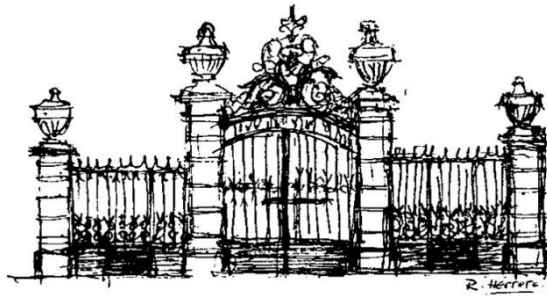


UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS



**ANÁLISIS COMPARATIVO DE CERVEZAS ARTESANALES
EXTREMEÑAS**

Daniel Cortés Montaña

Badajoz, junio 2017

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE CERVEZAS ARTESANALES
EXTREMEÑAS**

AUTOR: DANIEL CORTÉS MONTAÑA

Fdo:.....

DIRECTOR/ES:

Director: M^a Jesús Petróñ Testón

Codirector: Ana Isabel Andrés Nieto

Fdo:.....

Fdo:.....

TRIBUNAL CALIFICADOR:

Vocal

Presidente

Secretario

Fdo.:_____

Fdo.:_____

Fdo.:_____

Fecha lectura:

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. HISTORIA Y EVOLUCIÓN DE LA CERVEZA.....	4
2.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR CERVECERO.....	6
2.3. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA ARTESANAL.....	8
2.3.1. MATERIAS PRIMAS.....	8
2.3.1.1. AGUA.....	9
2.3.1.2. MALTA.....	9
2.3.1.3. LÚPULO.....	10
2.3.1.4. LEVADURA.....	10
2.3.2. PROCESO PRODUCTIVO.....	10
2.3.2.1. MOLTURACIÓN.....	11
2.3.2.2. MACERACIÓN.....	11
2.3.2.3. FILTRACIÓN, ADICIÓN DEL LÚPULO Y COCCIÓN.....	11
2.3.2.4. ENFRIADO.....	12
2.3.2.5. FERMENTACIÓN.....	12
2.3.2.6. CARBONATACIÓN, EMBOTELLADO Y ETIQUETADO.....	12
2.3.2.7. SEGUNDA FERMENTACIÓN.....	12
2.3.2.8. ALMACENAMIENTO.....	13
2.3.3. DIAGRAMA DE FLUJO.....	13
2.4. COMPOSICIÓN DE LA CERVEZA Y EFECTO EN LA SALUD.....	14
2.5. CLASIFICACIÓN DE LAS CERVEZAS.....	15
2.5.1. SEGÚN EL TIPO DE FERMENTACIÓN.....	16
2.5.2. SEGÚN EL ESTILO DE LA CERVEZA.....	17
2.6. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	19
3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	26
4.1. MATERIAL.....	27
4.1.1. REACTIVOS.....	27
4.1.2. EQUIPOS UTILIZADOS.....	27
4.1.3. SOFTWARE.....	28
4.1.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CERVEZA.....	28

4.1.5. MATERIAL UTILIZADO.....	30
4.2. METODOLOGÍA.....	30
4.2.1. OBTENCIÓN DE LAS CERVEZAS ARTESANALES.....	30
4.2.2. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	31
4.2.3. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	31
4.2.3.1. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL PH.....	31
4.2.3.2. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL GRADO ALCOHÓLICO.....	31
4.2.3.3. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL COLOR.....	32
4.2.3.4. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DE LA TURBIDEZ.....	32
4.2.3.5. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL AMARGOR.....	32
4.2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ..	33
4.2.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DEL RADICAL LIBRE DPPH.....	33
4.2.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES.....	34
4.2.6. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	35
4.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	38
5.1.1. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL PH.....	38
5.1.2. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL GRADO ALCOHÓLICO.....	39
5.1.3. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DE LA TURBIDEZ.....	40
5.1.4. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL COLOR.....	40
5.1.5. MEDICIÓN INSTRUMENTAL DEL AMARGOR.....	41
5.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	42
5.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SECUESTRADORA DEL RADICAL LIBRE DPPH.....	42
5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES..	44
5.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	45
6. CONCLUSIONES.....	48
7. BIBLIOGRAFÍA.....	50

CAPÍTULO I

RESUMEN

1. RESUMEN

España ha sido uno de los últimos países de la Unión Europea en tener su propio nicho de cerveza artesana. De hecho, el porcentaje del crecimiento de la producción artesanal ha sido de un 1.600% en apenas 7 años.

En el presente trabajo se ha realizado un análisis comparativo entre cinco cervezas artesanales extremeñas. Se eligieron cinco tipos de cerveza: Stout, Strong ale, Doble ipa, Ipa y Blonde ale. Para la caracterización y posterior comparación se realizaron análisis físico-químicos (medición instrumental del pH, grado alcohólico, color, turbidez y amargor), determinación del contenido en polifenoles totales, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos y determinación de la actividad antioxidante *in vitro* (actividad secuestradora del radical libre DPPH).

Con los análisis anteriores se concluyó que la cerveza artesana tipo Stout presentó mayor contenido en polifenoles totales y también una actividad antioxidante *in vitro* más intensa, en comparación con el resto de cervezas estudiadas. También la cerveza tipo Stout presentó los mayores contenidos en catequina, ácido siríngico y ácido transferúlico en comparación con el resto de cervezas analizadas, lo que puede relacionarse con su mayor potencial antioxidante *in vitro*.

CAPÍTULO II
INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Historia y evolución de la cerveza.

El origen de la cerveza es incierto pero se cree que se remonta a la Edad de Piedra, ligada a la aparición de grupos sociales sedentarios que comenzaron el cultivo del cereal y a la elaboración de pan.

Se sabe que hace más de 6.000 años, en las áreas de los ríos Tigris y Éufrates, los sumerios (habitantes del sur de Mesopotamia) elaboraban y consumían la cerveza. El rey Hammurabi dispuso en un decreto normas sobre la fabricación de la cerveza, en el cual se establecían rigurosos castigos a quienes adulteraran la bebida (Fálder, 2006).

Los egipcios, concretamente Herodoto -siglo V a. de C.- dice en el libro II de sus Historias: "El vino que beben de ordinario es una especie de vino hecho de cebada, pues ellos no tienen viñas en su país". Parece ser que en Egipto fue donde, por primera vez, fue elaborada esta bebida procedente de cereales fermentados. Esto se confirmaría por el análisis de restos de líquidos encontrados al pie de tumbas egipcias. A propósito de los Armenios, Jenofