre
Temperatura de fermentación (°C)	4- 15	20- 25
Máxima temperatura de crecimiento	32	37
Utilización maltotriosa	Más compleja	Menos eficiente
Utilización de melobiosa	Si	No
Compuestos volátiles Sulfurosos	Significantes	Bajos
Transportador de fructosa	Sintetizador activo de protones	Difusión facilitada
Esporulación (%)	No	1-10
Perdida de viabilidad en secado	Significante	Bajo

Fuente: Elaboración propia.

- *Lager: Saccharomyces pastorianus*, produce una fermentación llamada baja fermentación, debido a que las células de levaduras se concentran en la parte baja del fermentador, tienen una gran capacidad de flocular, y además necesitan temperaturas entre 6 y 12°C. Las cervezas tipo Lager tienen la peculiaridad de conferir un sabor limpio, asociado a niveles más bajos de alcoholes aromáticos y ésteres. (Gibson et al., 2013; Kopecká et al., 2016).
- *Ale: Saccharomyces cerevisiae*, la fermentación llevada a cabo por esta especie se conoce como alta fermentación, no sólo precisa mayores temperaturas de fermentación, entre 18-22°C, sino que también hay un cambio en la distribución de las células en el mosto a fermentar, se concentran en la parte superior. El metabolismo secundario de estas levaduras, produce niveles de compuestos mayores que las anteriores, como acetato de isoamilo (descriptor del plátano), acetato de etilo (aroma a disolvente), acetato 2-feniletilo (descriptor de rosas, miel), hexanoato de etilo (semillas

de anís, manzana), octanoato de etilo y caproato (manzana amarga). (Basařová & Pivovarství, 2010)

1.2.2. Proceso de elaboración.

Las diferencias entre cerveza industrial y artesanal, además de las ya descritas en cuanto a la elección de materias primas y uso o no uso de adjuntos, residen en el proceso productivo (Arce de mena, 2017). Lo primero a tener en cuenta es el volumen de producción, en una cerveza industrial los volúmenes son muy altos, por ejemplo, Heineken España produjo 10 millones de hL en el 2011, y la idea de rentabilidad en cada etapa del proceso es clave para elaborar una cerveza de bajo coste, además de la especialización de los equipos y su dimensionamiento particular. Sin embargo, en el caso de la cerveza artesanal, los volúmenes son infinitamente más bajos, menos de 17.550 HI, los equipos en sus inicios no eran equipos diseñados para la elaboración de cerveza, sino equipos adaptados y comprados de segunda mano, con sus consiguientes pérdidas de rendimientos. Pero en la actualidad y debido a la expansión del sector ya se encuentran empresas que diseñan y venden equipos específicos para microcervecías. (Thompson et al., 2002).

De igual modo, esta falta de equipos y automatización, aumentan la demanda de mano de obra en todo el proceso con su derivado aumento en los costes. Estas diferencias se ven salvadas debido al alto precio de venta de las cervezas artesanales frente al precio de venta de las industriales. En cuanto a las etapas de producción también se encuentran diferencias significativas, en el caso artesanal no se realizan las etapas de filtrado estéril ni pasteurización ni la adición de coadyuvantes y enzimas industriales. Ambas etapas buscan reducir las posibles contaminaciones y conseguir un producto más estable y homogéneo. El proceso de filtrado incluso en la mayoría de cervezas artesanales se hace de manera manual, ya que es el maestro cervecero el que realiza casi el total de las operaciones. Otra de las etapas en donde se encuentran diferencias es la de la carbonatación, en las cervezas artesanas se suele utilizar la refermentación en botella añadiendo algún producto fermentable, sin embargo, en la industrial se utiliza la carbonatación artificial en el embotellado. La refermentación además ofrece otras variables como la utilización de cepas seleccionadas que den una complejidad sensorial mayor en el producto final, transformando aldehídos desagradables en sus respectivos alcoholes superiores. Este proceso es debido a que las levaduras, en esas condiciones, generan un exceso de coenzimas lo que disminuye la concentración de compuestos no deseados. (Vanderhaegen

et al., 2003; Michel et al., 2016). Otro punto de diferenciación es que en las cervezas artesanales a veces se añaden adjuntos naturales como miel, frutas, o especias para generar productos con un aroma y olor característico y diferenciador frente a las cervezas industriales. (Thompson et al., 2002; Giovenzana et al., 2014; Martínez Muñoz, 2015)

Estas diferencias en el procesado de la cerveza, tienen su repercusión directa en el producto final. Como ya se ha comentado con anterioridad el consumidor elige la cerveza artesanal por la motivación de experimentar una sensación nueva y diferentes al sabor homogéneo de la cerveza industrial corriente, a pesar de su precio, ya que le genera nuevas experiencias sensoriales. (Aquilani et al., 2015; Donadini et al., 2016)

La Figura 2 representa los diagramas de flujo de elaboración de una cerveza industrial, en este caso del tipo *lager* y una cerveza artesanal, destacando las etapas donde se diferencian ambas elaboraciones. (Martínez Muñoz, 2015).

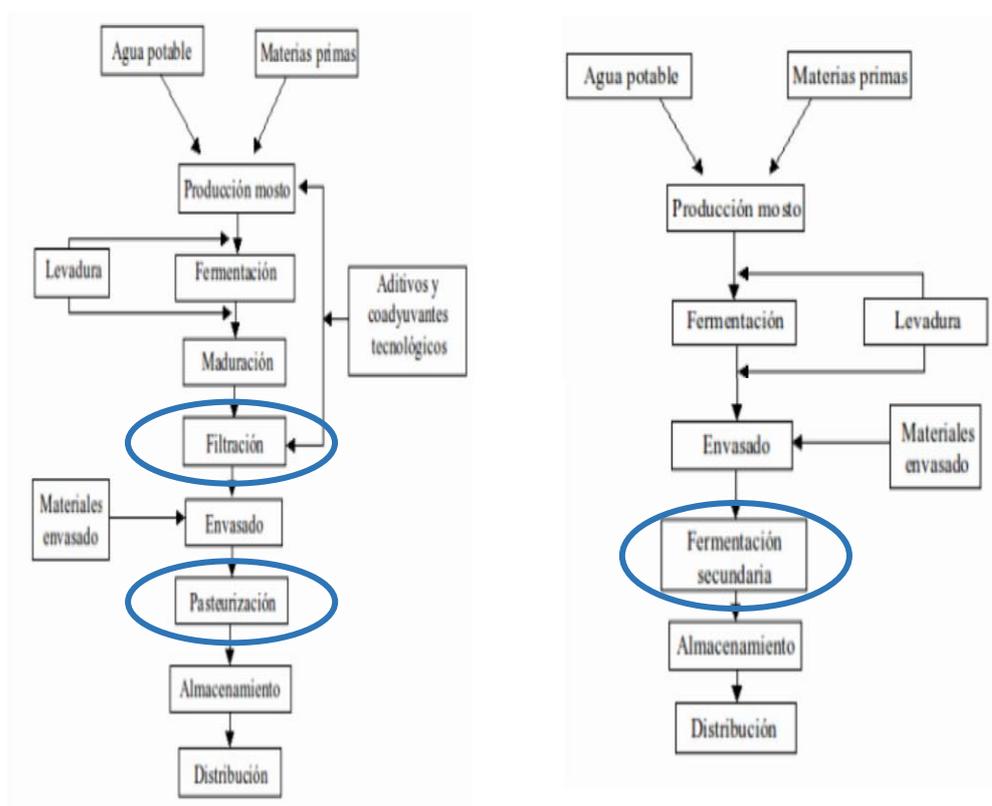


Figura 2: Diagramas de flujo: cerveza industrial(izquierda) y artesanal(derecha).

1.3. Tipos de cervezas y sus particulares características.

Los tipos de cervezas no están regulados ni estandarizados a nivel mundial, por lo que no existe ninguna lista oficial, ni homogénea de los mismos. La explicación es sencilla, la alta complejidad entre las técnicas de elaboración, los ingredientes, los adjuntos, tipos de fermentación, etapas post-fermentativas, el tipo de envasado..., hacen imposible su clasificación. La manera más utilizada para clasificarlos, reside en el tipo de levadura utiliza, que como ya se ha comentado en el punto 1.2.1 Ingredientes, existen dos tipos: Las levaduras *Ale* o de alta fermentación y las *Lager* o de baja fermentación. Por lo que, de la misma forma, los tipos de cervezas se puede dividir en dos grandes ramas, las *Ale* y las *Lager*. Las cervezas tipo *Ale* se suelen distinguir por unos sabores y aromas característicos y más intensos que los del tipo *Lager*, fruto de una producción mayor de ciertos metabolitos secundarios durante la fermentación. Mientras que las cervezas tipo *Lager*, son cervezas con mayor cantidad de azufre y un sabor ligero a fruta. (Sanchis et al., 2000; Bamforth, 2007; R. Preedy, 2009; White & Zainasheff, 2010;).

Para mostrar de forma rápida y eficiente los tipos de cerveza con mayor importancia junto a sus parámetros más representativos se presenta la **Tabla 4**, quedando así clasificados no solo según el tipo de fermentación como se ha comentado con anterioridad, sino también en función de su origen. Los datos extraídos del libro **C. Beer styles: Their Origins and Classification. Handbook of Brewing**, escrito por Papazian, 2006.

Tabla 4: Tipos de cerveza más utilizados, según el tipo de fermentación y origen.

<i>Ale</i>						
Origen	Estilo	Densidad Inicial (kg/m ³)	Densidad final (kg/m ³)	Alcohol (v/v%)	Amargor (IBU)	Color (EBC)
Británico	Pale Ale	1,044-1,056	1,008-1,016	4,5-5,5	20-40	10-28
	India Pale Ale (IPA)	1,050-1,064	1,012-1,018	5-7	35-55	12-28
	“Ordinary Bitter”	1,033-1,038	1,006-1,012	3-3,7	20-35	8-12
	Amargo especial	1,038-1,045	1,006-1,012	4,1-4,8	28-46	16-28
	Ale ligera escocesa	1,030-1,035	1,006-1,012	2,8-3,5	9-20	16-34
	Ale fuerte escocesa	1,035-1,040	1,001-1,014	3,5-4	12-20	20-38
	Ale de exportación escocesa	1,040-1,050	1,010-1,018	4,0-5,3	15-25	20-38
	Dorada oscura inglesa	1,030-1,036	1,004-1,008	3,2-4,0	10-24	34-68
	Marrón inglesa	1,040-1,050	1,008-1,014	4-5,5	15-25	30-44

	Imperial Stout	1,080-1,100	1,020-1,030	7-12	50-80	40
	Vino de cebada	1,085-1,120	1,024-1,032	8,4-12	40-60	28-44
Irlandés	Roja	1,040-1,048	1,010-1,014	4-4,5	0-28	22-36
	Clásica Stout seca	1,038-1,048	1,008-1,012	3,8-5	30-40	80
Norteamericano	Pale Ale	1,044-1,050	1,008-1,014	4,5-5,5	28-40	12-28
	India Pale Ale (IPA)	1,050-1,070	1,012-1,018	5-7,5	40-65	12-28
	Ámbar rojiza	1,048-1,058	1,012-1,018	4,5-6	30-40	22-36
	Dorada o rubia	1,045-1,056	1,008-1,016	4-5	15-25	6-14
	Stout	1,050-1,075	1,010-1,022	5,7-8,8	35-60	80
Aleman	Cerveza vieja (Altbier)	1,044-1,048	1,008-1,014	4,3-5	25-48	22-38
	De trigo sin filtrar	1,047-1,056	1,008-1,016	4,9-5,5	10-15	6-18
	De trigo filtrada	1,047-1,056	1,008-1,016	4,9-5,5	10-15	6-18
	De trigo negra	1,048-1,056	1,008-1,016	4,8-5,4	10-15	20-38
Belga y francés	Marrón de Flandes	1,044-1,056	1,008-1,016	4,8-5,2	15-25	24-40
	Doble fermentación	1,050-1,070	1,012-1,016	6,0-7,5	18-25	28-36
	Triple fermentación	1,060-1,096	1,008-1,020	7,0-10,0	20-25	7-14
	Pale Ale	1,044-1,054	1,008-1,014	4,0-6,0	20-30	7-24
	De trigo	1,044-1,050	1,006-1,010	4,8-5,2	10-17	4-8
	Lambic	1,044-1,056	1,000-1,010	5-6	11-23	12-26
Lager						
Origen	Estilo	Densidad original	Densidad final	Alcohol (v/v%)	Amargor (IBU)	Color (EBC)
Aleman-europeo	Pilsener alemana	1,044-1,050	1,006-1,012	4-5	30-40	6-8
	Pilsener de bohemia	1,044-1,056	1,014-1,020	4-5	30-45	6-14
	Pilsener europea	1,044-1,050	1,008-1,010	4-5	17-30	6-8
	Bock alemana	1,066-1,074	1,018-1,024	6-7,5	20-30	40-60
Norteamericano	Lager	1,040-1,046	1,006-1,010	3,8-5	5-14	4-8
	Lager clara	1,024-1,040	1,002-1,008	3,5-4,4	5-10	3-8
	Lager clara baja en carbohidratos	1,024-1,036	0,992-1,004	3,5-4,4	3-10	3-20
	Lager Premium	1,044-1,048	1,010-1,014	4,3-5	6-15	4-12
	Ice Lager	1,040-1,060	1,006-1,014	4,6-6	7-20	4-16
Otros orígenes	Lager clara australiana, latino-americana o tropical	1,032-1,046	1,004-1,010	2,9-5,6	9-25	4-8
	Bebidas fermentadas con malta aromatizada	1,030-1,110	1,006-1,030	2,5-12	≤10	10-100

1.4. Papel de las Levaduras no-Saccharomyces en la elaboración de cerveza

La gran expansión y desarrollo del sector cervecero, sumado a que los consumidores además de ser más numerosos, cada vez son más especializados, ha impulsado una gran innovación por parte de los productores, con el objetivo de buscar estilos de cervezas novedosos y diferentes. Bajo este contexto, la biotecnología está asumiendo el reto de mejorar y producir cambios específicos y controlados en el producto final. Inocular levaduras *no-Saccharomyces*, tanto en la fermentación principal como en la refermentación en botella abre un campo lleno de posibilidades de innovación. (Basso et al., 2016; Michel et al., 2016 Gibson et al., 2017; Callejo et al., 2017) Esta opción resulta aún más interesante en la producción de cervezas artesanales, ya que su carácter más personal debido a su elaboración de forma manual, junto a la posibilidad de utilizar diferentes levaduras, permite acentuar ese carácter individualizado y único, tan valorado en este sector. La explicación reside en que la cantidad y variedad de los compuestos aromáticos producidos por las levaduras son estrictamente dependientes de la cepa elegida para la fermentación (Callejo et al., 2017).

Existen multitud de estudios e investigaciones del empleo de los géneros *no-Sccharomyces* para producir vino (Suarez-Lepe & Morata, 2012; Loira, 2014; Del Fresno 2017; Escott, 2017), es decir su uso y aplicación en enología está muy avanzado y desarrollado, en el caso que nos atañe, la cerveza, eso no es así. Por ello a continuación, se pretende hacer una revisión de los principales géneros que pueden tener interés en la producción de cerveza, describiendo sus características microbiológicas y sus posibles usos.

1.4.1. Características y principales usos.

Las propiedades fermentativas más importantes e interesantes de las *no-Saccharomyces* para su uso en cerveza y otras bebidas fermentables quedan resumidas en la **tabla 5**, datos de Morata et al., 2016. De los géneros de la tabla, *Torulapora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* y *Schizosaccharomyces pombe*, ya se están produciendo a nivel industrial como starters de fabricación, en formato líquido o en polvo, por las principales compañías biotecnológicas, tales como Lallemand o Laffort. (Morata et al., 2016).

Tabla 5: Especies de no-Saccharomyces y sus principales propiedades para su uso en bebidas.

<i>Especie de levadura</i>	Poder fermentativo (%v etanol)	Sustratos fermentables	Acidez Volátil (g/l)	Volátiles	Efecto en la acidez
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12-18	Glucosa Fructosa Galactosa Sacarosa Maltosa	< 0,5	Alcoholes Superiores Ésteres	Neutral
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	< 9	Glucosa Fructosa Galactosa Sacarosa Maltosa	< 0,5	Lactato de etilo 2-feniletilo Acetato Propanol	Neutral
<i>Lachancea thermotolerans</i>	< 9	Glucosa Fructosa Maltosa Galactosa	< 0,5	2feniletilo Acetato Lactato de etilo	Acidifica (Ac. Láctico)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12-14	Glucosa Fructosa Sacarosa Maltosa	0,8-1,4	Alcoholes superiores Ésteres	Maloalohólica desedificación
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	12-14	Glucosa Fructosa Sacarosa	<0,5	Diacetilo Acetoina	Neutral
<i>Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis</i>	< 2	Glucosa Fructosa Sacarosa Maltosa Celobiosa	> 1	Etilfenoles Ácido isovalérico Ácido isobutírico Piracinas	Mejora la acidez

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

Para facilitar su identificación y posterior explicación se muestra la **Figura 3**, donde se pueden observar la morfología de los distintos géneros de levaduras más utilizados en bebidas fermentadas. Las imágenes han sido obtenidas de **Suarez-Lepe & Morata, 2012 (E y F) y Callejo, 2017 (A a D)**.

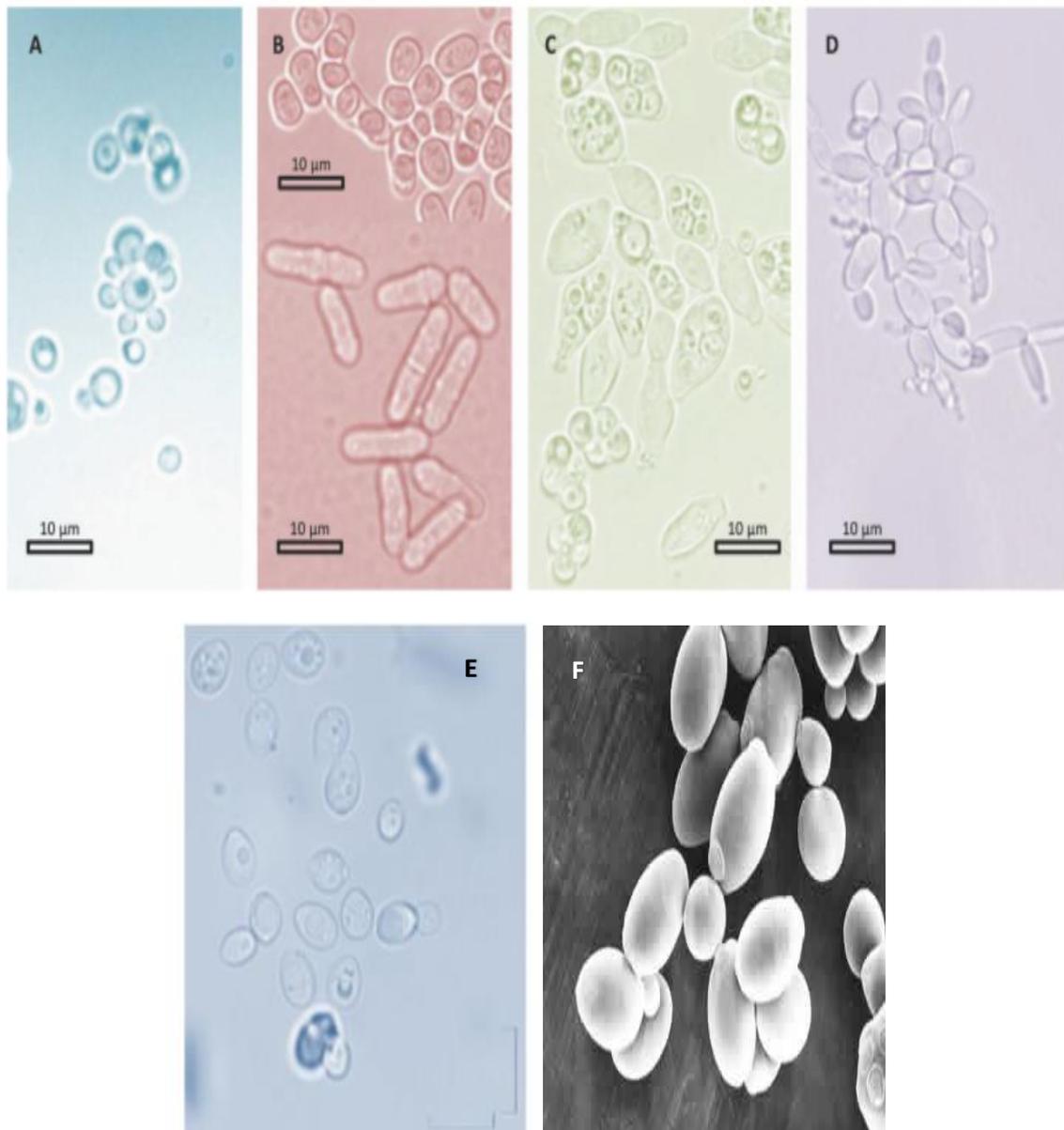


Figura 3: Imagen al microscopio óptico de diferentes levaduras: (A) Torulaspora delbrueckii, (B) Schizosaccharomyces pombe, (C) Saccharomycodes ludwigii, (D) Dekkera bruxelensis, (E) Saccharomyces cerevisiae, (F) Lachancea thermotolerans.

- *Saccharomyces cerevisiae*:

Saccharomyces cerevisiae es la levadura utilizada por excelencia en casi todas las fermentaciones de alimentos. Como se puede observar en la [tabla 5](#), es capaz de fermentar monómeros, glucosa, fructosa, galactosa o manosa, algunos disacáridos como maltosa o sacarosa, e incluso, algún trisacárido como la rafinosa. (Lodolo, 2008). Es mayormente diploide y tiene forma elíptica o elipsoidea dependiendo de la cepa, su reproducción es con división celular, también puede formar esporas, 4 ascoesporas con distribución tetraédrica. Puede crecer perfectamente en presencia de altas concentraciones de etanol, tiene un poder fermentativo alto, llegando a alcanzar 18º de alcohol en determinadas condiciones. No es capaz de utilizar lactosa, pentosas, polisacáridos, citrato o nitrato. Su uso en cerveza está altamente extendido y estudiado (Sanchis et al., 2000; Dowhanick, 2002; White & Zainasheff, 2010; Suarez-Lepe & Morata, 2012).

- *Torulaspota delbrueckii*:

Conocida formalmente por *Saccharomyces delbrueckii* o *Saccharomyces rosei*, es una de los géneros de *no-Saccharomyces* más estudiado, se utiliza en productos muy diferentes, vino, cerveza, pan y otros alimentos fermentados, incluso es posible encontrar cultivos en polvo comerciales ya a la venta. (Loira et al., 2014; Basso et al., 2016, Morata et al., 2016). Su morfología es parecida a *S. cerevisiae*, elipsoidea. Es la forma teleomorfa, correspondiente a la forma anaforma de la especie *Candida colliculosa*. En cuanto al poder fermentativo, es del tipo medio entre un 6 y un 9 % en volumen de etanol. Tiene carácter osmotolerante, con una fermentación pura, que produce poca acidez volátil y acetato de etilo (Loira et al., 2014). Su posible uso en cerveza se explica por su capacidad de mejorar el perfil aromático, ya que produce bajos niveles de acetaldehído, acetoina, H₂S. Estos compuestos en altas concentraciones pueden producir defectos olfativos o aromas no deseados en la cerveza. (Ciani & Ferraro, 1998; Comitini et al., 2011; Morata & Suárez-Lepe, 2016). También afecta al balance de acidez, debido a la producción de ácido láctico y succínico en pequeñas cantidades. Además, tiene la habilidad de transformar los terpenoides del lúpulo, influyendo en el perfil aromático final. Produce ésteres aromáticos como lactato de etilo, descrito por su olor a café o cereza y 2-feniletilo acetato, característico del olor a pétalo de rosa. (King & Dickinson, 2000; Michel et al., 2016; Canonico et al, 2016).

- *Lachancea thermotolerans*:

Este género está cogiendo cada vez más importancia y relevancia en su uso en alimentos fermentados, sobre todo por su repercusión en el perfil sensorial y producción de ácidos orgánicos, en especial ácido láctico. Formalmente era conocida como *Kluyveromyces thermotolerans*. En cuanto a su apariencia es bastante similar de nuevo a la *S. cerevisiae*, tanto es así, que sería imposible diferenciarlas al microscopio. Su reproducción asexual es multipolar, puede generar ascosporas. Su poder fermentativo es medio entre 4-9% (en v de etanol), este valor fluctúa dependiendo la cepa (Comitini et al., 2011), aunque no es capaz de crecer en medios con un porcentaje en etanol mayor al 9% (Morata & Suárez-Lepe, 2016). Posee la cualidad de producir bajas concentraciones de acidez volátil (Domizio et al., 2016).

Su uso principal en vinos es debido a su capacidad de producir ácidos orgánicos y así reducir el pH, la acidez volátil y aumentar la concentración de glicerol y de 2- feniletanol, normalmente usada en coinoculaciones con *S. cerevisiae* (Kapsopoulou et al., 2007; Gobbi et al. 2013). Estas características, junto con su capacidad de fermentar distintos azúcares de la malta, la hacen idónea para su utilización en la producción de cervezas ácidas, evitando el uso de bacterias lácticas en una segunda fermentación (Domizio et al., 2016). *L. thermotolerans* ha sido descrita como osmófila, probablemente se pueda utilizar para controlar los niveles de acetaldehído y de alcoholes superiores. (Callejo et al., 2017).

- *Schizosaccharomyces Pombe*:

Levadura peculiar, descubierta en algunas áreas de África en cervezas de mijo. Su nombre, pombe, significa cerveza en lengua swahili. Su descubridor fue Lindner en 1893. Su morfología es alargada o cilíndrica, puede aparecer aislada o en parejas. Se divide por fisión binaria por medio de la formación de un tabique en mitad de la célula de forma asexual, también puede formar esporas (4-8). Su poder fermentativo es alto, aunque no alcanza al de *S. cerevisiae*, algunas de sus cepas llegan al 15% de v. en etanol, si las condiciones no son de anaerobiosis extrema. La producción de ácido acético durante la fermentación es bastante elevada, por lo que es un parámetro a controlar, sobre todo en vino, donde normalmente se coinocula con *S. cerevisiae* para controlar la acidez. En el caso de la cerveza, al ser la cantidad de azúcares menor, no tiene gran influencia. También resiste muy bien el sulfuroso. (Suarez-Lepe & Morata, 2012; Morata, 2012; Loira, 2015).

Su metabolismo de los ácidos orgánicos también es peculiar, es capaz de degradar el ácido málico, a través de una reacción conocida como maloalcohólica, transformándolo en alcohol y CO₂. Este proceso es muy interesante en el proceso de vinos, ya que puede reducir o eliminar la etapa de fermentación maloláctica, en la cual las protagonistas eran las bacterias lácticas. La transformación de 2,3 g/l de ácido málico significa un incremento de 0,1% en el v. de etanol. *S. pombe* puede llegar a degradar cantidades superiores a 8 gr/l de ácido málico en vinos. (Maconi et al., 1984; Morata et al., 2012).

S. pombe es una levadura amófila, posee una pared celular muy rica en polisacáridos. Envejecer sobre lías, es un envejecimiento biológico de larga duración, donde se ponen en contacto las levaduras y la bebida fermentada. Una vez las levaduras han autolisado, los polisacáridos de su pared se disuelven transformando la percepción sensorial del producto final. (Palomero et al., 2009)

- *Saccharomyces ludwigii*:

Levadura apiculada, con forma de limón, se divide por gemación bipolar. Está en la forma telomorfa, con forma de rombo con las 4 esporas. Posee una resistencia muy grande al sulfuroso. Algunas cepas forman grandes cantidades de acidez volátil, pero la mayoría presenta niveles controlados. Sin embargo, la cantidad de acetato de etilo es bastante grande (unos 400 mg/L) (Domizio et al., 2011; Callejo et al., 2017).

Su influencia en el perfil aromático es debida a la producción de ésteres que otorgan sabor a fruta. Producciones de acetoina, 100-300 mg/L, y diacetilo están relacionadas con su metabolismo. Al igual que la *S. pombe*, posee un carácter osmófilo, y posee una concentración de polisacáridos de membrana 10 veces mayor que la *S. cerevisiae*, lo que la hace interesante para su utilización en envejecimiento sobre lías. En su uso en vinos tradicionalmente, es considerada una levadura no deseada, debido a la producción de cantidades altas de diacetilo y acetoina y de bajar el perfil aromático (Palomero et al., 2009; Escott et al., 2017). Sin embargo, en cerveza su uso es bastante amplio sobre todo en la producción de cervezas sin alcohol o cervezas bajas en alcohol (0,5-1,4 % v. etanol), debido principalmente, a su dificultad para fermentar determinados azúcares del mosto cervecero (maltosa, maltotriosa) (Yeo & Liu, 2014; Michel et al., 2016; Gibson et al., 2017).

- *Dekkera bruxellensis*:

Es la forma anaforma de la *B. bruxellensis*, tiene forma ojival, alargada. Tolera altas concentraciones de etanol, cercanas al 15% en v. de etanol, y posee una baja capacidad fermentativa. La producción de ácido acético es muy alta, muy dependiente de las condiciones de aeración. Tradicionalmente, se ha utilizado en la producción de las cervezas tipo *Lambics* (Crauwels et al., 2015).

Las cervezas *Lambic* son producidas por una mezcla heterogénea de bacterias y levaduras. Su carácter ácido, es una mezcla de la producción de ácido acético y láctico de las bacterias lácticas y el uso de esta levadura que aumenta la concentración de acético, para finalizar se inocula una *S.cervisiae* para terminar la fermentación. (Crauwels et al., 2015).

En vinos es temida por sus defectos olfativos y problemas de contaminación. Producen importantes sabores no deseados, el más importante el etilfenol. *Dekkera* o *Brettanomyces*, es capaz de transformar los ácidos hidroxicinámicos en etilfenoles, los descriptores de este compuesto son el olor a sudado, o cuero de caballo. Es capaz de crecer en casi cualquier condición y es muy difícil de eliminar, sobre todo aparece en la etapa de crianza. (Suárez et al., 2007)

La *brettanomyces* presenta altos contenidos de polisacáridos de pared, cantidad que puede ser interesante para el envejecimiento sobre lías. Puede ser un interesante parámetro para modular el sabor de la cerveza en las etapas de fermentación en botella y maduración. (Kulkarni et al., 2015).

1.5. La importancia de la “guarda” en botella.

La cerveza como cualquier alimento, es de carácter perenne, es decir se pierde con el paso del tiempo. Una vez envasada, es un sistema cerrado que no deja de transformarse y evolucionar sufriendo alteraciones por diferentes reacciones químicas. Estas alteraciones darán lugar a cambios perceptibles en sabor, espuma, aroma y estabilidades coloidales. Las reacciones radicales, a menudo iniciadas por especies de oxígeno reactivas, tienen un importante papel en el envejecimiento de la cerveza y su estabilidad. Otras de las muchas reacciones que pueden influir en el envejecimiento de la cerveza son: La oxidación de ácidos grasos, las reacciones de Maillard, degradación de los ácidos del lúpulo, oxidación de polifenoles, hidrólisis de glucósidos y ésteres, la síntesis de ésteres o la transformación de los aldehídos (Schutter et al., 2009). Estas

reacciones deben conocerse e intentar evitar aquellas que pongan en peligro la vida útil del producto final.

Sin embargo, en las cervezas artesanales, esta evolución del tiempo no siempre es un proceso que sea negativo para el producto final, sino que puede llegar a ser positivo. A este proceso de maduración o refermentación en botella se le conoce como “guarda”. La “guarda” juega un papel fundamental, cuando la elaboración de la cerveza artesanal se produce por refermentación en botella. Este proceso consiste en, una vez obtenido un mosto fermentado, se embotella adicionándole un compuesto fermentable, normalmente azúcar, para que lleve a cabo una segunda fermentación en el interior de la botella. Dicho proceso persigue dos objetivos: El primero es el de conseguir la carbonatación y espuma necesarias, gracias a la producción de CO₂ en el interior de la botella. El segundo objetivo es el de transformar una cerveza verde, es decir una cerveza recién fermentada, que aún no ha madurado y que su sabor y aromas no están formados, en una cerveza acabada, con una complejidad sensorial mucho mayor. Este segundo objetivo se puede conseguir utilizando cepas seleccionadas, incluidas géneros *no-Saccharomyces*, que transformen aldehídos desagradables en sus respectivos alcoholes superiores, aumentando así su concentración por encima del umbral de percepción, o formen nuevos metabolitos secundarios que otorguen aromas o sabores especiales y diferentes. (Palmer, 2006; Strong, 2011).

Esta opción de utilizar géneros de *no-Saccharomyces* para la “guarda” en botella, es una opción que se está empezando a investigar y completamente novedosa. Dos son las causas para su utilización: Su potencial para sintetizar metabolitos secundarios y la excreción de coenzimas responsables de producir precursores capaces de degradar los componentes no deseables en la cerveza. Su uso se resume en la posibilidad de realizar una modulación en el perfil aromático de una cerveza a través de un proceso biológico natural. Este “bioflavoring”, como se conoce en inglés, permite obtener cervezas con unos perfiles sensoriales particulares y diferentes. (Callejo et al., 2017)

La gran cantidad de metabolitos secundarios permite agruparlos en familias, las principales familias son, (Michel et al., 2016; Callejo et al., 2017):

- Alcoholes superiores y ésteres: La familia que más influencia tiene en el flavor de la cerveza. Los alcoholes contribuyen al aroma a alcohol, picante, vino y los ésteres al aroma afrutado. (destaca el acetato de isoamilo).

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- Componentes sulfurosos: Algunos son no deseados, pero otros pueden mejorar el perfil sensorial. El dióxido de sulfuro y el sulfhídrico son algunos ejemplos, el último se considera un defecto en cervezas tipo *lager*, pero en concentraciones controladas es valorado en cervezas tipo *Ale*.
- Grupos carbonados: El más conocido es el diacetilo, responsable del aroma a mantequilla, no suele ser un olor deseado, exceptuando algún tipo de cerveza.
- Ácidos orgánicos: Acético, propiónico, isobutírico, butírico, valérico.... En grandes cantidades contribuyen a los aromas agrio y salado

1.6. Objetivos del estudio.

El objetivo principal del presente estudio es determinar la influencia en la calidad de la cerveza de diferentes especies *no-Saccharomyces* en la refermentación en botella.

1.6.1. Objetivos concretos.

- Puesta a punto de un protocolo de elaboración de la cerveza “base” o cerveza “verde”, a escala piloto, que sirva de punto de partida para posteriores estudios.
- Analizar instrumentalmente los compuestos del metabolismo de las levaduras aplicadas en este estudio, con el fin de encontrar si existen diferencias entre las cepas.
- Analizar sensorialmente, mediante un perfil descriptivo, la calidad sensorial de las cervezas elaboradas en este estudio.
- Analizar si existen correlaciones entre los datos obtenidos del análisis instrumental y el sensorial.
- Analizar la influencia del tiempo de guarda sobre la calidad de la cerveza.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

Se han llevado a cabo 4 elaboraciones de cerveza a escala piloto en el laboratorio, mediante un equipo de elaboración *HOMEMADE*, Brewferm®. Las dos primeras elaboraciones sirvieron para poner a punto el proceso y el protocolo y conseguir el máximo rendimiento del mismo. Los dos últimos se consideraron los ensayos definitivos, el primero de ellos se utilizó para poder comparar con el segundo que el proceso de elaboración estaba perfectamente establecido y no existían diferencias entre las dos cervezas base elaboradas.

2.1. Materiales:

Los principales ingredientes para las elaboraciones fueron los siguientes:

- Malta: Se utilizaron dos tipos, una *Pilsen*, es decir sin tostar y otra torrefacta (Tostada), ambas fueron aportadas por la empresa *Cargill, helping the world thrive*. Junto con la malta tipo Pilsen, malta principal utilizada en la elaboración, se adjunta la ficha técnica facilitada por el fabricante, [Tabla 6](#). Es determinante conocer sus parámetros más importantes y tenerlo en cuenta para una correcta elaboración.

Tabla 6: Ficha técnica malta tipo Pilsen utilizada en la elaboración de las cervezas.

Parámetro	Análisis
Humedad (%)	4,3
Rendimiento fino m.s. (%)	82,5
Dif. fino grueso (%)	1,3
Proteína total m.s. (%)	10,0
Proteína soluble (%)	4,2
Índice de Kolbach, (%)	42
Color EBC	3,6
Sobrecolor EBC	5,8
Friabilidad (%)	90,6
Poder diastásico (WK)	243
Beta-glucanos solubles (mg/l)	213
Viscosidad, (cp)	1,55
Hartong 45 (%)	41,3
Pdms (mg/kg)	2,0
Tiempo de sacarificación (min)	9
Ph	5,91
Alfa amilasa (DU)	44
Atenuación límite (%)	81,4
FAN (mg/l)	148
NDMA (ppb)	0,4

- El Irish moss: Ha sido adquirido en una tienda de suministros para elaborar cerveza.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- Agua: El agua utilizada en todas las etapas de la elaboración se ha obtenido de la red de agua del Canal de Isabel II (Madrid).
- Levadura de la fermentación principal: Cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* Florapan® A18 aportada por Lallemand. Es una cepa especial de cerveza que es capaz de conferir notas exóticas y sabores a mantequilla. También se utiliza para la elaboración de pan. (Cappozzi, et al., 2016).
- Levaduras de la refermentación en botella: Se utilizaron 6 cepas pertenecientes a la colección del “Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid, España”.

Los géneros utilizados en la refermentación en botella son los siguientes:

- ***Saccharomyces cerevisiae*, cepa 7VA.** Utilizada como control. Propia del Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos.
- ***Torulaspora delbrueckii* cepa 291 de Lallemand.** Según la ficha técnica, debe fermentar a temperaturas > 16°C, produce una acidez volátil baja, realiza la fermentación maloláctica y puede usarse como inoculación con *S. cerevisiae*.
- ***Lachancea thermotolerans* cepa kt 421 de Hansen.** Según la ficha técnica, posee una temperatura óptima de fermentación en un rango de 15- 25°C, produce concentraciones bajas de acetaldehído, ácido acético, compuestos azufrados y sulfúricos.
- ***Schizosaccharomyces pombe* cepa 938 de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI).** Realiza la fermentación maloalcohólica, utilizando como sustrato el ácido málico.
- ***Saccharomyces ludwigii* cepa 979 de la colección del IFI.**

El resto de materiales y equipos que se han usado para la elaboración pertenecen a un “Kit de arranque Brewferm® eléctrico” (de la marca Brouwland, Bélgica). La lista está incluida en el **Anexo 1**. El equipo dispone de un libro, “Brewing beer for beginners” de Martin **Hofhuis (2005)**, que sirve como referencia para la elaboración y la receta.

2.2. Proceso de elaboración de la cerveza:

A continuación, se describe el proceso general de elaboración de cerveza con el equipo “HOMEMADE”.

- La desinfección

Los materiales que entran en contacto con el mosto estéril, después de la cocción, se desinfectaron del siguiente modo:

- Materiales plásticos: disolución de 1 gramo de metabisulfito de potasio y 0.5 gramos de ácido cítrico por litro de agua, durante al menos 1 hora
- Materiales de vidrio: se esterilizan en una autoclave a 120°C durante 15 minutos.
- Coronas: se empapan con etanol y se deja evaporar en una campana con una lámpara UV durante 10 minutos.
- Intercambiador de calor: se hace recircular durante 30 minutos agua a 100°C.

- La molturación



Ilustración 1: Equipo de molienda y plasfinter

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

El molino de dos rodillos se ajusta a 6 vueltas de tuerca de distancia, con el fin de dejar las cascarras de la malta lo más intactas posible, intentando obtener la siguiente relación de tamaños: 1/3 harina fina, 1/3 harina y 1/3 granos partidos. Para verificar el tipo de molienda, se realizaron dos pruebas de tamizado en un "plasfinter", los datos confirmaron que las proporciones eran las correctas. ($> 1,00 \text{ mm} \rightarrow 38\%$; $< 0,425 \text{ mm} \rightarrow 34\%$; $> 2 \text{ mm} \rightarrow 28\%$).

- **La maceración:**

Se opta por una maceración escalonada, ya que el grado de modificación de la malta lo recomienda al ser poco modificada, con el fin de mejorar la actividad enzimática y conseguir extraer el máximo rendimiento. Ver **Ilustración 2**.



Ilustración 2: Etapa del macerado escalonado, control de temperatura en todo momento.

Debido a la importancia de esta etapa para la elaboración del mosto cervecero, se detalla a continuación las diferentes etapas y su utilidad. Los parámetros del macerado son modificados por el cervecero dependiendo del tipo de modificación de la malta, de tal forma que existen los siguientes escalones:

- 1- Descanso proteico a 45-55°C: En maltas poco modificadas es necesario, puesto que las levaduras necesitan cierta cantidad de aminoácidos para desarrollarse, y estos son producto de la degradación proteica. Un tiempo prolongado en este escalón degrada demasiado las proteínas, produciendo una espuma pobre. Para mejorar la calidad de la

espuma, cierta cantidad de proteínas, especialmente la de transferencia de lípidos (ZTP1) y la proteína Z, deben romperse a temperaturas mayores de 60°C, con el fin de que los productos aporten estabilidad a la espuma.

2- Sacarificación: esta etapa es la más importante pudiendo ser la única usada en la maceración. Posee distintos escalones de temperaturas y tiempos, debido a que actúan distintas enzimas cuya actividad degrada el almidón a azúcares fermentables y otros no fermentables que contribuyen en la calidad de la cerveza:

-Dextrinasa límite a 60-63°C a un pH 5,4-5,5: reduce el tamaño de almidones con elevado peso molecular, rompiendo los enlaces 1,6 que generan las ramificaciones, facilitando la acción de otras enzimas y disminuyendo el enturbiamiento debido a las grandes moléculas de almidón. Se desactiva a temperaturas superiores a 65°C.

-β-amilasa a 60-65°C a un pH 5,0-5,4: rompe los enlaces de los extremos no reducidos de la cadena de almidón, formándose maltosa, glucosa y maltotriosa. Es muy sensible a temperaturas mayores a 70°C.

-α-amilasa a 67-75°C a un pH 5,2-5,5: degrada el almidón al azar en dextrinas pequeñas rompiendo los enlaces 1,4 interiores. El resultado es una reducción rápida de la viscosidad del empaste, produciendo fragmentos de almidón de menor tamaño con extremos reductores accesibles a la β-amilasa. En este escalón es importante la prueba del yodo, debido a que el cambio de negro azulado a un marrón rojizo muestra la aparición de dextrinas pequeñas, indicativo de que las condiciones de macerado han sido favorables a la actividad enzimática.

Se midió el pH y la densidad en cada etapa para comprobar la evolución del macerado.

- La filtración:

Se realiza en el cubo de filtración, la malla del cubo se humedece con agua caliente, el mosto de la olla se trasvasa al cubo de filtrado con la ayuda de un cazo de plástico, se recircula de forma lenta hasta conseguir un mosto claro, mientras se filtra el mosto se lava la olla eléctrica y el agua de lavado se calienta a 78-80°C. El mosto claro se recoge en el fermentador para juntarlo con el mosto de lavado y llevarlo a cocción, sin dejar que las heces superiores queden secas. Se utiliza una espumadera para adicionar el agua de lavado, con el fin de proteger la formación de las capas filtrantes.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- La cocción

Todo el mosto resultante de la maceración y el lavado se trasvasa a la olla eléctrica, elevándose la temperatura hasta obtener una ebullición vigorosa, retirando las proteínas coaguladas de la superficie del mosto. De forma paralela se inicia el proceso de esterilización del fermentador, airlock, intercambiador de calor y tubos de plástico.

- El enfriamiento

El enfriamiento se realizó con la ayuda de un serpentín y una bomba de agua. En vez de hacer circular el mosto, ya que su temperatura era muy elevada, 100°C, y podría quemar la bomba, se recirculó agua fría por el serpentín, el cual se introdujo en la olla eléctrica una vez finalizada la cocción y el reposo del mosto. Una vez la temperatura había bajado lo suficiente y ya no existía tanto salto térmico entre el agua y el mosto, se adiciono hielo al circuito de agua para bajar la temperatura de la misma y favorecer el intercambio.

- La inoculación de levadura

15 minutos antes de terminar el enfriamiento se añade cierta cantidad de levadura A18 (de Lallemand) en 250 mL de mosto estéril previamente calentada de forma suave bajo una llama, a continuación, se dejó reposar. Antes de introducir la levadura, se empleó un mechero bunsen dirigido al orificio donde se introduce el airlock.

- La fermentación principal

Se controla la temperatura en todo el proceso, se introdujo en una cámara a 20°C, y se toman muestras diarias de mosto determinando densidad y pH, con el fin de controlar la fermentación y poder decidir cuándo se da por terminada. La estabilidad de la densidad durante 2 días indica que la fermentación ha finalizado o ha sido parada por algún motivo microbiológico.

- La clarificación

Se traspasó el mosto fermentado a tarros de cristal (5 litros) esterilizados por calor seco a 100°C durante 1 hora y media. Enfriamiento del mosto a 4°C en el frigorífico, con el fin de aumentar la velocidad de sedimentación y la conservación del mosto fermentado.

- El embotellado

Durante el transcurso de la fermentación principal, aproximadamente 5-7 días, se prepararon los inóculos de levaduras para la refermentación, la disolución de glucosa, se esterilizaron las

botellas de 333 mililitros (mL) y utensilios en contacto con la cerveza, inóculo y disolución de glucosa.

El primer paso fue el de refrescar las levaduras, para ello se prepararon primero una serie de tubos con YPD (Yeast, Peptone y Dextrose) en estría y se esterilizaron en el autoclave. Posteriormente se utilizó un mechero bunsen y una aguja de microbiología para realizar los diferentes pases y refrescar cada una de las levaduras que se iban a utilizar en el estudio. Se procuró en todo momento trabajar en condiciones de esterilidad, incluido trabajar dentro de la campana de UV. Una vez realizados, se colocaron en una estufa a unos 25º durante dos días.

Se utilizaron 5 matraces Erlenmeyer de 100 mL para cada una de las cepas de levadura, en cada matraz se adicionaron 50 mL de mosto del agua de lavado, con una densidad superior a 1,025 kg/m³ y se esterilizaron. Posteriormente y de nuevo bajo condiciones de esterilidad, se sembraron dichos matraces con cada una de las levaduras, en este caso se utilizó un asa de microbiología. Se utilizó una válvula Müller como trampa de sulfúrico. Se les dejó de nuevo 2 días para crecer, cuando transcurrieron los dos días se observó que una masa importante de levadura se había formado en todos los matraces. Se añadieron 7 ml de inóculo por botella. Las botellas son de 330 ml, de vidrio y color marrón opaco.

La glucosa se añadió en concentración de 7gr/l. Para su mejor disolución, se adicionó primero en un matraz de 250 gr de mosto caliente y se disolvió por completo, por último, se añadió en el tanque de fermentación, donde se homogenizó perfectamente.

Se estima una duración mínima de la refermentación de 4 semanas a unos 20ºC, que es lo mínimo para cervezas tipo Ale. Aunque también se realizó unas con 9 semanas de maduración para comprobar la influencia del tiempo de maduración o “guarda”.

2.2.1. Ensayos previos y puesta a punto del protocolo.

Con el fin de no repetirse, se decide no describir el proceso de elaboración seguido en las tandas realizadas para la puesta a punto del protocolo definitivo, ya que posteriormente se ajustó y modificó. Ambas elaboraciones se realizaron siguiendo la receta y el protocolo de elaboración descrito por [Alba, 2017](#), quien desarrolló también el trabajo fin de máster en la misma línea de investigación. Sin embargo, sí que se adjuntan los datos de elaboración de ambas tandas en el [Anexo 2](#).

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

A continuación, se detallan las principales diferencias que se añadieron para desarrollar el protocolo de elaboración definitivo, **Anexo 3**. Dicho protocolo se utilizó para elaborar las dos tandas que fueron las definitivas y que son las que se han utilizado para toma de los datos.

Se decide retirar la malta tostada por completo, ya que la malta tostada, aunque se añadía en concentraciones muy pequeñas, cambiaba por completo el color de la cerveza además de enmascarar algunos de los aromas y sabores producidos por las levaduras, con sus metabolitos secundarios.

Los momentos de adicionar el lúpulo también se modificaron. Se decidió añadir el lúpulo en 3 cargas en vez de en dos, 1/4 al principio, para evitar la producción de espuma, 2/4 a los 30 minutos, para aportar el amargor, y por último 1/4 en los últimos 30 minutos para que aporte más el aroma a lúpulo.

Para aumentar la producción y llevar al máximo rendimiento posible el equipo se calcula una receta en base a la anterior, pero con cantidades más altas.

2.2.2. Ensayos definitivos.

A continuación, se va a mostrar la receta definitiva para obtener 16 litros de cerveza verde. Seguidamente se van a mostrar todos los parámetros controlados en las diferentes etapas comparando la elaboración 1 y la 2 para verificar que el protocolo es correcto y se consiguen dos cervezas verdes iguales, ver **anejo 3** para más detalles del proceso. A partir de ahora la elaboración 1 será Tanda 1 y la elaboración 2 la Tanda 2.

Receta de los ensayos definitivos para elaborar 20 litros de cerveza:

- Malta total: 4800 gramos
 - o Malta Pilsen: 4800 gramos (3-4 EBC)
- Lúpulo *Nugget* 25 gramos, adicionados durante la cocción en:
 - o 6 gramos (0 minutos)
 - o 12,5 gramos (30 minutos)
 - o 6,5 gramos (60 minutos)
- Irish moss: 5 gramos (últimos 15 minutos)
- Agua Canal Isabel II, 35 litros con pH 7,13
 - o Maceración 20 litros

- Lavado 1º: 8 litros; Lavado 2º: 4 litros
- Tiempo de cocción: 90 minutos
- Levadura seca A18 florapan: 16 gramos para la fermentación principal de 18 litros finales de mosto cervecero.
- Refermentación en botella:
 - Levaduras para refermentación, inoculación líquida de 21 mL por litro de cerveza, con una población del orden 10^6 - 10^7 UFC (aproximadamente)
 - Adición de 7 gr/L de glucosa anhidrida.
- **El programa de macerado:**

El programa de macerado consta de 4 escalones, con diferentes temperaturas y tiempos. Se determinó el pH y la densidad en todo momento, en la si **Tabla 7**, se recogen los datos de las dos tandas.

En ambos casos se realizó la prueba de Iodo para verificar que no quedase almidón, el color amarillo rojizo es característico por la no presencia de moléculas grandes de almidón y se puede dar por concluido el proceso de sarificación del almidón. Ver **ilustración 3**.



Ilustración 3: Prueba del Iodo.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

Tabla 7: Programa de macerado de los ensayos definitivos: Tº, pH, Densidad.

	agua	Descanso proteico	Descanso de producción de maltosa	Descanso de sacarificación	Temperatura de finalización
Enzimas Implicados		Proteasas	β-amilasa	A-amilasa	
TANDA 1					
T °	20	52	62	72	78
Tiempo		10	45	15	5
pH (20°C)	7,21	5,73	5,81	5,79	5,79
Densidad (kg/m³)	1003	1043	1057	1060	1062
TANDA 2					
T ° (°C)	20	52	62	72	78
Tiempo (min.)		10	45	15	5
pH (20°C)	7,11	5,82	5,77	5,63	5,64
Densidad (kg/m³)	1003	1024	1066	1068	1068

- **Proceso de filtrado:**

La **tabla 8**, resume los datos de las diferentes etapas del proceso de filtración, comparando ambas elaboraciones.

Tabla 8: Etapa de filtrado de las dos elaboraciones y los parámetros controlados.

	Filtrado		Primer lavado		Segundo lavado	
	TANDA 1	TANDA 2	TANDA 1	TANDA 2	TANDA 1	TANDA 2
Cantidad agua de lavado(L)	0	0	8	8	4	4
Mosto claro obtenido (L)	9	9	7	7	3	3
pH (20°C)	5,80	5,72	5,98	5,72	5,86	5,78
Densidad (kg/m³)	1056	1066	1029	1066	1038	1042

Para entender mejor el filtrado se muestra la siguiente **ilustración 4**, donde se puede observar diferentes momentos en la etapa de filtrado.



Ilustración 4: Proceso de filtrado, recirculación y vista dentro del tanque.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- **Cocción:**

En la cocción debido a la evaporación el mosto se concentra, por ello se presenta la **tabla 9**, donde se puede ver los datos de pH y densidad antes y después de la cocción. En esta etapa se añade el lúpulo y iriss mosh, los tiempos de adición quedan definidos en la receta. Finalizada la cocción se deja reposar 10 minutos para que se precipiten las proteínas.

Tabla 9: pH y densidad del mosto antes y después de la cocción.

	Antes cocción		Post cocción	
	TANDA 1	TANDA 2	TANDA 1	TANDA 2
pH (20°C)	5,87	5.80	5,67	5,56
Densidad (kg/m ³)	1045	1049	1056	1060

- **Enfriamiento:**



Ilustración 5: Uso de serpentin con recirculación de agua mediante bomba en el proceso de enfriado.

El tiempo de enfriado del mosto a través del serpentín fue de 25 minutos aproximadamente, mejorándose comparado con la utilización del intercambiador de placas (50 min). Finalizado el enfriamiento, se traspasó el mosto al tanque de fermentación donde se inculó la levadura A18 (de Lallemand), evitando arrastrar los turbios de cocción que quedan al fondo de la olla.

- **Fermentación principal:**

La duración en ambas elaboraciones fue de 6 días, en ambas ocasiones el primer día se aireó el tanque de fermentación para favorecer la multiplicación de las levaduras y se confirmó que la fermentación transcurría correctamente, por la formación de espuma constante en la parte alta del tanque. Los datos medidos durante la fermentación se recogen en la **tabla 10**.

Tabla 10: Evolución de la fermentación principal.

	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 6
	TANDA 1				
pH (20°C)	5,67	4,14	4,12	4,10	4,11
Densidad (kg/m³)	1056	1029	1021	1016	1013,3
º Alcohólico	5,8				
	TANDA 2				
pH (20°C)	5,56	4,12	4,1	4,11	4,11
Densidad (kg/m³)	1060	1024	1019	1016	1014
º Alcohólico	5,9				

- **Clarificación:**

La clarificación duró 4 días, en un refrigerador a 4°C, se inició una vez fue traspasada la cerveza verde a tanques más pequeños sin arrastrar el fondo del tanque de fermentación puesto que son sedimentos de levaduras.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- **Embotellado:**

El embotellado se realizó el mismo día de acabar la clarificación. Se dejaron primero los tanques a temperatura ambiente para que cogieran temperatura. A la vez se preparó todo el material necesario para el embotellado. Se embotellaron 25 botellas en la primera elaboración, falta de volumen, es decir 5 cervezas por cepa de levadura, lo que no permitió realizar dos analíticas a tiempos diferentes por no poder realizarlas por triplicado, y 30 botellas en la segunda elaboración, lo que sí que permitió realizar dos analíticas y por triplicado. Se adicione la misma cantidad de azúcar a todas, es decir 7gr/l.

El tiempo de guarda o maduración fue para la primera elaboración de 9 semanas, y la segunda elaboración se dividió en dos, 15 botellas estuvieron 4 semanas, y las otras 15 botellas 9 semanas. La idea es poder comparar las dos elaboraciones a las 9 semanas para ver la influencia del proceso, y comparar entre sí los tiempos de guarda, es decir la de 4 semanas con la de 9 semanas, para ver la influencia del tiempo. Ver **ilustración 6**.



Ilustración 6: Proceso de embotellado manual.

2.3. Análisis instrumental:

2.3.1. Determinación del pH, densidad y temperatura.

2.3.1.1. Determinación de Ph

El pHmetro utilizado fue un micropH 2000 de la marca Crison, ver **ilustración 7**, previo a su uso se calibra con disoluciones de pH 4 y 7, cada medición se realiza con el mosto a temperatura de 20°C.

Según expone Snyder (1997), comparando con otras fuentes bibliográficas. Hay que tener en cuenta que el pH es función de la temperatura, es decir, hay que distinguir entre el pH óptimo para cierta temperatura dada de la actividad de un enzima, y el pH medido a 20°C, se espera que sea superior en un rango de 0,2-0,3 decimales (para mostos con temperaturas entre 50 y 65,5°C), esto es una aproximación ya que depende de la malta usada, el tipo de agua, el propio medidor de pH...



Ilustración 7: micropH 2000 de la marca Crison

2.3.1.2. Determinación Densidad.

Los resultados de las densidades durante el proceso de elaboración se obtienen por medio de 2 densímetros del laboratorio calibrados a 20°C, el primero mide en el rango de 1000-1050 y el segundo de 1050 a 1100, se precisan unos 200 ml de muestra y contar con una probeta de mínimo 250 ml. Para la determinación de la densidad durante la fermentación, con el objetivo de no perder volumen de cerveza, se decide medir la densidad en un matraz aforada de 10ml,

esta vez por la división peso entre volumen. Se pesa primero el matraz, se enrasa a 10 ml, se pesa de nuevo, se realiza la diferencia y se divide entre 0,01 L. Obteniéndose la densidad en gr/L.

2.3.1.3. Determinación Temperatura.

Las mediciones de temperatura se realizaron con diferentes termómetros aportados por el laboratorio, unos median de 0-100 °C y otros de 0-60 °C. Todos eran de cristal. El equipo de elaboración traía un termómetro de plástico que es el que se utilizó para determinar la temperatura durante el procesado dentro de la olla, junto a él se colocó unos de los termómetros del laboratorio de 0-100°C y se vio que había una diferencia de 3-5°C, dato a tener en cuenta para futuras producciones, guiarse por el de cristal.

2.3.2. Determinación del grado alcohólico.

Debido a que el equipo cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC) e2695 Alliance (de la marca Waters, Massachusetts, EEUU), acoplado a un detector de índice de refracción (RI) 2414, no estaba operativo durante el desarrollo del estudio, se tomó la decisión de medir el grado alcohólico por otro medio. El método elegido fue el de Ebullo métrico, o más conocido como "Barus". Es un método antiguo, muy utilizado en vinos, para conocer el grado alcohólico de forma rápida y sin perder mucha muestra. Por este motivo principalmente se ha elegido, ya que solo precisa 40 ml por muestra.

Esté método se basa en las distintas temperaturas de ebullición del alcohol y el agua. Esta tiene su punto de ebullición a 100 °C y el alcohol a 78,4 °C. Entonces, una mezcla hidroalcohólica hervirá a una temperatura comprendida entre estas dos, siendo más baja cuanto mayor sea el contenido de alcohol.

El material necesario se encuentra todo en el maletín del equipo, consta de: Caldera metálica, Lámpara de alcohol para calefacción, Refrigerante vertical, termómetro, indicador de temperatura del refrigerante, regla del cálculo y probeta graduada.

El procedimiento es sencillo, se mide en la probeta agua hasta la marca inferior, se introduce en la caldera, se ajusta el termómetro y se enciende la lámpara. Cuando la temperatura se estabilice se medirá la temperatura de ebullición del agua. Esta temperatura sirve para regular la regla de cálculos (según la presión atmosférica esta temperatura varía). Se añade refrigerante y se mide con la probeta ahora si hasta el límite superior la muestra de cerveza. Se añade a la probeta y se enciende de nuevo la lámpara. Cuando la temperatura se estabilice de nuevo, se

mede la temperatura y se lleva a la regla de cálculo, previamente ajustada. En dicha regla se podrá leer el grado alcohólico directamente. Ver [ilustración 8](#).

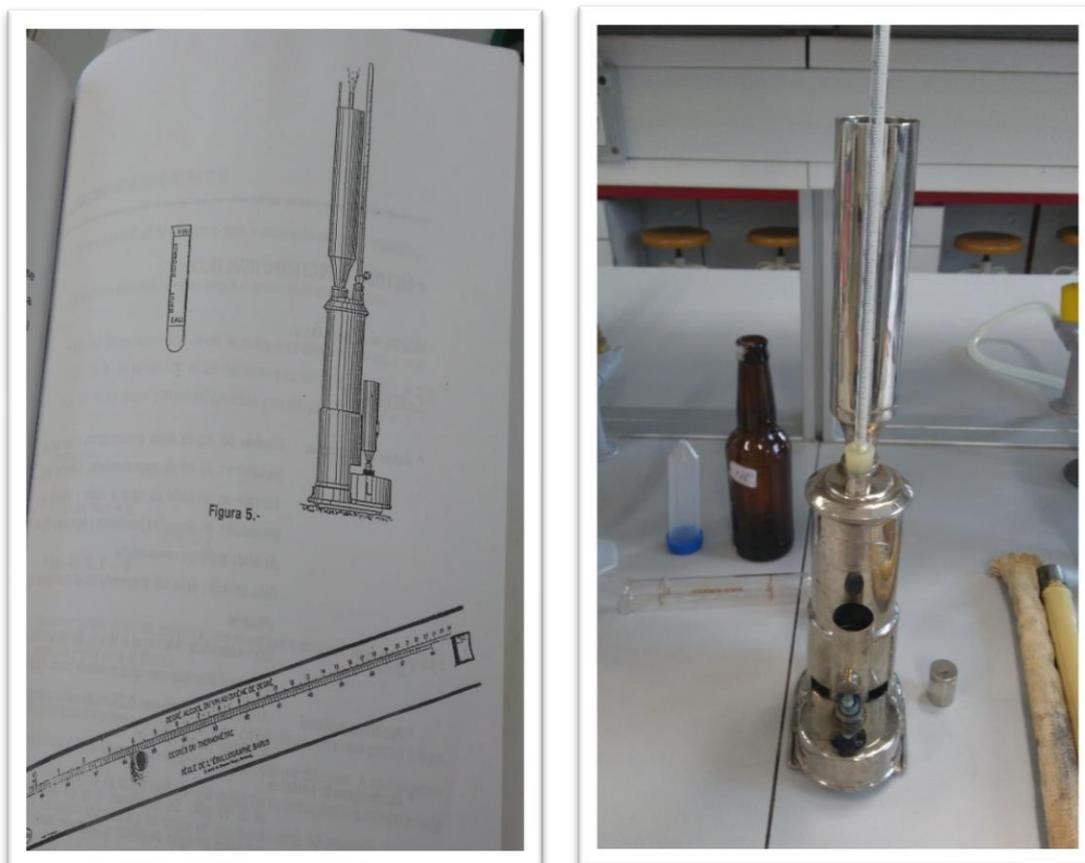


Ilustración 8: Equipo Barus utilizado para la obtención del grado alcohólico.

2.3.3. Determinación de los principales volátiles y productos metabólicos de las levaduras por GC-FID.

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases (GC) 6850 (de la marca Agilent Technologies, California, EEUU), con una columna DB-624 de dimensiones de 60 metros x 250mm. x 1,4mm. acoplado a un Detector de Ionización de Llama (FID) (de la marca Hewlett-Packard, California, EEUU), ver [ilustración 9](#). La temperatura del inyector fue de 250°C, la de la columna se programa en modo de rampa de temperatura (5 minutos a 40°C y aumento paulatino de 10°C/min hasta alcanzar 250°C) y del detector FID de 300°C.

El GC-FID a las condiciones previamente descritas, fue calibrado con estándares externos para los siguientes compuestos: acetaldehído, metanol, 1-propanol, diacetilo, acetato de etilo, 2-

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

butanol, isobutanol, ácido acético, 1-butanol, acetoína, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, lactato de etilo, acetato de isobutilo, 2,3-butanodiol, acetato de isoamilo, hexanol, alcohol 2-feniletílico y acetato de 2-feniletilo. Como estándar interno se usa una disolución de 4-metil-2-pentanol en agua Milli-Q, la concentración de esta fue de 500 mg/L, añadiéndose 0,1 ml de esta disolución a 1 ml de muestra de cerveza. Tanto los estándares externos como el interno son de la marca Sigma-Aldrich (Buchs, Suiza). Para la preparación de las muestras a analizar, se cogió 1ml de cada una de ellas y se microfiltro utilizando membranas de ésteres metílicos de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (Teknokroma, Barcelona, España).



Ilustración 9: Equipo Cromatógrafo de Gases (GC) 6850 (de la marca Agilent Technologies).

2.4. Análisis sensorial.

Se realizaron 3 catas siguiendo las normas **UNE 87017:1992** sobre análisis sensorial, metodología para establecer un perfil olfato-gustativo y la **UNE-ISO 4121:2003** sobre directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas. Estableciéndose escalas hedónicas no estructuradas para cada atributo, que por medición se obtiene la puntuación considerada entre 0 y 10 haciendo uso de la ley de proporcionalidad. La **Figura 4**, muestra los atributos que deben rellenar los jueces por cada cerveza.

En el 1º análisis sensorial, el panel jurado lo conformaron 8 jueces (4 hombres y 4 mujeres), en el 2º lo conformaron 7 jueces (4 hombres y 3 mujeres) y por último el 3º lo realizaron 9 jueces (5 hombres y 4 mujeres). Se han seleccionado personas expertas o con gran experiencia en el análisis sensorial de cerveza, pan y/o vino. El lugar de las catas fue en la Sala de Análisis Sensorial del Departamento de Química y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid, España. Cada puesto de cata consistió en la ficha de cata, un folio blanco a modo de

mantel, 1 copa de agua, 5 catavinos y snacks de pan con sabor neutro. A cada juez se le sirvió 30 mL aproximadamente de cada cerveza, haciendo que el tirado fuese lo más parecido posible al que se realiza con volúmenes convencionales. A cada especie de levadura se le asignó un número aleatorio de 3 dígitos, ver [ilustración 10](#).

The image shows two identical sensory analysis forms for beer tasting, titled "FICHA ANÁLISIS SENSORIAL (CATA DE CERVEZAS)". Each form is divided into several sections for recording data:

- Header:** "FICHA ANÁLISIS SENSORIAL (CATA DE CERVEZAS)"
- Identification:**
 - Nombre del juez:
 - Fecha de cata:
 - Código de muestra:
- Apariencia:** A scale from 0 to 10 for overall appearance.
- Color de la cerveza:** A scale from 0 to 10 for beer color.
- Turbidez:** A scale from 0 to 10 for turbidity.
- Consistencia de espuma:** A scale from 0 to 10 for foam consistency.
- Persistencia de espuma:** A scale from 0 to 10 for foam persistence.
- Color de espuma:** A scale from 0 to 10 for foam color.
- Efervescencia:** A scale from 0 to 10 for carbonation.
- Olfato:** A section for recording olfactory notes.
- Malta:** A scale from 0 to 10 for malt character.
- Levadura:** A scale from 0 to 10 for yeast character.
- Caramelo:** A scale from 0 to 10 for caramel notes.
- Plátano:** A scale from 0 to 10 for banana notes.
- Lúpulo:** A scale from 0 to 10 for hop character.
- Intensidad aromática:** A scale from 0 to 10 for aromatic intensity.
- Otros:** A scale from 0 to 10 for other aromas.
- Gusto:** A section for recording taste notes.
- Amargor:** A scale from 0 to 10 for bitterness.
- Dulzor:** A scale from 0 to 10 for sweetness.
- Acidez:** A scale from 0 to 10 for acidity.
- Cuerpo:** A scale from 0 to 10 for body.
- Astringencia:** A scale from 0 to 10 for astringency.
- Retrogusto:** A scale from 0 to 10 for aftertaste.
- Valoración global:** A scale from 0 to 10 for overall rating.
- Comentarios:** A section for additional comments.

Figura 4: Ficha del análisis sensorial.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.



Ilustración 10: Las copas servidas el día de la cata.

2.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos recogidos en el presente estudio, se ha realizado con un software específico que permite el análisis de la varianza (ANOVA), el software fue Statgraphics Centurión XVI versión 16.2.04 con una licencia facilitada por la Universidad Politécnica de Madrid. El análisis de la varianza permite conocer la probabilidad de que dos o más tratamientos sean iguales en cuanto al resultado de una variable dependiente. El nivel de confianza quedó fijado en valores menores al 5% ($p\text{-valor} < 0,05$) usándose el intervalo de LSD, siendo este el más utilizado.

También se utilizó el análisis multivariable, con el fin de conocer los coeficientes de correlaciones existentes entre el análisis instrumental y el sensorial, creándose una matriz de datos. El coeficiente de correlación tiene una escala de -1 a +1, cuanto mayor sea el valor absoluto, más fuerte es la relación lineal entre las variables de cada análisis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El presente estudio ha puesto de manifiesto las diferencias en la calidad de las cervezas llevadas a cabo, a nivel sensorial y analítico. Todas las cervezas producidas, partían de la misma cerveza verde inicial, y lo único que ha variado entre unas y otras ha sido el uso de diferentes géneros de levaduras *no-Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada como control, durante la maduración o refermentación en botella. Por lo tanto, las diferencias encontradas entonces se pueden atribuir a la influencia de las distintas levaduras empleadas a lo largo del proceso.

Se ha decidido emplear los datos obtenidos en la segunda elaboración definitiva, es decir, la tanda 2, para comentar los resultados y la discusión; debido a que es la única que, por volumen de muestra, se ha podido realizar su analítica instrumental y su correspondiente análisis sensorial a diferentes tiempos de guarda o maduración, en concreto, a 4 semanas y 9 semanas respectivamente. Todos los datos obtenidos se han realizado por triplicado, exceptuando el grado alcohólico (para evitar una posible pérdida de muestra), es decir se necesitaron 6 botellas por cepa, 3 para la analítica a 4 semanas y 3 para la analítica a 9 semanas.

La primera elaboración (tanda 1) ha servido para comprobar que el proceso y protocolo de elaboración esta puesto a punto y para ver que se ha realizado correctamente. Por otro lado, los parámetros determinados durante la elaboración (expresados en el apartado 2 de materiales y métodos) reflejan la similitud entre ambas, consiguiéndose así el objetivo de realizar dos cervezas “base” o cervezas “verdes” iguales. A pesar de ello, se realizó una analítica instrumental, determinándose pH, densidad, grado alcohólico, y los compuestos volátiles, para determinar su grado de similitud, ver [tabla 11](#). Estos datos, solo presentan diferencias significativas en un compuesto, el metanol, reafirmando que el protocolo se ha puesto a punto de forma satisfactoria.

La estrategia elegida para la presentación de estos resultados es la siguiente:

En un primer apartado se exponen los datos de la analítica instrumental, primero para la tanda 2 con 4 semanas de maduración o guarda y posteriormente para la misma tanda, pero con 9 semanas. Seguidamente, en un segundo apartado, se expresan los datos de la analítica sensorial, de igual modo, comentando primero los datos a las 4 semanas y posteriormente los de las 9 semanas. En el tercer apartado se realiza una comparación entre ambos resultados, con el

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

objetivo de ver la influencia del tiempo de guarda en cada uno de ellos. Finalmente, se realiza una correlación de los datos más significativos entre la analítica instrumental y sensorial.

Tabla 11: Comparación de resultados de las dos cervezas verdes: pH, densidad, grado alcohólico y compuestos volátiles (mg/L).

Parámetros / Tandas	cerveza tanda 1	Cerveza tanda 2
pH	4,11	4,11
Densidad (kg/m³)	1013,3	1014
Grado alcohólico	5,8	5,9
acetaldehído	6,32 ± 0,32a	8,67 ± 0,46a
metanol	7,57 ± 1,49b	5,03 ± 0,52a
1-propanol	25,57 ± 0,96a	22,32 ± 0,98a
diacetilo	1,87 ± 0,26a	2,76 ± 0,90a
acetato de etilo	17,73 ± 0,54a	15,74 ± 1,50a
2-butanol	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a
isobutanol	42,26 ± 9,10a	42,00 ± 10,14a
1-butanol	2,67 ± 2,31a	2,69 ± 2,33a
acetoina	5,55 ± 0,06a	5,51 ± 0,10a
2-metil-1-butanol	68,93 ± 2,97a	61,93 ± 2,46a
3-metil-1-butanol	38,13 ± 1,89a	37,32 ± 0,98a
lactato de etilo	7,54 ± 0,73a	14,34 ± 19,29a
2-3 butanodiol	275,65 ± 3,86a	263,79 ± 10,37a
acetato de isoamilo	2,72 ± 0,04a	2,61 ± 0,30a
hexanol	4,31 ± 0,11a	4,35 ± 0,62a
alcohol 2-feniletílico	97,46 ± 6,87a	85,52 ± 12,72a
acetato 2-feniletilo	8,13 ± 0,40a	7,73 ± 1,89a

Los valores representan el promedio ± su desviación estándar y las letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas para un nivel de significación <0,05 según el test de LSD.

Antes de dar comienzo a la discusión de los resultados obtenidos, es conveniente destacar que, los estudios bibliográficos utilizados, se basan en cepas concretas de especies de levaduras, que además se encuentran en condiciones específicas. Esto, sumado a que el metabolismo de las cepas puede ser diferente dentro de la misma especie, explica la posibilidad de obtener valores distintos a los expresados en este estudio. Además, hay que tener en cuenta las distintas variables que pueden influir a la hora de comparar estudios científicos sobre cerveza. Dentro de estas variables se encuentran, por ejemplo, el tipo de mosto utilizado (malta, lúpulo, agua...) y sus características (pH, densidad...), los parámetros de fermentación y o si se ha producido refermentación o maduración.

Los estudios actuales están enfocados en producir cervezas bajas en alcohol (o sin alcohol), con menor contenido en calorías, e cervezas que posean un sabor y aroma nuevo (fruta, mantequilla...) o incluso cervezas sin gluten. Por ello, a la hora de comparar los datos, hay que tener en cuenta que las cepas utilizadas en este estudio, son cepas seleccionadas para la elaboración de vino, debido a las mejoras que pueden aportar en durante el proceso productivo o por otorgar una propiedad de utilidad. En el caso de la cepa *S. cerevisiae* 7VA su uso se debe a su gran poder fermentativo, su estabilidad a lo largo del proceso productivo y por no aportar una elevada cantidad de compuestos aromáticos. Este último motivo, favorece que se utilice en vinos jóvenes donde se quiere ensalzar el aroma varietal y no los aromas de los metabolitos producidos por la levadura. Otro ejemplo es el empleo de *S. pombe*, la cual se selecciona por dos motivos principales, su ventaja metabólica al poder realizar la fermentación maloalcohólica y evitar así una fermentación maloláctica por bacterias láctica y su riqueza en polisacáridos de membrana, interesante para una crianza sobre lías. (Morata, 2004; Benito et al.,2012; Loira et al., 2014).

3.1. Resultados instrumentales:

Recopilados todos los resultados instrumentales obtenidos, de las diferentes cervezas elaboradas con las distintas levaduras empleadas, se procede a comentarlos y discutirlos. Para ello, y como se ha explicado con anterioridad, se mostrarán y comentarán los resultados obtenidos de los dos momentos de análisis por separado, es decir, primero con un periodo de guarda de 4 semanas y posteriormente, los de 9 semanas.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

En primer lugar, se procede a analizar los datos de pH, seguidamente se comentará el grado alcohólico obtenido, para acabar discutiendo los compuestos volátiles obtenidos y posteriormente medidos por GC-FID.

Con el fin de facilitar la discusión de los resultados obtenidos, en cuanto a los compuestos volátiles, estos se agruparán por familias, destacando las familias más importantes que afectan a la calidad de la cerveza. Por último, dentro de cada familia, se comentarán casos concretos de compuestos que bien tiene una relevancia importante en el flavor de la cerveza o bien se han obtenido en cantidades destacables. Las familias elegidas, con los principales componentes que la forman son las siguientes según [Michel et al., 2016](#):

- Componentes carbonilo: Acetaldehído, diacetilo, acetoina. Estos componentes, al estar relacionados entre sí, por ser unos productos de otros, no se tratarán como familia a la hora de sumar el total de en mg/L. Sin embargo, debido a su gran importancia en la cerveza y al encontrarse en concentraciones altas, se deben tener en cuenta.

- Alcoholes superiores: 1- propanol, 2-butanol, isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1 butanol, 3-metil-1-butanol, alcohol-2-feniletílico. Son importantes por poder contribuir al aroma floral, frutal, o herbáceo, dependiendo de las sinergias con otros componentes.

- Ésteres: Acetato de etilo, lactato de etilo, acetato de isoamilo, butirato de etilo, acetato 2-fenil-etilo. El componente más importante en cuanto a la influencia en el aroma, sobre todo potenciando los aromas a fruta.

- Volátiles totales: Sería la suma de todos los componentes volátiles detectados por el GC-FID, sin contar el etanol y el ácido acético. Lo que otorga una idea de la capacidad de producir componentes secundarios de fermentación, a nivel general.

3.1.1. A las 4 semanas de maduración o guarda.

La [tabla 12](#), recoge los valores de pH, grado alcohólico y compuestos volátiles para cada una de las levaduras empleadas, en este particular caso, para un tiempo de maduración de 4 semanas.

Tabla 12: Resultados de la analítica instrumental: pH, grado alcohólico y compuestos volátiles (mg/L)

Parámetro /Levadura	S.c	L.t	S.l.	S.p	T.d	Cerveza verde
pH	4,09 ± 0,02a	4,07 ± 0,04a	4,08 ± 0,06a	4,18 ± 0,01b	4,09 ± 0,01a	4,11 ± 0,02a
º Alcohólico(%v/v)	6,73	6,8	6,76	7,5	6,85	5,9
acetaldehído	17,95 ± 0,32b	30,41 ± 2,02d	11,74 ± 1,72a	23,93 ± 0,98c	9,38 ± 0,88a	8,67 ± 0,46a
metanol	5,93 ± 0,21b	7,19 ± 0,56c	4,74 ± 0,18a	4,86 ± 0,41a	5,51 ± 0,86ab	5,03 ± 0,52a
1-propanol	36,01 ± 0,76bc	40,44 ± 7,32c	29,45 ± 4,24a	30,71 ± 1,10ab	29,05 ± 2,39a	22,32 ± 0,98a
diacetilo	8,11 ± 0,32b	7,37 ± 0,87b	3,10 ± 0,09a	1,93 ± 0,38a	1,93 ± 0,07a	2,76 ± 0,90a
acetato de etilo	28,13 ± 1,33b	33,47 ± 2,46c	23,26 ± 2,29b	23,23 ± 0,45ab	23,73 ± 1,42ab	15,74 ± 1,50a
2-butanol	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	2,97 ± 0,10b	0,00 ± 0,00a
isobutanol	50,73 ± 7,78a	74,13 ± 0,76b	41,00 ± 1,37a	41,08 ± 1,92a	43,20 ± 1,51a	42,00 ± 10,14a
1-butanol	4,17 ± 0,10b	4,49 ± 0,17c	4,15 ± 0,14b	4,04 ± 0,10ab	4,06 ± 0,08ab	2,69 ± 2,33a
acetoina	6,47 ± 0,78ab	7,41 ± 0,70b	6,34 ± 0,63ab	7,16 ± 1,29b	6,14 ± 0,72ab	5,51 ± 0,10a
2-metil-1-butanol	104,21 ± 2,39b	111,42 ± 10,42c	87,54 ± 10,61a	76,91 ± 4,28a	79,19 ± 3,20a	61,93 ± 2,46a
3-metil-1-butanol	45,39 ± 1,25a	46,98 ± 3,83b	41,05 ± 2,72a	37,92 ± 1,90a	39,65 ± 3,47a	37,32 ± 0,98a
acetato de isobutilo	0,00 ± 0,00a	3,29 ± 1,27b	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,55 ± 0,95a
butirato de etilo	0,00 ± 0,00a	9,87 ± 2,76c	7,59 ± 0,15bc	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a
lactato de etilo	64,20 ± 3,41e	62,15 ± 6,05de	52,01 ± 14,04d	5,12 ± 0,67a	26,40 ± 0,33b	14,34 ± 19,29a
2-3 butanodiol	363,78 ± 5,02a	439,67 ± 33,02b	347,58 ± 29,72a	321,71 ± 11,94a	335,74 ± 13,30a	263,79 ± 10,37a
acetato de isoamilo	3,30 ± 0,29a	3,15 ± 0,94a	2,95 ± 0,43a	2,46 ± 0,07a	2,83 ± 0,47a	2,61 ± 0,30a
hexanol	8,05 ± 1,71b	4,90 ± 0,49ab	4,32 ± 0,24a	4,09 ± 0,30a	5,31 ± 1,71ab	4,35 ± 0,62a
alcohol 2-feniletílico	159,12 ± 0,69b	204,84 ± 7,51b	150,88 ± 22,17b	95,27 ± 4,45a	142,01 ± 37,16b	85,52 ± 12,72a
acetato 2-feniletílico	10,71 ± 0,68bc	10,71 ± 1,03bc	10,91 ± 1,46c	6,66 ± 0,23a	9,58 ± 0,97bc	7,73 ± 1,89a

Los valores representan el promedio ± su desviación estándar y las letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas para un nivel de significación <0,05, según el test de LSD. S.c: *Saccharomyces cerevisiae* 7VA; L.t: *Lachancea thermotolerans* kt 421; S.p: *Schizosaccharomyces pombe* 938; S.l: *Saccharomyces ludwigii* 979; T.d: *Torulaspora delbrueckii* 291. Los valores de los compuestos volátiles están en mg/L.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

El rango de pH registrado en las diferentes cervezas maduras osciló entre 4,07-4,18, siendo *L. thermotolerans* la que menor pH registró, posiblemente por su capacidad de generar ácido láctico [Domizio et al., 2016](#). En contraste, *S. pombe* fue la que mayor pH presentó. Si se comparan estos valores con los obtenidos por [Polshin et al., 2010](#), que realizó un estudio con varias cervezas, obtuvo un rango de 3,35-4,56, por lo tanto, se encuentran dentro del rango esperado.

En cuanto al grado alcohólico, teniendo en cuenta que se añadió 7 gr/L de glucosa para la refermentación en botella, no se esperaba una subida tan importante, ya que, de normal, unos 18 gr de azúcar suponen una subida de 1 grado alcohólico, por lo que se podría esperar una subida de unos 0,4 grados. Este aumento se puede explicar por varios motivos, uno de ellos es que el método utilizado no posea una elevada precisión, y otra, es que la cerveza verde aun contuviera azúcares fermentables por las levaduras. Dicha cerveza verde partía con 5,9, y se vio incrementada en 0,9 de media en todas las levaduras (6,8) exceptuando *S. pombe*, que destaca por un grado alcohólico de 7,5 un valor mucho más alto. El motivo de que *S. pombe*, alcance un grado alcohólico tan alto puede explicarse debido a que es capaz de fermentar determinados azúcares que las demás levaduras no pueden. Además, tiene la capacidad de poder realizar la fermentación maloalcohólica, es decir consumir ácido málico y transformarlo en etanol, lo que da lugar a un incremento en ~~subiendo~~ el grado alcohólico. ([Phillips, 1995](#), [Benito et al., 2012](#)).

En el caso de *S. ludwigii*, se ha demostrado que no puede fermentar maltosa ni maltotriosa, dando lugar a bajas concentraciones de etanol, razón por la cual se está utilizando para elaborar cervezas bajas en alcohol ([Kurtzman & Fell, 1998](#); [Gibson, 2011](#); [Basso et al., 2016](#)). En este caso presenta un grado alcohólico similar a 6,8, lo que confirma que la curva de macerado ha sido correcta y ha convertido la maltosa en glucosa. *L. thermotolerans*, a pesar de presentar un poder fermentativo medio, su grado alcohólico final, no se ve afectado, respecto al resto.

Como se ha comentado con anterioridad, para discutir los valores de los componentes volátiles, se recurre a comentar las familias más importantes de compuestos, para ello se presenta la [Tabla 13](#), donde se recogen las concentraciones, en conjunto, de los alcoholes superiores, ésteres y volátiles totales de fermentación.

Tabla 13: Concentraciones totales de las principales familias de componentes volátiles de fermentación en mg/L.

MEDIA ± DESV ANOVA	S.c	L.t	S.l.	S.p	T.d
Alcoholes superiores	399,63 ± 9,06c	482,29 ± 7,50d	354,06 ± 40,26bc	285,94 ± 6,83a	340,12 ± 46,67b
Ésteres	106,33 ± 3,73d	122,64 ± 11,98e	96,73 ± 13,27d	37,48 ± 0,78a	62,54 ± 1,21b
Volátiles totales	966,26 ± 14,46c	1.151,88 ± 28,86d	878,61 ± 83,46b	737,10 ± 19,09a	816,67 ± 63,52ab

Los componentes carbonilos más importantes encontrados en cerveza son el acetaldehído y el diacetilo. Las diferencias significativas en cuanto al acetaldehído son muy grandes, *L. thermotolerans* con valores rondando los 30mg/L, frente a *T. delbrueckii* que no llega a los 10 mg/L, esto puede ser debido a las diferencias en el metabolismo de las levaduras o que se trata de es un componente muy volátil difícil de cuantificar por este método, ya que se suele quedar atrapado en el espacio de cabeza. En cerveza suele percibirse en concentraciones de 20 mg/L y proporciona aromas a manzana o manzana verde. Destaca la baja producción de este compuesto, en comparación con la cerveza verde, de *S. ludwigii* y de *T. delbrueckii*, en especial de esta última, ya que en un estudio de [Canónico et al., 2016](#), se obtuvo resultados más altos en *T.delbueckii* que en el control con *S. cerevisiae*. Por otro lado, el diacetilo, que juega un papel clave en el flavor de la cerveza, siendo el responsable de aromas a mantequilla y de otros indeseables aromas ([Callejo et al., 2017](#)) es una ketona que se produce debido al anabolismo del aminoácido valina, y, en condiciones de maduración en botella se transforma normalmente en a su respectivo alcohol 2,3 butanodiol, o al precursor acetoina, por la acción del enzima aldocetoreductasa ([Morata,2004](#)). Debido a la complejidad de las cepas utilizadas en este estudio no se encuentra una relación directa entre el diacetilo y sus compuestos asociados a su ruta metabólica. El valor más alto lo presentan *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans* con valores que rondan los 8 mg/L. Por otro lado, *S.pombe* y *T. delbrueckii* no llegan a los 2 mg/L, si se comparan con los datos de la cerveza verde, 2,76 mg/L, aumentan en el caso de *S. cerevisiae*, *L.*

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

thermotolerans y *S. ludwigii*. Sin embargo, en las otras dos levaduras, *S.pombe* y *T. delbrueckii*, disminuye. Estos valores son muy altos comparados con los datos obtenidos en cervezas maduras en botellas por [Saison et al, 2010](#), con valores de 1,4 mg/L. Una de las posibles explicaciones es que el diacetilo es un pico de un tamaño muy pequeño, por lo que es complicado normalmente integrarlo con el GF-FID, lo que sugiere que no es la mejor opción para cuantificarlo. Además, su concentración de percepción en cerveza es muy bajo (de 0,01-0,4 mg/L). Otro de los componentes carbonilo importante es la acetoina, que aporta aromas y sabores a frutado, mohoso y leñoso; su contenido normal en cerveza es de 1-10 mg/L, y, en este caso, se han obtenido valores que rondan los 5.5-7,5 mg/L, por lo que se encuentran dentro de los valores esperados ([Briggs et al., 2004](#); [Bamforth, 2004](#)).

En cuanto a la familia de los alcoholes superiores, estos sí que se pueden comentar en conjunto. La producción de estos tipos de alcoholes superiores está relacionada con la asimilación de nitrógeno y también con el consumo y producción de aminoácidos. ([Callejo et al., 2017](#)). La **tabla 13** destaca *L. thermotolerans* con el valor más alto, 482 mg/L aproximadamente, frente a *S. Pombe* con el valor más bajo, con casi 286 mg/L. Los alcoholes superiores que más influyen en cerveza son 1- propanol, el isobutanol y el alcohol 2-feniletilo. Atendiendo al 1- propanol, este compuesto contribuye al aroma, otorgando un alcohol dulce, y suele detectarse con concentraciones de 3-16 mg/L en cerveza. Los datos que presentan las levaduras de este estudio son ligeramente superiores, entre 22 y 40 mg/L, aunque el límite está en 600 mg/L. Por otro lado, el isobutanol otorga aromas a vinoso, plátano y dulce, su concentración de percepción es de 30-70 mg/L, los datos obtenidos en este estudio oscilan entre 40-75 mg/L, quedando dentro de los valores esperados, el límite es de 100 mg/L. Por último, el alcohol 2-feniletilo, se describe con el aroma a pétalos de rosas, amargo, perfumado, suele detectarse en cerveza entre 8-35mg/L, los datos en el presente estudio oscilan entre 85-205 mg/L, es decir, se han obtenido niveles muy superiores en comparación con otros estudios. ([Bamforth, 2004](#); [Michel et al., 2016](#)).

Los ésteres son los componentes que afectan directamente al aroma de la cerveza, se producen por la interacción de un ácido orgánico más un alcohol. De nuevo también se pueden tratar como una familia conjunta, que aporta información sobre la cantidad de fuerza aromática que es capaz de aportar una levadura. En este caso, aunque todas las levaduras presentan diferencias significativas entre ellas, destaca *L. thermotolerans* con 122 mg/L frente a *S. pombe* con 37,5 mg/L solo. Los más importantes en cerveza son: acetato de etilo (etanol+ ácido

acético), acetato de isoamilo (Isobutanol + ácido acético) y acetato 2-feniletilo. El acetato de etilo con aroma a fruta a concentraciones bajas y en concentraciones altas a solvente, se encuentra normalmente en rangos detectables de 30-33 mg/L (Michel et al., 2016), destacando que *L. thermotolerans* se quedó en el límite de percepción. Pero si se comparan los valores obtenidos por las levaduras con la cerveza verde, se aprecia que en todas se vio incrementada la concentración de este compuesto, potenciándose así el aroma. El acetato de isoamilo es el principal éster con aroma a plátano o manzana muy característico con un bajo umbral de percepción (entre 0,4-4 mg/L) (Bamforth, 2004). En el particular caso de las cepas de este estudio, todas se encuentran dentro del rango de percepción, entre 2,4 y 3,3 mg/L no presentando diferencias significativas entre ellas. El acetato 2-feniletilo, típico aroma a pétalos de rosa o miel, posee un rango de perfección bajo, entre 0,2-2 mg/L (Bamforth, 2004), sin embargo, el rango que presentan las cepas utilizadas oscila entre 6,6-11 mg/L, algo más alto.

Por último, el valor de los volátiles totales nos aporta información acerca de la producción de metabolitos de fermentación de cada levadura. Es decir, nos indica qué levadura es capaz de producir una mayor cantidad de metabolitos durante la fermentación y por ello cual debería tener un perfil aromático más marcado. El orden de menor a mayor concentración de volátiles es el siguiente: *S. pombe*, *T. delbrueckii*, *S. ludwigii*, *S. cerevisiae* y por último *L. thermotolerans*. Lo que concuerda con la explicación de las demás familias y compuestos de interés, anteriormente comentada, donde en casi en todos, *L. thermotolerans* ha presentado valores superiores y *S. pombe* valores inferiores.

3.1.2. A las 9 semanas de maduración o guarda.

La **tabla 14**, recoge los todos los valores de pH, grado alcohólico y compuestos volátiles para cada una de las levaduras empleadas, en esta ocasión, en un tiempo de maduración de 9 semanas.

Los valores de pH y el grado alcohólico al tener valores muy parecidos a los anteriormente comentados, y con el objetivo de no repetirse en la discusión de los resultados, se comentarán más adelante, en la influencia del tiempo de guarda, donde se compararán ambas analíticas y se analizarán las diferencias encontradas.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

Tabla 14: Resultados de la analítica instrumental: pH, grado alcohólico y compuestos volátiles (mg/L)

Parámetro /Levadura	S.c	L.t	S.l.	S.p	T.d	Cerveza verde
pH	4,03 ± 0,02a	4,02 ± 0,04a	4,11 ± 0,06a	4,25 ± 0,01b	4,12 ± 0,01a	4,11 ± 0,02a
º Alcohólico (%v/v)	7	6,9	6,8	7,8	6,9	5,9
acetaldehído	19,81 ± 2,50b	23,32 ± 2,08c	16,36 ± 0,59a	28,34 ± 1,01d	20,76 ± 0,90bc	8,67 ± 0,46a
metanol	6,88 ± 0,45b	6,44 ± 0,33b	6,35 ± 0,07b	5,12 ± 0,86ª	6,36 ± 0,80b	5,03 ± 0,52a
1-propanol	33,52 ± 3,34b	33,61 ± 3,85b	29,25 ± 0,64a	30,98 ± 0,70ab	27,90 ± 0,65a	22,32 ± 0,98a
diacetilo	2,86 ± 1,12bc	2,62 ± 0,78bc	1,42 ± 0,05a	1,51 ± 0,1ª	3,35 ± 1,44c	2,76 ± 0,90a
acetato de etilo	25,86 ± 2,83bc	29,95 ± 3,33d	26,96 ± 0,54cd	24,15 ± 0,80bc	23,40 ± 1,91ab	15,74 ± 1,50a
2-butanol	2,83 ± 0,04a	2,73 ± 0,14a	2,99 ± 0,08a	2,81 ± 0,11ª	2,91 ± 0,16a	0,00 ± 0,00a
isobutanol	44,04 ± 0,65a	49,59 ± 4,58a	44,88 ± 1,00a	43,41 ± 0,54ª	44,16 ± 4,08a	42,00 ± 10,14a
1-butanol	4,19 ± 0,13ab	4,45 ± 0,24b	4,07 ± 0,13a	4,14 ± 0,12ª	4,19 ± 0,17ab	2,69 ± 2,33a
acetoina	7,80 ± 0,63a	7,82 ± 0,15a	7,56 ± 0,06a	7,66 ± 0,12ª	7,32 ± 0,16a	5,51 ± 0,10a
2-metil-1-butanol	89,53 ± 10,10ab	97,32 ± 9,18b	82,39 ± 2,05a	79,13 ± 1,33ª	80,79 ± 4,34a	61,93 ± 2,46a
3-metil-1-butanol	44,90 ± 6,08bc	46,31 ± 4,43c	40,15 ± 0,85ab	37,87 ± 0,96ª	38,56 ± 2,15a	37,32 ± 0,98a
acetato de isobutilo	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,55 ± 0,95a
butirato de etilo	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a
lactato de etilo	25,20 ± 5,70c	21,72 ± 4,73c	11,15 ± 0,15b	5,90 ± 0,44ª	29,49 ± 2,54c	14,34 ± 19,29a
2-3 butanodiol	350,71 ± 26,08bc	344,49 ± 16,28c	302,35 ± 2,79ab	285,75 ± 6,35ª	307,54 ± 8,45ab	263,79 ± 10,37a
acetato de isoamilo	2,52 ± 0,07b	2,42 ± 0,24ab	2,41 ± 0,13ab	2,20 ± 0,10ª	2,39 ± 0,19ab	2,61 ± 0,30a
hexanol	4,68 ± 0,27c	4,38 ± 0,18bc	4,04 ± 0,13ab	3,81 ± 0,05ª	4,36 ± 0,38bc	4,35 ± 0,62a
alcohol 2-feniletílico	91,83 ± 4,31ab	88,89 ± 23,12ab	119,22 ± 35,03bc	70,76 ± 0,16ª	109,62 ± 20,79bc	85,52 ± 12,72a
acetato 2-feniletílico	7,98 ± 0,45bc	7,91 ± 0,33bc	7,76 ± 0,73bc	6,03 ± 0,40ª	8,97 ± 1,28c	7,73 ± 1,89a

Los valores representan el promedio ± su desviación estándar y las letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas para un nivel de significación <0,05, según el test de LSD. S.c: *Saccharomyces cerevisiae* 7VA; L.t: *Lachancea thermotolerans* kt 421; S.p: *Schizosaccharomyces pombe* 938; S.l: *Saccharomyces ludwigii* 979; T.d: *Torulaspora delbrueckii* 291. Los valores de los compuestos volátiles están en mg/L.

De nuevo, para facilitar la discusión de los componentes volátiles, se recurre a comentar las familias más importantes de estos compuestos, para ello se presenta la **Tabla 15**, donde se recogen las concentraciones, en conjunto, de los alcoholes superiores, ésteres y volátiles totales de fermentación.

Tabla 15: Concentraciones totales de las principales familias de componentes volátiles de fermentación en mg/L.

MEDIA ± DESV ANOVA	S.c	L.t	S.l.	S.p	T.d
Alcoholes superiores	310,85 ± 23,51ab	340,98 ± 14,94b	322,90 ± 43,12b	322,96 ± 30,44b	269,10 ± 3,76a
Ésteres	61,57 ± 8,69c	45,67 ± 5,61ab	61,99 ± 7,22c	48,27 ± 0,18b	38,28 ± 1,18a
Volátiles totales	760,48 ± 57,59b	735,94 ± 9,15b	769,58 ± 66,76b	703,85 ± 29,86ab	634,24 ± 12,07a

Continuando con la estrategia utilizada para comentar y discutir la analítica de las 4 semanas, primeramente, se describe la familia de los compuestos carbonilo, seguida de los alcoholes superiores, ésteres y finalizando con los volátiles totales.

El acetaldehído, el componente principal de la familia de los compuestos carbonilos, se encuentra en un rango de 16-28 mg/L, datos que se aproximan mucho a las concentraciones normales presentadas en cervezas (20mg/L) (**Bamforth, 2004**). En este caso, la levadura que mayores concentraciones presentó fue *S. pombe* y la que menos *S. ludwigii*. El acetaldehído es un intermediario de la fermentación alcohólica, que se puede relacionar con el aumento en el grado alcohólico experimentado, además, *S. pombe*, en concreto, se caracteriza por ser alta productora de acetaldehído y ácido pirúvico. Este particular caso, es muy útil en vinos, ya que son compuestos que interaccionan con los pigmentos, formando compuestos más coloreados y longevos, llamados piroantocianos, en concreto vitisinas (**Benito et al., 2012a; Benito et al., 2012b**). En cuanto a las concentraciones de diacetilo, estas oscilan en un rango de 3,35-1,42 mg/L. Tanto *S. pombe* y *S. ludwigii* presentaron los valores más bajos, con concentraciones

rondando 1,4 mg/L, estos valores son iguales a los obtenidos por [Saison et al., 2010](#). *T. delbrueckii*, fue la que mayor concentración mostró, lo que choca con la idea de que, esta levadura utilizada en vinos, muestra impactos positivos en términos de baja producción de compuestos indeseables, tales como acetaldehído, acetoina o diacetilo ([Comitini et al, 2011](#); [Loira et al, 2012](#)). La concentración de acetoina fue muy similar en todas las muestras, destacándose que, en comparación con la cerveza verde, se vio incrementada su concentración en todas.

Las concentraciones totales de alcoholes superiores presentan diferencias significativas entre las diferentes cepas utilizadas, destacando de nuevo *L. thermotolerans* como la cepa más productora y *T. delbrueckii* como la que menos, siendo la diferencia cercana a los 80mg/L. En cuanto a la concentración de los principales alcoholes superiores, el 1-propanol presenta volares muy parecido en todas las muestras, rondando los 30 mg/L, en todos los casos se ve aumentada su concentración respecto a la cerveza verde, otorga aromas a alcohol y fruta madura ([Loira, 2014](#)). Por otro lado, el isobutanol, con concentraciones cercanas a los 44mg/L, casi no ha variado frente a la concentración presente en la cerveza verde, aunque se encuentra dentro del umbral de detección 30-70mg/L, por lo que deberá repercutir en el aroma, aportando matices vinosos, a plátano y dulce ([Briggs et al., 2004](#); [Bamforth, 2004](#)). Por último, el alcohol-2feniletilo, presenta valores que oscilan entre 70-120 mg/L, siendo *S. ludwigii* la de mayor concentración y *S. pombe* la de menor. El límite de detección es de 8-35 mg/L, por lo que se puede esperar que tenga una influencia importante en el aroma final, aportando matices rosados de rosa, amargos y perfumados. Sin embargo, sí que se encuentran diferencias significativas entre *T. delbrueckii* y *S. pombe*, con valores de 8,9 mg/L y 6,1 mg/L respectivamente. Esto indica que al sobrepasarse el umbral de detección tendrán un impacto importante en el aroma final de la cerveza.

En cuanto a la cantidad total de volátiles de fermentación, no se encuentran diferencias significativas entre las distintas muestras, aunque se ha de destacar a *S. ludwigii*, con el valor más alto, y a *T. delbrueckii*, con el valor más bajo.

3.2. Resultados Sensoriales

Los resultados obtenidos de las diferentes catas se comentan y discuten en el siguiente apartado. En primer lugar, se han resaltados los valores superiores e inferiores obtenidos por

cada una de las levaduras empleadas y posteriormente se remarcan las diferencias significativas encontradas. Se comentan y discuten los resultados de ambas catas por separado.

3.2.1. A las 4 semanas de maduración o guarda.

A continuación, utilizando el nombre de la levadura empleada en cada cerveza, se resaltan los valores máximos y mínimos de cada parámetro o atributo, y los comentarios que los jueces realizaron durante la cata.

- *S. cerevisiae*:

Los parámetros donde obtuvo valores superiores al resto de las cervezas fueron: en el perfil de aromas a levadura, caramelo y plátano. En cuanto a los sabores, destacó por su carácter dulce. Los parámetros con valores inferiores al resto de cervezas fueron: color de la cerveza, efervescencia, acidez, cuerpo y astringencia.

Un juez comentó que detectaba olor a clavo, también se expuso que se parecía a las cervezas de trigo alemana, cuyo olor es, característico de este tipo de estilos. Otro de los jueces la encontró muy plana y sin ningún flavor que sobresaliera.

- *L. Thermotolerans*:

Fue la única levadura que no obtuvo ningún valor superior al resto. Pero si presentó bastantes valores inferiores, en consistencia de espuma, persistencia de espuma, aroma a caramelo, plátano, intensidad aromática y en valoración global.

Los jueces destacaron la falta de intensidad en la espuma y el aroma a cereal crudo. Perfil aromático y de sabor muy plano. Otro juez detectó aroma a pepita o fruta madura.

- *S. Ludwigii*

Los parámetros donde obtuvo valores superiores a las demás levaduras fueron: el aroma a malta y el amargor. De igual modo, el parámetro con valores inferiores al resto fue el de la turbidez.

Los comentarios de los jueces fueron variados, destacando un carácter afrutado intenso, además de amargor. Por otro lado, cabe resaltar que uno de los jueces comentó que era equilibrada en boca.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- S. pombe:

Los parámetros donde destacó frente a las restantes levaduras fueron: turbidez, consistencia de espuma, persistencia de espuma, color de espuma, efervescencia, lúpulo, intensidad aromática, acidez, cuerpo, retrogusto y valoración global. Presentó valores inferiores en los parámetros de aroma a lavadura y dulzor.

Uno de los jueces destacó su gran persistencia en boca, casi todos coincidieron en una mayor espuma y efervescencia. Cuatro de ellos destacaron que era la que más les gustaba. Otro juez la definió como fina, limpia y elegante. En conjunto recalcaron su perfil aromático poco complejo y afrutado y su alto nivel de carbónico.

- T. Delbrueckii

Destacó, con valores superiores, en el color de la cerveza y en la astringencia y en cuanto los valores inferiores, solo se resaltó un aroma a malta.

Los jueces destacaron su aroma a vegetal y afrutado. Un juez percibió retrogusto a frutas rojas. Otro juez destacó su buen perfil en nariz y su sabor complejo. Sin embargo, otra de las respuestas fue su pobreza en aromas.

Seguidamente se presenta la **tabla 16**, donde se recoge los datos de las valoraciones de cada juez, para proceder a discutir los atributos donde se hayan encontrado diferencias significativas y las posibles causas de las mismas.

El primer atributo donde se observan diferencias significativas es en el de turbidez, destacando *S pombe*, con hasta 3 puntos de diferencia con respecto a las otras levaduras, en concreto *S. ludwigii*. Esto puede ser debido principalmente al gran tamaño celular que presenta y a los polisacáridos de membrana, que se encuentran en un número elevado en este tipo de levaduras, **Benito et al., 2012**. Otro de los parámetros a tener en cuenta es la elevada efervescencia que presentó, lo que pudo ocasionar que, al abrir la botella, la fuerza provocada por el gas, impulsara a las lías del fondo de la botella y las mezclara con la cerveza, aumentando significativamente la turbidez respecto a los otros casos.

Tabla 16: Resultados del análisis sensorial de las cervezas finalizadas con 4 semanas de maduración

MED + DES + ANOVA	S.c	L.t	S.l.	S.p	T.d
Color de la cerveza	4,18 ± 1,40a	4,29 ± 1,92a	5,31 ± 1,52a	4,61 ± 2,15a	5,33 ± 2,69a
Turbidez	4,64 ± 2,26a	4,55 ± 2,54a	4,04 ± 2,18a	6,99 ± 1,07b	5,06 ± 2,35ab
Consistencia de espuma	2,98 ± 2,69a	2,05 ± 1,19a	2,81 ± 1,43a	5,07 ± 2,28b	3,02 ± 1,68a
Persistencia de espuma	3,10 ± 2,55ab	1,84 ± 0,89a	2,93 ± 1,98ab	3,85 ± 1,88b	3,04 ± 1,44ab
Color de espuma	1,23 ± 1,16a	1,34 ± 0,83a	1,84 ± 1,37a	1,98 ± 1,34a	1,69 ± 1,80a
Efervescencia	1,57 ± 1,14a	1,76 ± 1,19ab	2,43 ± 1,38ab	4,36 ± 1,00c	2,91 ± 1,07b
Malta	3,88 ± 1,68a	2,66 ± 2,09a	3,54 ± 2,38a	2,61 ± 1,67a	2,10 ± 1,62a
Levadura	2,48 ± 2,11a	1,91 ± 1,60a	2,44 ± 2,32a	1,58 ± 2,09a	1,86 ± 2,03a
Caramelo	2,44 ± 1,87a	0,93 ± 0,74a	1,48 ± 1,74a	1,38 ± 1,18a	1,53 ± 1,84a
Plátano	1,46 ± 0,95a	1,20 ± 0,87a	1,40 ± 1,40a	1,26 ± 1,20a	1,45 ± 1,85a
Lúpulo	4,10 ± 1,93ab	3,14 ± 2,02ab	3,70 ± 1,61ab	5,13 ± 2,78b	2,84 ± 1,80a
Intensidad aromática	4,64 ± 0,87ab	3,41 ± 1,51a	4,70 ± 2,44ab	5,80 ± 1,54b	5,08 ± 2,38ab
Amargor	3,56 ± 2,03a	3,65 ± 2,60a	4,58 ± 2,45a	4,20 ± 2,24a	3,10 ± 2,15a
Dulzor	2,87 ± 1,51a	2,75 ± 1,18a	2,36 ± 1,04a	2,15 ± 1,07a	2,20 ± 0,77a
Acidez	2,17 ± 1,35a	2,73 ± 1,01ab	2,64 ± 0,87ab	3,75 ± 2,25b	2,46 ± 1,60ab
Cuerpo	2,85 ± 1,33a	2,99 ± 1,03a	4,14 ± 1,22ab	4,65 ± 1,78b	4,15 ± 1,36ab
Astringencia	1,65 ± 1,14a	1,89 ± 1,69a	2,01 ± 1,43a	2,00 ± 1,22a	2,48 ± 1,98a
Retrogusto	3,37 ± 1,95a	4,45 ± 1,82ab	4,60 ± 1,43ab	5,43 ± 2,17b	5,10 ± 2,46ab
Valoración global	4,85 ± 1,88ab	4,48 ± 2,03a	5,16 ± 1,61ab	6,58 ± 1,51b	4,68 ± 2,26ab

Los valores representan el promedio ± su desviación estándar y las letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas para un nivel de significación <0,05, según el test de LSD. S.c: *Saccharomyces cerevisiae* 7VA; L.t: *Lachancea thermotolerans* kt 421; S.p: *Schizosaccharomyces pombe* 938; S.l: *Saccharomycodes ludwigii* 979; T.d: *Torulaspora delbrueckii* 291.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

Los atributos de **efervescencia, consistencia y persistencia de la espuma** son más elevados en las levaduras que presentan un mayor poder fermentativo, ya que están directamente relacionados con la producción de CO₂, **Dowhanick, 2002**. En el caso de *S. pombe*, además, se produjo mayor cantidad de etanol, esto apoya la idea de que es capaz de fermentar más azúcares que el resto de levaduras y ácido málico, por la ruta maloalcohólica. En el otro lado *L. thermotolerans*, ha sido descrita en vinos por tener un poder fermentativo que oscila entre 4-9, es decir un poder fermentativo bajo, lo que explica perfectamente sus bajos valores en estos atributos, **Scott et al., 2017**

En cuanto a los atributos de olfato, solo se encuentran diferencias significativas en **la intensidad aromática**, de nuevo es *S. pombe*, la levadura que presentó diferencias significativas con el resto de levaduras empleadas. No se puede afirmar que los compuestos que participan de forma global en el perfil aromático proceden del metabolismo de las levaduras en su totalidad, **Saison et al., 2009**, pero si, en gran medida. Por ello un elevado poder fermentativo, se puede asociar también a un incremento en la producción de metabolitos secundarios que aumenten la intensidad aromática. Además, *S.pombe*, tiene la capacidad de liberar rápidamente polisacáridos y biopolímeros de su pared celular durante su autólisis, compuestos que pudieron contribuir en aumentar su intensidad aromática, **Palomero et al., 2009**. En el otro extremo, se encuentra *L. thermotolerans*, con un perfil aromático muy plano y una baja intensidad aromática.

El **cuerpo** es un atributo que depende de gran cantidad de compuestos, dextrinas, alcoholes superiores, aldehídos y cantidad de CO₂, principalmente. Por tanto, y de nuevo, *S. pombe* fue la que presentó grandes diferencias, en concreto destacar la diferencia con *S. cerevisiae*, una levadura que normalmente en vino presenta niveles altos de cuerpo, sobre todo en niveles altos de glicerol, **Loira et al., 2014**. Esta diferencia puede ser explicada debido a la alta cantidad de alcoholes superiores y CO₂ fruto de un poder fermentativo y una fermentación mayor. También pueden tener su influencia los polisacáridos y biopolímeros cedidos a la cerveza, durante la lisis de las levaduras, **Palomero et al., 2014**.

El valor menor de **retrogusto** lo presentó *S. cerevisiae*, destacando diferencias significativas con *S.pombe*, seguido por *T. delbrueckii*. La producción elevada de CO₂, puede favorecer la liberación de compuestos aromáticos con mayor facilidad, explicando la valoración más alta en el atributo de retrogusto. En cuanto al valor obtenido con *S. cerevisiae*, este puede entenderse por la

selección de esta cepa en particular, ya que como ya se ha comentado con anterioridad, se seleccionó para la elaboración de vinos, buscando que otorgase un perfil aromático bajo.

En líneas generales, como se ha observado, *S.pombe* es la levadura que mejores puntuaciones ha presentado para casi todos los atributos, *S. cerevisiae* y *L. thermotolerans* las que menores puntuaciones han registrado. *T. delbrueckii* se ha acercado en muchos atributos a los valores de *S. pombe*. Por último, *S. ludwigii* presentó valores medios, destacando un aroma reducido según los resultados obtenidos por los jueces en la cata llevada a cabo.

3.2.2. A las 9 semanas de maduración o guarda.

De igual modo que se han comentado y discutido los resultados a las 4 semanas, se realiza lo mismo con los resultados obtenidos a las 9 semanas. Primero, y de nuevo, se resaltan los valores superiores e inferiores que han presentado las diferentes levaduras empleadas.

- *S. cerevisiae*:

Los parámetros donde obtuvo valores superiores al resto de las cervezas fueron: en el perfil de aromas, en concreto a malta, levadura, caramelo y plátano. Mientras que el parámetro con valores inferiores fue el color de la espuma.

La opinión obtenida por parte de uno de los jueces fue que era gustosa, equilibrada y con un amargor persistente. Varios coincidieron en un intenso aroma y sabor a fruta sobre madura, como a manzana reineta.

- *L. Thermotolerans*:

Esta vez sí que presentó un valor superior en el atributo de astringencia. Obtuvo valores inferiores en color de la cerveza, turbidez, color de la espuma, aroma a levadura, amargor y en valoración global.

Los jueces destacaron el color amarillo y limpio de la cerveza. Además, encontraron notas de aroma a frutos secos.

- *S. Ludwigii*

No destacó por encima de ninguna otra levadura empleada en ningún atributo. Los parámetros con valores inferiores al resto fueron el de la consistencia de la espuma, persistencia de la espuma, efervescencia, aroma a caramelo y plátano.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

Los comentarios de los jueces fueron variados, recalcando un carácter afrutado. Según los resultados obtenidos tras la cata, uno de los jueces resaltó que era equilibrada en boca, mientras que otras opiniones coincidían en que tenía aroma reducido en copa parada y olor a sulfhídrico.

- S. pombe:

Los parámetros donde destacó frente a las otras levaduras fueron: consistencia de espuma, persistencia de espuma, color de espuma, efervescencia, lúpulo, intensidad aromática, amargor, cuerpo, retrogusto y valoración global. En cambio, no presentó valores inferiores para ningún atributo.

Casi todos los jueces coincidieron en que era agradable en nariz, intensa, con un aroma a uva madura. Por otro lado, también se destacó su gran equilibrio en boca y nariz. Uno de los jueces, sin embargo, le observó poco cuerpo.

- T. Delbrueckii

Destacó, con valores superiores, en el color de la cerveza, turbidez y acidez, en cuanto los valores inferiores, solo destacó en los aromas a malta, lúpulo e intensidad aromática.

Un juez comentó que le recordaba en olor a un melocotón o ciruela madura. Otro juez, la comparó con la *S. pombe* resaltando que solo le faltaba un poco en boca.

Por último, y con los datos recogidos en la **tabla 17**, se procede a discutir las diferencias significativas encontradas y su posible explicación.

El **color de la cerveza y la turbidez**, son atributos relacionados entre sí, que presentan diferencias significativas entre las levaduras empleadas. En el caso del color, se presenta una diferencia que alcanza los 4 puntos, y casi 3 en la turbidez, entre *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans*. En este caso los datos obtenidos para *T. delbrueckii* no coinciden con los datos expuestos en **Canonico et al., 2016**, donde presentó un color amarillo pálido y menor turbidez. Esto se puede explicar, como en el caso de la *S. pombe* (la cual le sigue de cerca en valoración) porque el envejecimiento con lías pueda influir en el color cediendo compuestos de alto peso molecular, como polisacáridos y biopolímeros a la cerveza, además de afectar directamente a la turbidez, **Palomero et al., 2014**. En el caso de *L. thermotolerans* la explicación puede venir por la bajada de pH, ya que fue la que obtuvo un valor más bajo y porque no está descrito que ceda componentes de alto peso molecular.

Tabla 17: Resultados del análisis sensorial de las cervezas finalizadas con 9 semanas de maduración

MED + DES + ANOVA	S.c	L.t	S.l.	S.p	T.d
Color de la cerveza	4,74 ± 1,41ab	3,22 ± 1,97a	5,68 ± 2,24bc	6,19 ± 2,21c	7,20 ± 1,11c
Turbidez	5,28 ± 2,00ab	3,94 ± 1,97a	4,44 ± 2,70a	6,16 ± 1,45b	6,17 ± 1,17b
Consistencia de espuma	3,87 ± 2,27ab	3,78 ± 1,98ab	2,73 ± 1,57a	6,11 ± 1,76c	2,78 ± 1,70a
Persistencia de espuma	2,48 ± 1,11ab	3,01 ± 2,06b	1,93 ± 1,13a	6,09 ± 2,02c	2,30 ± 1,16ab
Color de espuma	1,77 ± 1,38a	1,92 ± 1,27a	2,46 ± 2,06a	2,81 ± 2,12a	2,42 ± 1,89a
Efervescencia	3,01 ± 1,42bc	3,02 ± 1,50bc	1,70 ± 1,18a	4,13 ± 1,40c	2,61 ± 1,12b
Malta	3,67 ± 1,90a	2,85 ± 1,48a	3,31 ± 2,28a	3,61 ± 1,56a	2,61 ± 2,04a
Levadura	4,24 ± 2,62b	2,01 ± 1,36a	2,66 ± 1,84a	2,98 ± 1,46ab	2,26 ± 1,96a
Caramelo	2,63 ± 1,85a	2,26 ± 2,17a	1,81 ± 1,44a	1,88 ± 1,23a	2,37 ± 1,44a
Plátano	2,06 ± 1,90a	1,62 ± 1,20a	1,60 ± 1,72a	2,06 ± 2,11a	2,01 ± 1,63a
Lúpulo	3,38 ± 1,86a	3,92 ± 1,95a	3,28 ± 1,84a	4,26 ± 1,96a	3,08 ± 1,80a
Intensidad aromática	4,82 ± 1,44a	4,04 ± 1,83a	3,85 ± 1,83a	4,90 ± 1,64a	3,78 ± 2,00a
Amargor	4,21 ± 1,95a	3,44 ± 1,38a	4,11 ± 2,23a	4,51 ± 1,68a	4,04 ± 1,89a
Dulzor	3,89 ± 1,84a	3,96 ± 1,95a	2,89 ± 1,75a	3,56 ± 1,75a	4,02 ± 2,48a
Acidez	2,80 ± 1,25a	3,32 ± 2,16a	2,50 ± 1,49a	3,39 ± 1,81a	3,49 ± 2,02a
Cuerpo	4,71 ± 1,79a	4,08 ± 2,24a	3,35 ± 1,42a	5,06 ± 1,90b	4,41 ± 2,53b
Astringencia	2,66 ± 1,33a	3,08 ± 2,54a	2,62 ± 1,87a	2,82 ± 2,15a	2,57 ± 1,60a
Retrogusto	4,91 ± 1,79a	4,59 ± 2,07a	4,03 ± 1,42a	5,09 ± 2,11a	4,84 ± 1,66a
Valoración global	5,11 ± 2,15ab	4,31 ± 1,01a	4,75 ± 1,20ab	6,20 ± 1,37c	5,86 ± 1,67bc

Los valores representan el promedio ± su desviación estándar y las letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas para un nivel de significación <0,05, según el test de LSD. S.c: *Saccharomyces cerevisiae* 7VA; L.t: *Lachancea thermotolerans* kt 421; S.p: *Schizosaccharomyces pombe* 938; S.l: *Saccharomycodes ludwigii* 979; T.d: *Torulasporea delbrueckii* 291.

En los atributos de **consistencia, persistencia de la espuma y la efervescencia**, íntimamente relacionados, es *S. pombe* la que presenta diferencias significativas sobre todo con las levaduras *L. ludwigii* y *T. delbrueckii*. La explicación vuelve a estar en la capacidad de fermentar algún tipo de azúcar que no es capaz de fermentar ninguna otra levadura o incluso ácido málico, obteniendo mayor grado alcohólico y por lo consiguiente una mayor fuerza de CO₂.

En aromas en general no se presentan diferencias significativas entre las levaduras empleadas, pero si se destaca una en el aroma a **levadura**. *S. cerevisiae* presenta una valoración superior al resto en este aroma. Al ser una cepa que no posee un perfil aromático muy marcado, el aroma que más se acentúa es el de la propia levadura.

De nuevo respecto al atributo **cuerpo**, la *S. pombe* es la levadura que presenta diferencias significativas junto con *T. delbrueckii*. Como ya se ha ido comentado, muchos son los parámetros que pueden influir en el cuerpo de la cerveza, pero destacar la producción de CO₂, los polisacáridos cedidos en la autólisis de las levaduras y una mayor cantidad en alcoholes superiores.

En esta segunda analítica sensorial, de nuevo es *S. pombe* la que más puntuación ha presentado para casi todos los atributos, aunque seguida de *T. delbrueckii* en muchos casos. Esta vez, *L. thermotolerans* y *S. Ludwigii* son las que han presentado valores más bajos, quedando *S. cerevisiae* en un punto intermedio, destacando en el perfil aromático.

3.3. Correlación entre los resultados obtenidos del análisis instrumental y sensorial.

A través del siguiente apartado, se estudian las correlaciones entre los resultados obtenidos en el análisis instrumental y sensorial. Una vez realizado el análisis multivariable, se recogieron los resultados obtenidos en la **tabla 18**, se resaltan en negrita y con un fondo azul los resultados con un p-valor < 0,05, siendo estos diferentes según la correlación estadística.

En un primer lugar se resaltan las correlaciones encontradas tanto positivas como negativas, y posteriormente se discuten las que más influencia tienen en la cerveza.

Tabla 18: Análisis multivariable, matriz de correlaciones entre los parámetros instrumentales y sensoriales.

	Color cerveza	Turbidez	Consistencia espuma	Persistencia espuma	Color espuma	Efervescencia	Malta	Levadura	Caramelo	Plátano	Lúpulo	Intensidad aromática	Amargor	Dulzor	Acidez	Cuerpo	Astringencia	Retrogusto	Valoración global
pH	-0,24	0,99	0,90	0,68	0,44	0,81	-0,39	0,75	0,05	-0,30	0,73	0,68	0,02	-0,46	0,80	0,50	0,06	0,52	0,82
Grado alcohólico (%v/v)	-0,13	0,96	0,92	0,66	0,63	0,89	-0,34	-0,73	-0,23	-0,48	0,80	0,87	0,32	-0,56	0,94	0,63	0,03	0,63	0,93
Acetaldehído	-0,79	0,29	0,02	-0,36	-0,30	-0,04	-0,08	-0,40	-0,43	-0,88	-0,28	-0,43	0,08	0,41	0,43	-0,36	-0,53	-0,04	0,14
Metanol	-0,62	-0,33	-0,66	-0,83	-0,81	-0,65	-0,12	-0,03	-0,23	-0,41	-0,49	-0,85	-0,54	0,72	-0,36	-0,81	-0,29	-0,42	-0,66
1-propanol	-0,84	-0,26	-0,51	-0,71	-0,81	-0,63	0,19	0,09	-0,11	-0,50	-0,16	-0,80	-0,24	0,85	-0,22	-0,85	-0,64	-0,56	-0,44
Diacetilo	-0,80	-0,47	-0,58	-0,59	-0,93	-0,83	0,54	0,49	0,30	-0,09	-0,15	-0,74	-0,23	0,99	0,53	-0,97	-0,78	-0,87	-0,54
Acetato de etilo	-0,72	-0,36	-0,63	-0,82	-0,81	-0,68	0,08	0,08	-0,21	-0,48	-0,34	-0,88	-0,32	0,81	-0,30	-0,85	-0,50	-0,51	-0,57
2-butanol	0,60	0,00	-0,08	0,07	0,13	0,15	-0,66	-0,28	-0,02	0,46	-0,59	0,23	-0,69	-0,46	-0,27	0,28	0,88	0,36	-0,31
Isobutanol	-0,62	-0,32	-0,63	-0,87	-0,70	-0,59	-0,07	-0,05	-0,39	-0,59	-0,40	-0,89	-0,30	0,69	-0,20	-0,75	-0,37	-0,35	-0,55
1-butanol	-0,51	-0,48	-0,72	-0,92	-0,64	-0,65	0,06	0,10	-0,43	-0,57	-0,42	-0,95	-0,09	0,69	-0,24	-0,72	-0,40	-0,37	-0,58
Acetoína	-0,65	0,39	0,24	-0,29	-0,09	0,4	-0,19	-0,52	-0,57	-0,96	0,33	-0,32	-0,19	-0,21	0,59	-0,16	-0,41	0,16	0,28
2-metil-1-butanol	-0,71	-0,57	-0,71	-0,78	-0,89	-0,86	0,43	-0,43	0,06	-0,24	-0,30	-0,89	-0,18	0,96	-0,50	-0,95	-0,68	-0,77	-0,63
3-metil-1-butanol	-0,66	-0,62	-0,77	-0,80	-0,92	-0,90	0,40	0,46	0,09	-0,16	-0,39	-0,90	-0,26	0,96	0,58	-0,97	-0,62	-0,78	-0,71
Acetato de isobutilo	-0,46	-0,25	-0,57	-0,86	-0,48	-0,42	-0,23	-0,21	-0,63	-0,73	-0,40	-0,85	-0,16	0,49	-0,02	-0,54	-0,21	-0,10	-0,45
Butirato de etilo	-0,2	-0,57	-0,65	-0,80	-0,16	-0,45	0,10	0,20	-0,63	-0,51	-0,40	-0,78	0,37	0,32	-0,09	-0,30	-0,19	-0,09	-0,40
Lactato de etilo	-0,36	-0,87	-0,86	-0,76	-0,81	-0,98	0,62	0,77	0,23	0,14	-0,46	-0,83	-0,07	0,88	-0,77	-0,88	-0,56	-0,86	-0,77
2,3-butanodiol	-0,54	-0,49	-0,74	-0,93	-0,71	-0,70	0,05	0,11	-0,38	-0,51	-0,47	-0,96	-0,20	0,73	-0,30	-0,77	-0,39	-0,42	-0,63
Acetato de isoamilo	-0,41	-0,81	-0,83	-0,67	-0,91	-0,99	0,57	0,74	0,39	0,27	-0,49	-0,77	-0,30	0,91	-0,86	-0,93	-0,52	-0,91	-0,82
Hexanol	-0,50	-0,31	-0,28	-0,05	-0,79	-0,63	0,54	0,57	0,85	0,57	-0,07	-0,8	-0,50	0,71	-0,71	-0,48	-0,86	-0,43	-0,72
Alcohol 2-feniletílico	-0,31	-0,77	-0,94	-0,97	-0,77	-0,88	0,16	0,39	-0,19	-0,17	-0,70	-0,99	-0,29	0,75	-0,63	-0,82	-0,28	-0,56	-0,87
Acetato 2-feniletílico	0,00	-0,99	-0,94	-0,73	-0,66	-0,94	0,48	0,79	0,18	0,34	-0,69	-0,77	-0,14	0,67	-0,88	-0,70	-0,24	-0,71	-0,88
Alcoholes superiores	-0,51	-0,64	-0,85	-0,94	-0,83	-0,85	0,18	0,31	-0,17	-0,29	-0,55	-0,98	-0,29	0,83	-0,53	-0,88	-0,42	-0,60	-0,77
Ésteres	-0,39	-0,84	-0,88	-0,84	-0,79	-0,95	0,51	0,65	0,04	-0,04	0,49	-0,92	-0,06	0,87	-0,67	-0,87	-0,53	-0,76	-0,77
Volátiles totales	-0,55	-0,62	-0,82	-0,92	-0,81	-0,83	0,22	0,31	-0,19	-0,34	-0,49	-0,98	-0,21	0,84	-0,47	-0,87	-0,48	-0,59	-0,72

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

Las correlaciones positivas con significancia estadística fueron: turbidez con pH y grado alcohólico; consistencia de espuma con pH y grado alcohólico; dulzor con diacetilo, 2 y 3 –metil-1-butanol y acetato de isoamilo; acidez y el grado alcohólico.

Las correlaciones negativas con significancia estadística fueron: turbidez con acetato 2-feniletilo; consistencia de espuma con alcohol 2-feniletilo y acetato 2-feniletilo; persistencia de espuma con 1-butanol, 2,3-butanodiol y alcohol 2-feniletilo; Color de la espuma con diacetilo y 3-metil-1-butanol; efervescencia 3-metil-1-butanol, lactato de etilo, acetato de isoamilo y acetato 2-feniletilo, plátano y acetoina; intensidad aromática con 1-butanodiol, 3-metil-1-butanol, 2,3-butanodiol, alcohol 2-feniletílico, alcoholes superiores, y volátiles totales; cuerpo con diacetilo, 2,3-metil-1-butanol y acetato de isoamilo; Retrogusto con acetato de isoamilo.

En cuanto a las principales correlaciones que se encuentran, la primera que se destaca, es la correlación positiva entre el grado alcohólico y pH con la turbidez y consistencia de la espuma. Lo que se relaciona con que un mayor poder fermentativo, traducido a un aumento de etanol, también influye en un aumento de producción de CO₂, lo que favorece de forma directa la consistencia de la espuma, pero, además, también significa una tasa mayor de población de levadura, lo que afecta positivamente a la turbidez.

Sin embargo, las correlaciones negativas de los mismos parámetros respecto a la concentración de alcohol 2-feniletílico y acetato 2-feniletilo, siendo este último un sustituto de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular, apoya la teoría de que frente a un medio sin oxígeno y con recursos energéticos limitados las levaduras puedan fermentar y crecer, aumentando así su población.

La relación negativa entre la efervescencia y la concentración total de ésteres, puede significar, que, si se presenta una mayor efervescencia, es decir, un poder fermentativo mayor, que genere más CO₂, puede estar relacionado con la reducción de compuestos secundarios de fermentación, en concreto los que mayor influencia tienen en el aroma de la cerveza.

La intensidad aromática y su correlación negativa con varios tipos de alcoholes y con la concentración total de alcoholes superiores, tiene sentido, ya que los alcoholes superiores, al reaccionar con los ácidos orgánicos, forman los ésteres. Compuestos que como se ha comentado, juegan un papel crucial en el perfil aromático y en su intensidad. Por lo tanto, una mayor cantidad de alcoholes superiores, significa que una menor cantidad de ésteres se habrán formado, por ende, menor intensidad aromática.

El dulzor destaca por su correlación positiva con los alcoholes 2,3 metil-1- butanol, lo que tiene sentido ya que el aumento en la concentración de este tipo de alcoholes otorga a la cerveza una sensación de suavidad y dulzor.

Por último, la correlación negativa entre el cuerpo y la concentración de diacetilo, aparece debido a *S.pombe*, la cual destacó por la menor concentración de diacetilo y por el mayor valor en cuerpo. Aun así, una hipótesis posible es que el diacetilo disminuye por la acción de las levaduras en la maduración, así que una mayor cantidad de ellas y un mayor poder fermentativo, disminuirá la cantidad de diacetilo a la vez que influye positivamente en la sensación de cuerpo.

3.4. Influencia del tiempo de maduración en botella

En el siguiente apartado se pretende comentar y discutir la influencia del tiempo de maduración o guarda en botella. Para ello, se comparan los datos de las dos analíticas, 4 semanas frente a 9 semanas, tanto a nivel sensorial como instrumental, con el objetivo de encontrar las diferencias más importantes, para, posteriormente, justificarlas. Además, también se incorporan comentarios del comportamiento de las diferentes levaduras empleadas frente al tiempo.

Los parámetros donde se han encontrado diferencias significativas son los siguientes:

- El Ph y grado alcohólico:

El pH, en teoría, no debería variar mucho en la guarda, pero utilizando levaduras *no-Saccharomyces* capaces de degradar o producir ácidos orgánicos se debe tener en cuenta. Por ejemplo, se puede observar en la cerveza refermentada por *L. thermotolerans*, un descenso pequeño del pH a lo largo del tiempo, debido a la producción de ácido láctico, esta diferencia no es más significativa ya que solo se ha utilizado dicha cepa en la refermentación con 7 gr de glucosa añadida. Pero si esta se utilizase en la fermentación principal, estaríamos hablando de un descenso importante y por ello un posible uso para las cervezas tipo *lambic* o ácidas. Sin embargo, en el otro extremo, se encuentra *S. pombe*, que debido a su capacidad de realizar la fermentación maloalcohólica, es decir degradar el ácido málico a etanol, lo que supone una desacidificación biológica, repercute en una subida del pH, como se puede observar en los resultados obtenidos (Morata et al., 2012; Domizio et al., 2016; Callejo et al., 2017).

En la evolución del grado alcohólico, ocurre lo mismo, es decir no debería variar con el tiempo ya que una vez se acaban los compuestos fermentables añadidos, las levaduras no producen

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

más etanol. Pero de nuevo, la incorporación de levaduras *no-Saccharomyces* al ser metabólicamente tan diferentes, existe la posibilidad de que sean capaces de fermentar azúcares que una *Saccharomyces* no pueda consumir, por ello, en el tiempo, puede aumentar el grado alcohólico. En concreto, *S. pombe*, que ha presentado diferencias positivas en el grado alcohólico entre las dos analíticas, ocurre que además de poder fermentar otros azúcares es capaz de fermentar el ácido málico como se ha comentado.

- **Compuestos volátiles de fermentación:**

Los niveles de diacetilo entre las 4 y las 9 semanas se ven reducidos significativamente. Esto apoya la teoría de la influencia del tiempo en la guarda, ya que el objetivo principal de la maduración es la de transformar una cerveza verde y con defectos olfativos en un producto estable y con un aroma y sabor apetecible, por ello los compuestos que se deben reducir, al considerarse indeseables en la cerveza, son el diacetilo y acetaldehído. El diacetilo es un compuesto producido por las levaduras en la fermentación principal y degradado después por ellas mismas, en un proceso microbiológico natural. Otorga sabores desagradables a mantequilla, primero se reduce a acetoina y por último a 2-3 butanodiol, un alcohol con poco carácter aromático (Gigliarelli, 2018)

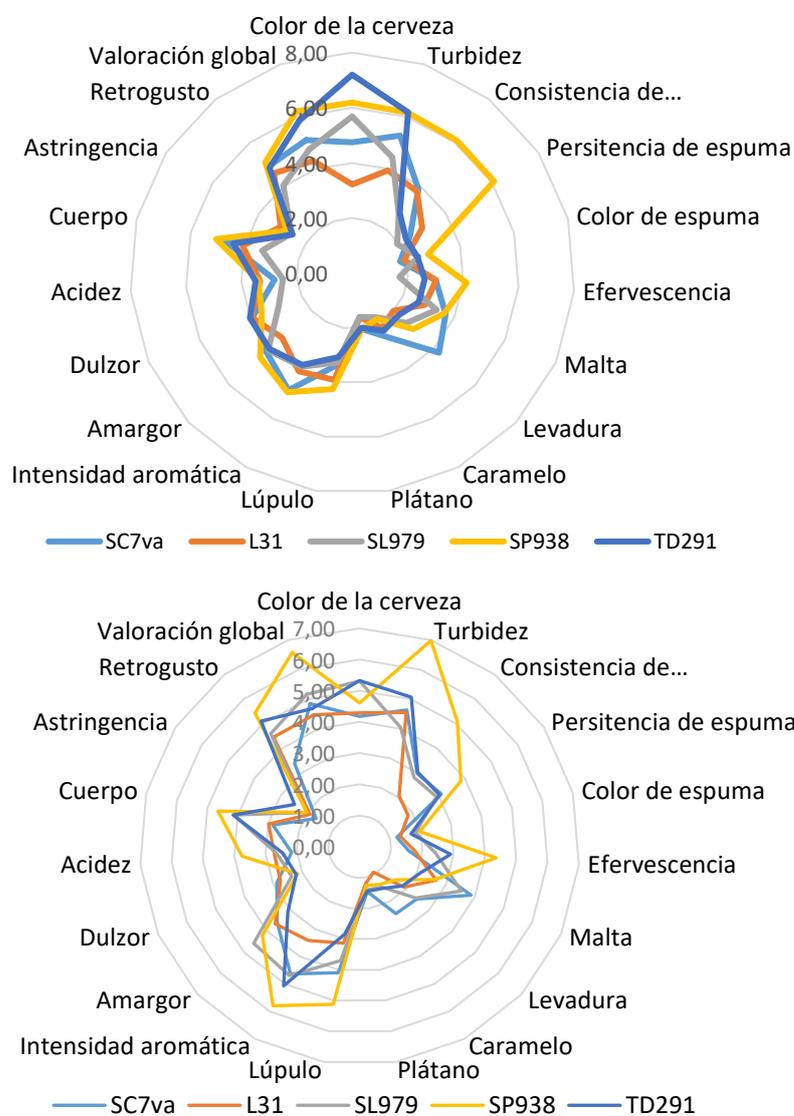
El acetaldehído, también debe reducirse en la guarda, los resultados obtenidos en el presente estudio no son concluyentes, ya que como se ha comentado, es un producto difícil de medir y que, además, puede verse modificada su concentración por la reducción del etanol a etanal. Aporta aromas a manzana verde, hierva, áspero....

En general, comparando los datos totales de alcoholes superiores, ésteres y compuestos volátiles, los resultados son una disminución considerable en las concentraciones de todos ellos. Esto es interesante ya que a las 4 semanas se considera que la refermentación ya ha acabado, por lo que es cuando mayor concentración de compuestos presenta, posteriormente, al acabarse los nutrientes, las levaduras entran en un proceso de estrés que puede hacer que reabsorban determinados compuestos para intentar sobrevivir. Además, el aire del espacio de cabeza, puede hacer que algunos compuestos al ser volátiles se oxiden en contacto con oxígeno y se vean modificados.

- **Atributos sensoriales:**

Para facilitar el comentario, ver **Gráfico 1**, en él se facilita los dos gráficos de tela de araña realizados con los datos recogidos en el análisis sensorial. Como se puede observar la influencia del tiempo en las valoraciones de los diferentes atributos por parte de los jueces es poco significativa. Solo remarcando que las diferencias entre las cepas, con el paso del tiempo, se hacen más livianas, llegando a redondearse. Esta hipótesis se refleja sobre todo en valores de efervescencia, espuma y turbidez.

Gráfico 1: Tela de araña de las dos analíticas sensoriales, a 4 semanas (1ª) y a 9 semanas (2ª).



4. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este trabajo fin de máster permiten obtener las siguientes conclusiones:

El protocolo de elaboración de cerveza se ha optimizado correctamente, elaborando dos cervezas verdes idénticas, para su posterior refermentación en botella con géneros de levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*.

Las levaduras utilizadas en este estudio, han mostrado diferencias significativas en los parámetros tanto instrumentales como sensoriales, lo que se ha visto traducido en un producto final, la cerveza, diferente en todas ellas.

S. pombe demostró una capacidad de refermentación mayor que el resto de levaduras, lo que produjo un mayor grado alcohólico, un mayor pH y puntuaciones más elevadas, por parte de los jueces, en la mayoría de atributos sensoriales. Aunque, esto no se vio reflejado en la concentración de compuestos volátiles de fermentación.

L. thermotolerans fue la levadura que mayor producción de compuestos volátiles de fermentación registró. Hecho que no quedó reflejado en el análisis sensorial por el panel de jueces, ya que fue considerada la más plana en aromas.

S. cerevisiae destacó por su marcado perfil aromático, frente al resto de levaduras, sobre todo destacando en aromas a levadura y malta.

S. ludwigii, además de mostrar un pobre perfil aromático, fue la única a la que se le atribuyeron olores a reducción y sulfhídrico, aromas indeseados en cervezas de calidad.

T. delbrueckii mostró una valoración alta en panel de jueces, destacando por su peculiar perfil aromático y sabor equilibrado. Por el contrario, mostró una cantidad de diacetilo muy alta.

La correlación de los resultados instrumentales y sensoriales sirvió para apoyar la hipótesis de que la mayor capacidad fermentativa, es decir una producción superior de CO₂ y etanol, está directamente relacionada con una mayor consistencia y persistencia de espuma, efervescencia y turbidez. Las demás correlaciones no fueron concluyentes.

La influencia del tiempo de guarda, en la maduración de la cerveza, se ha demostrado que es positiva. Destacando la reducción de diacetilo, un compuesto indeseado y aumentando la complejidad en la calidad sensorial de la cerveza.

Como comentario final, el sector cervecero artesanal está experimentando una época de expansión, una vía interesante para desarrollar nuevos productos en un mercado muy diferenciado, es el uso de *no-Saccharomyces*, pero aún falta investigación de cómo influyen dichas levaduras en los principales parámetros de calidad que afectan a la cerveza final, ya que muchos estudios son extrapolados de su comportamiento en vinos.

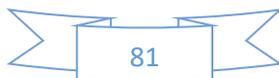
5. BIBLIOGRAFÍA.

- Alba R. Influencia de levaduras no- Saccharomyces en la fermentación y envejecimiento de cerveza. Trabajo fin de Máster, Universidad Politécnica de Madrid,2017;
- Albán Cabaco B, Tabales N, Julia M, Cañizares S, Ma S. El sector cervecero artesanal español y sus posibilidades de internacionalización. Universidad de Córdoba 2015;15.
- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: an exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, 41, 214-224.
- Arce de mena, S. Optimización de la producción de cerveza artesana: Empresa Vier. Trabajo fin de Grado, Universidad de Valladolid. 2017;1-74.
- Bamforth, C. (2007). Alimentos, fermentación y microorganismos. Zaragoza: Acribia.
- Basařová G. Pivovarství . 1st ed. Praha: Vydavatelství V ŠCHT; 2010.
- Basso R, Alcarde A, Portugal C. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? .*Food Research International*. 2016; 86: 112-120.
- Benito S, Palomero F, Morata A, Calderón F, Palmero D, Suárez-Lepe J. Physiological features of Schizosaccharomyces pombe of interest in making of white wines. *European Food Research and Technology*. 2012; 236(1): 29-36.
- Benito S, Palomero F, Morata A, Calderón F, Suárez-Lepe J. New applications for Schizosaccharomyces pombe in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012; 47(10): 2101-2108. Bokulich
- Berning J, McCullough MP. Theme Overview : Global Craft Beer Renaissance. *Choices*. 2017;32(3):1-2.
- Briggs D, Boulton C, Brookes P, Stevens R. *Brewing Science and Practice*. Boca Raton (CO): Taylor & Francis; 2004.
- Budroni, M.,Zara, G., Ciani, M., & LO,F.(2017). Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts. In *Brewing Technology*. InTech.
- Callejo MJ, González C, Morata A. Use of Non- Saccharomyces Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers. *Brew Technol* 2017;101-19.
- Callejo, Maria Jesús; González, Carmen; Morata A. Aplicaciones biotecnológicas recientes en la elaboración de cerveza. 2017;28-32.
- Canonico L, Agarbati A, Comitini F, Ciani M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*. 2016; 56: 45-51.

- Capozzi V, Makhoul S, Aprea E, Romano A, Cappellin L, Sanchez Jimena A, et al. PTR-MS Characterization of VOCs Associated with Commercial Aromatic Bakery Yeasts of Wine and Beer Origin. *Molecules*. 2016; 21(4): 483.
- Ciani M, Ferraro L. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J Appl Microbiol*. 1998;85(2):247–54.
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*. 2011;28(5):873–82.
- Crauwels S, Steensels J, Aerts G, Willems KA, Verstrepen KJ, Lievens B. *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. 2015;68(October):110–21.
- Del Fresno JM, Morata A, Loira I, Bañuelos MA, Escott C, Benito S, et al. Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *Eur Food Res Technol*. 2017;243(12):2175–85.
- Domizio P, House JF, Joseph CML, Bisson LF, Bamforth CW. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer †. 2016;(August).
- Domizio P, Romani C, Lencioni L, Comitini F, Gobbi M, Mannazzu I, et al. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(3):170–80.
- Donadini, G., Fumi, M.D., Kordialik-Bogacka, E., Maggi, L., Lambri, M., Sckokai, P. (2016). Consumer interest in specialty beers in three European markets. *Food Research International*, 85, 301 – 314.
- Dowhanick T. Levadura-Cepas y técnicas de manejo. In: Jurado J, Russell I, editores. *El Cerveceros en la Práctica*. 1st ed. Master Brewers Association of the Americas, St. Paul, (MI); 2002; 297-337.
- Elzinga KG, Tremblay CH, Tremblay VJ. Craft beer in the United States: History, numbers, and geography. *J Wine Econ*. 2015;10(3):242–74.
- Escott C, Loira I, Morata A, Bañuelos MA, Suárez-Lepe JA. *Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy*. *Yeast - Ind Appl*, 2017;
- Financial Food. *La cerveza vuelve a los bares*. 2018.
- GACBB. Global Association of Craft Beer Brewers 2018. Garavaglia C, Swinnen J. *Economic Perspectives on Craft Beer: A Revolution in the Global Beer Industry*. Springer; 2017.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- Gibson B, Geertman JMA, Hittinger CT, Krogerus K, Libkind D, Louis EJ, et al. New yeasts-new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Res.* 2017;17(4):1–13.
- Gibson B, Storgårds E, Krogerus K, Vidgren V. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast.* 2013; 30(7): 255-266.
- Gibson B. 125th Anniversary Review: Improvement of Higher Gravity Brewery Fermentation via Wort Enrichment and Supplementation. *Journal of the Institute of Brewing.* 2011; 117(3): 268-284. Gobbimo
- Gigliarelli, P. La maduración de la cerveza. Disponible en: <http://www.revistamash.com.ar/2017/detalle.php?id=424>, fecha 28 de junio de 2018.
- Giovenzana, V., Beghi, R., Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80 – 86.
- Gobbi M, Comitini F, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, et al. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 2013;33(2):271–81.
- Grant, H. (2002) Lúpulo. En: Jurado, J., Russell, I. (eds.) *El cervecero en la práctica* (229 - 249). Master Brewers Association of the Americas, St. Paul, Minnesota, Estados Unidos.
- Hardwick, W. (2002). Historia mundial de la elaboración de cerveza y su desarrollo en las américas. En: Jurado, J., Russell, I. (eds.) *El cervecero en la práctica* (1 - 36). St. Paul, Minnesota, Estados Unidos: Master Brewers Association of the Americas.
- Hebly M, Brickwedde A, Bolat I, Driessen M, de Hulster E, van den Broek M. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Research.* 2015; 15(3).
- Hieronimus, S. (2012). For the love of hops. The practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops. Brewers Publications, Boulder, Colorado, Estados Unidos.
- Hornsey, I. (2002). *Elaboración de cerveza: Microbiología, bioquímica y tecnología*. Zaragoza, España: ACRIBIA S. A.
- Huxley S. *La cerveza poesía líquida*. Somonte-Cenero, Gijón: Trea; 2011.
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 735 – 739.



- King A, Richard Dickinson J. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 2000; 16(6): 499-506.
- Kopecká J, Němec M, Matoulková D. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. *Journal of Applied Microbiology*. 2016; 120(6): 1561- 1573.
- Kulkarni P, Loira I, Morata A, Tesfaye W, González MC, Suárez-Lepe JA. Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;64(2):1255e1262.
- Kunze W, Pratt S, Manger H. *Technology brewing and malting*. Berlín: VLB; 2004.
- Kurtzman C, & Fell J, *The yeasts*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
- Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(7):1018–36.
- Loira I, Morata A, Comuzzo P, Callejo MJ, González C, Calderón F, et al. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspota delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality., 2015
- Loira I, Vejarano R, Bañuelos MA, Morata A, Tesfaye W, Uthurry C, et al. Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci Technol*. 2014;59(2P1):915–22.
- Loira I. Optimización de parámetros fermentativos de calidad en vinos tintos de zonas cálidas [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 2017.
- Maconi E, Manachini PL, Aragozzini F, Gennari C, Ricca GS. A study of the maloalcoholic fermentation pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem J*. 1984;217(2):585–8.
- Mallett, J. (2014). *Malt: A practical guide from field to brewhouse*. Brewers Publications, Boulder, Colorado, Estados Unidos.
- Martínez Muñoz A. Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial. Trabajo fin de Grado, Universidad de Lleida, 2015;54.
- Michel M, Kopecká J, Meier-Dörnberg T, Zarnkow M, Jacob F, Hutzler M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspota delbrueckii* as model. *Yeast*. 2016; 33(4): 129-144.
- Morata A, Benito S, Loira I, Palomero F, González MC, Suarez-Lepe JA. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *Int J Food Microbiol*. 2012;159(1):47–53.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- Morata A, Suárez-Lepe JA. New biotechnologies for wine fermentation and ageing. *Adv Food Biotechnol.* 2016;287.
- Morata A. Influencia de la maduración antocianica de la uva y de la biotecnología fermentativa en color, aroma y estructura de los vinos tintos [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 2004. Mortazavian
- Palmer J. How to brew. 3st ed. Boulder: Brewers Publications; 2006.
- Palmer, J., Kaminski, C. (2013). Water: A comprehensive guide for brewers. Brewers Publications, Boulder, Colorado, Estados Unidos.
- Palomero F, Morata A, Benito S, Calderón F, Suárez-Lepe JA. New genera of yeasts for over- lees aging of red wine. *Food Chem.* 2009;112(2):432–41.
- Papazian C. Beer styles: Their Origins and Classification. *Handbook of Brewing.* 2nd ed. Boca Raton: Graham G. Stewart y Fergus G. Priest. 2006: 39-76.
- Petruzzi L, Rosaria Corbo M, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International.* 2015; 32(4): 341-363.
- Phillips A. Utilization by yeasts of the carbohydrates of wort. *Journal of the Institute of Brewing.* 1955; 61(2): 122-12
- Poelmans, E., Swinnen, J. (2011). From Monasteries to Multinationals (and Back): A Historical Review of the Beer Economy. LICOS Discussion Paper No. 294/2011.
- 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): 88-94
- R. Preedy V. Beer in health and Disease prevention. 2009.
- Saison D, De Schutter D, Uyttenhove B, Delvaux F, Delvaux F. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry.* 2009; 114(4): 1206- 1215
- Sanchez, G. (2002). Agua. En: Jurado, J., Russell, I. (eds.) *El cervecero en la práctica* (37 – 59). Master Brewers Association of the Americas, St. Paul, Minnesota, Estados Unidos.
- Sanchis, V., Orive, M., Ramos, A. J. (2000). *La Cerveza: Aspectos Microbiológicos.* Trabajo fin de grado, Universidad de Lleida, España.
- Schutter DP De, Saison D, Delvaux F, Derdelinckx G. *The Chemistry of Aging Beer.* 2009;(iv).
- Steele M. *IPA: Brewing Techniques, Recipes and the Evolution of India Pale Ale.* Boulder: Brewers Publications; 2012.
- Strong G. *Brewing better beer.* 1st ed. Boulder: Brewers Publications; 2011.

- Strong, G., England, K. (2015). Beer Judge Certification Program: 2015 Style Guidelines. (pp. viii, 1 – 79).
- Su J, Wang T, Wang Y, Li YY, Li H. The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, ormalic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(6):2395–413.
- Suárez R, Suárez-Lepe JA, Morata A, Calderón F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera: a review. Food Chem. 2007;102(1):10–21.
- Suárez-Lepe J, Morata A. New trends in yeast selection for winemaking. Trends in Food Science & Technology. 2012; 23(1): 39-50
- Swinnen J. The right price of food. Dev Policy Rev. 2011;29(6):667–88.
- The brewers of Europe. Beer statistics [Internet]. 2017. Available from: www.beerstitute.org/br/beer-statistics/brewers-almanac, Accessed: 08.04.2018
- Thompson, D., Ockert, K., Cottone, V. (2002). Fabricación artesanal de cerveza. En: Jurado, J., Russell, I. (eds.) El cervecero en la práctica (725 - 808). Master Brewers Association of the Americas, St. Paul, Minnesota, Estados Unidos.
- Tremblay VJ, Tremblay CH. The US brewing industry: data and economic analysis. MIT Press; 2005.
- Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen K, Derdelinckx G, Verachtert H. Bioflavoring and beer refermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 2003; 62(2-3): 140-150.
- White, C., Zainasheff, J. (2010). Yeast: The practical guide to beer fermentation. Brewers Publications, Boulder, Colorado, Estados Unidos.
- Yeo HQ, Liu SQ. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. Int J Food Sci Technol. 2014;49(7):1607–18.

ANEXOS:

ANEXO 1: Kit de arranque superior eléctrico Brewferm®

Contenido:

- Molino de hierro ajustable
- Olla eléctrica de acero inoxidable 27 litros con termostato y grifo (2000 W de potencia, termostato ajustable en un rango de 30-100°C)
- Cucharón de ralladura 3 litros
- Bolsas para adicionar el lúpulo
- Tanque de filtrado de 30 litros
- Intercambiador de calor de 6 placas soldado con 2 x 1 tubo de silicona + 2 x 1,5 m tubo de PVC 10/15 reforzado
- Cuchara cervecera
- Jarra medidora graduada de 5 litros
- Termómetro de infusión -10°C + 110°C con cubierta protectora
- Densímetro cilindro de plástico 200 ml.
- Depósito de fermentación 30 litros con compuerta y grifo
- Botella de relleno
- Producto de limpieza Chemipro OXI®
- Tintura de yodo
- Cierra coronas con 100 coronas

Partes de la olla electrica:

- 1 Mango de tapa
- 2 Tapa
- 3 Manijas
- 4 Cuerpo en acero
- 5 Parte inferior
- 6 Control de temperatura
- 7 Retén del cable y soporte del e
- 8 Luz de control
- 9 Salida



ANEXO 2: Datos de las dos elaboraciones para poner a punto el protocolo.

1º Elaboración:

- 6 diciembre: Elaboración
- 12 diciembre: fin fermentación, inicio clarificación
- 16 diciembre: embotellado
- Grado alcohólico: 5,6

Tabla anexo 2.1: Datos de elaboración de la primera elaboración.

Proceso	MACERADO				
	Características del agua	Descanso proteico	Descanso de producción de maltosa	Descanso de sacarificación	Finalización
T (°C)	20	52	62	72	78
Ph	7,1	5,55	5,65	5,68	5.63
Densidad		1010	1064	1064	1070
Proceso	FILTRADO			COCCIÓN	
	Características del agua	Mosto 1º lavado	Mosto 2º lavado	Antes cocción	Post cocción
T °	80	20	20	20	20
Ph	7,1	5,64	5,72	5,73	5.62
Densidad		1061	1042	1050	1061
Proceso	FERMENTACIÓN				
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 5
T °		20	20	20	20
Ph		5,62	3,91	3,93	4,00
Densidad		1061	1042	1024	1014

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

2º Elaboración:

- 6 febrero: Elaboración
- 12 febrero: fin fermentación, inicio clarificación
- 16 febrero: embotellado
- Grado alcohólico: 7,4

Tabla anexo 2.2: Datos de elaboración de la segunda elaboración.

Proceso		MACERADO			
	Características del agua	Descanso proteico	Descanso de producción de maltosa	Descanso de sacarificación	Finalización
T (°C)	20	52	62	72	78
Ph	7,1	5,79	5,71	5,65	5.65
Densidad		1050	1067	1068	1067
Proceso		FILTRADO		COCCIÓN	
	Características del agua	1 lavado	2 lavado	Antes cocción	Post cocción
T °	80	20	20	20	20
Ph	7,1	5,67	5,75	5,75	5.62
Densidad		1068	1044	1050	1070
Proceso		FERMENTACIÓN			
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 5
T °		20	20	20	20
Ph		5,62	4,89	4,67	4,16
Densidad		1070	1046,9	1027	1011,5

ANEXO 3: Protocolo de elaboración completo y puesto a punto.

PROTOCO ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANA CON EQUIPO HOMEMADE:

Previamente al inicio del protocolo hay que asegurarse que se tiene todo el equipo a punto y que no falta ninguna materia prima (Malta, levadura, lúpulo y agua).

➤ Día previo:

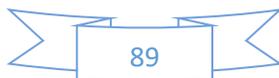
- 1- Pesar la malta total (Teniendo en cuenta que se ha de pesar una cantidad de 200 gr de más para realizar el posterior tamizado). [En el caso particular de esta receta 5000 gr.](#)
- 2- Realizar la molienda (Colocar el molino con las marcas de rotulador y siempre de la misma manera, 6 vueltas de tornillo).
- 3- Separar los 200 gr para la muestra de tamizado y guarda el resto de forma hermética.
- 4- Dejar agua (Siempre algo más de la que se prevé utilizar) en dos ollas para que se vaya el cloro de forma natural. [En el caso particular de esta receta 35 L.](#)
- 5- Pesar el resto de materias primas y dejarla a parte de nuevo de forma hermética (Levadura, lúpulo, irish moss). [En este caso, 16 gr de levadura, 25 gr de lúpulo, 5 gr de iris mosh.](#)
- 6- Preparar la zona de trabajo para la elaboración (zona de elaboración, zona de medida, densímetros, medidor de pH...)
- 7- Ir a microbiología y encender la máquina de hielos. (habrá que apagarla al día siguiente una vez finalizada la elaboración). Necesitamos el hielo para bajar la temperatura del mosto en la determinación de densidad y pH y también para enfriar el mosto después de la ebullición
- 8- Asegurarnos de que tenemos mosto para inoculación de la levadura en la fermentación principal, 200 ml es suficiente.

➤ Día de elaboración:

- 1- Encender la olla a unos 50°C, para mejor control de la temperatura se introduce un termómetro en la olla. Además, se coloca la base de plástico con forma circular de color blanco, para que la malta no toque el fondo. [En este caso serían 20 L.](#)
- 2- Se coge una muestra del agua antes de que se caliente y se mira pH y densidad.
- 3- Con una nevera portátil, se va a microbiología y se llena de hielo.
- 4- Cuando alcance los 50°C el agua en la olla, se coloca la malla filtrante (bolsa blanca) y se añade toda la malta molida, bajara la temperatura, esperar de nuevo hasta los 52°C. A partir de aquí importante remover constantemente cada 3-5 minutos, hasta finalizar macerado.
- 5- Primera etapa de macerado, a 52°C, durante 10 minutos. Finalizados, se sube la temperatura a 62°C de forma lenta (1°C= 1 min), y se toma medida de pH y densidad.
- 6- Segunda etapa de macerado, 62°C, durante 45 minutos. De igual forma finalizada la etapa, se medirá pH y densidad, y se subirá la temperatura a 72°C.
- 7- Mientras se realiza la etapa segunda de macerado, se inicia el calentamiento de la otra olla con agua de lavado hasta los 80°C y se mantiene. [En este caso serían 12 L, 8l en el primer lavado y 4 en el segundo.](#) Por si acaso, calentar un exceso de agua por si se necesitase.
- 8- Tercera etapa de macerado, 72°C, durante 15 minutos. De nuevo se repite pH, densidad.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

- 9- Importante realizar prueba del lodo, para verificar si se ha finalizado la digestión del almidón. Si es positiva se da por finalizado el macerado. Si no, se sube a 78°C, 5 minutos y se da por finalizado. Apaga la olla eléctrica.
- 10- El pH al final de la maceración debería estar entre 5,2-5,7, y su densidad dependiendo del tipo de cerveza claro, pero para una cerveza con una cantidad del 100% de malta Pilsen (4.8 kg) se espera una densidad que ronde los 1060, se buscan unos 5,5-6 grados alcohólicos.
- 11- Colocamos la malla metálica en el tanque de filtrado. Posteriormente se añade 2 L del agua caliente para que humedezca la malla metálica. Se traslada la tela filtrante con toda la masa de malta molida de la olla al cubo de filtrado, se posa encima de la malla metálica. Se añade todo el líquido que queda en la olla eléctrica y se deja reposar 20-30 minutos para que se forme bien el lecho filtrante. En este caso se reposo 25 min.
- 12- Lavado de la olla eléctrica y secado.
- 13- Generado el medio filtrante, se inicia un proceso de recirculación del mosto de forma suave y lenta (Utilizando jarras de 5 litros), y al volverlas a subir no dejar que se rompa el lecho formado. Por ello utilizar una espumadera para no verter directamente el mosto recirculado encima del medio filtrante. Este proceso puede durar entre 45 min y 60 min, hasta que se vea que el mosto está completamente limpio. A partir de ahí el mosto se empieza a recoger en la olla eléctrica de nuevo. Se mide pH y densidad y volumen.
- 14- Sin secar en ningún momento el lecho filtrante, es decir cuando empezamos a ver que ya no queda casi líquido, se añade agua de lavado (que está a unos 78-80°C), el volumen dependerá de lo que se esté buscando, pero 8L para esta receta está bien, se deja reposar 20 minutos, lo obtenido se junta con el mosto claro en la olla eléctrica. Se mide pH y densidad del mosto de lavado 1 y de la mezcla de ambos mostos. Con la tabla de la página 42 del manual, se estima el grado alcohólico esperable según el dato de la densidad de la mezcla, teniendo en cuenta que en la cocción se va a concentrar y va a subir la densidad (Unas 10 unidades de media). Según ese dato se decide si añadir más agua de lavado, en este caso se repitió con 4 l, se repite el proceso, y/o si se apura el agua que quede en el medio filtrante. Al final de la filtración, se registra pH y densidad.
- 15- Inicio de la cocción del mosto final (mosto claro + mosto de lavado), una vez que inicie la ebullición se añade una pequeña cantidad de lúpulo (1/4) dentro de una bolsita, en este caso 6 gr. La cocción será una hora y media y no se utilizará la tapa. Mientras hierve, se va a ir produciendo una espuma espesa en la superficie, debe ser retirada. Se va a concentrar el mosto ya que se puede evaporar hasta un 20 %. Se va añadiendo el resto del lúpulo a los 30 minutos (2/4), es decir 12 gr y a los 60 minutos (1/4), los últimos 6 gr. En los últimos 10-15 minutos se puede colocar la tapa y dejar después de cocer unos 10-15 minutos de reposo, con tapa. En estos 15 minutos finales se puede añadir Irish moss, un coagulante de proteína que ayuda a que sedimenten al fondo. Se mide pH y densidad finales. Esta densidad ya será la definitiva y la que nos dará una idea del grado alcohólico esperado.
- 16- A la par que la cocción se inicia la esterilización y desinfección de todo lo que vaya a entrar en contacto con el mosto cocido. (Fermentador, sifón, equipo de frío...)
- 17- Enfriamiento, se introduce el intercambiador (serpentín) en la olla, 10 minutos antes de que acabe para que se esterilice. Se inicia la circulación de agua, a temperatura ambiente gracias a la bomba de pecera, a través de él. Cuando ya el salto térmico no es tan grande (cuando el mosto alcanza los 40-50°C), se añade hielo al agua de circulación para favorecer el enfriamiento. Duración máxima 1 hora.





- 18- A la par, se inicia la activación de la levadura para la fermentación con mosto a 37°C en un matraz de 250ml. Hasta que genere una espuma importante. Unos 20 minutos. (15 gr de levadura)
- 19- Enfriado el mosto a 20°C, se extrae el serpentín de la olla y se deja reposar unos minutos, con la tapa. Finalizado este paso se realiza un traspaso del mosto al fermentador por medio de un sifón para intentar dejar en la olla el máximo de turbios de las proteínas floculadas al fondo de la misma.
- 20- Se inocula la levadura en el tanque de fermentación con el mosto ya traspasado y se airea de forma importante (con una cuchara con rendijas que favorece dicho proceso), para fomentar el crecimiento de las mismas.
- 21- Se coloca la tapa del fermentador con el air-lock y se lleva a una zona de temperatura controlada 18-20 °C. (Se utilizó las estufas de al fondo del laboratorio, puesta al mínimo de 20°C, para evitar que bajase la temperatura.)
- 22- Limpieza de todo el material, equipo y lugar de trabajo

➤ Días siguientes:

- 1- Control de pH y densidad cada día de fermentación para ver su evolución, hasta que la densidad no varíe, aproximadamente 5-7 días. Intentar hacerlas siempre a la misma hora. A las 24 h del inicio de la fermentación, en la primera medida, si se observa poco vigor en el depósito, se puede airear moviéndolo en una zona estéril (Campana UV), para favorecer la multiplicación de las levaduras. Se recomienda controlar la temperatura fuera y dentro del tanque durante toda la fermentación (Utilizar sensores de temperatura Turbotag, del departamento de sensores). Mientras transcurre la fermentación, se debe llevar a cabo la multiplicación de las levaduras que se vayan a inocular en la refermentación.
- 2- Finalizada la fermentación se lleva a cabo la clarificación por frío de la cerveza verde, en cámara de microbiología a 2-5°C, para ello, se traspasa la cerveza a tanques de menor capacidad para que clarifique mejor, siempre intentando evitar arrastrar los flóculos y turbios de la fermentación, ayudándose del sifón. Duración clarificación por frío 3-4 días. ¡Ojo! La cámara esta accesible en horario de 9-15 h.
- 3- Lavado del tanque de fermentación.
- 4- Finalizada la clarificación por frío de la cerveza verde, en la zona de micro y con el tanque de filtrado como ayuda y el sifón, se traspasa la cerveza clarificada al tanque de filtrado sin arrastrar nada de los turbios. Se deja tapada que coja temperatura ambiente.
- 5- Se pesa la azúcar que se va a añadir (5-6 gr/L), en este caso 7 gr/l, y se realiza en un matraz de 250 ml con parte de cerveza una previa hidratación de la misma a temperatura alta para favorecer la solución. Después se añade al tanque de filtrado con el resto de cerveza verde y se homogeniza por completo.
- 6- Se debe tener preparadas los diferentes cultivos de levaduras, y pipetas de 5ml, que se añadieran por botella.
- 7- Se inicia el llenado de botellas. Se añade la cerveza y los 7 ml de levadura se homogeniza y se deja reposar a 20°C, entre 4-8s emanar para que refermente y madure. Después se pasa a frío el día anterior a la cata.

Influencia de levaduras no-Saccharomyces sobre la calidad de la cerveza en la refermentación en botella y la influencia del tiempo de maduración.

➤ Preparación de los inóculos para la refermentación:

Esta etapa deberá realizarse con el mayor rigor microbiológico posible, puesto que una contaminación sería un gran problema para el posterior estudio.

- 1- El primer paso es hablar con Antonio, decidir que géneros de levaduras se va a utilizar y realizar un “pase” a unos tubos nuevos de medio YPD. Este fenómeno sirve para refrescar la levadura. Dejarlas crecer 2 días máximo a una temperatura controlada de unos 20-25 °C.
- 2- Preparar unos matraces de 100ml, con 50 ml de mosto, y esterilizarlos. Si se precisa más cantidad, añadir más mosto.
- 3- Realizar el traspase de los tubos crecidos de nuestras levaduras a los matraces con mosto, dejar crecer unos 2 días con temperatura controlada y agitación.
- 4- Ya se tendría los inóculos listos para su utilización en la refermentación.

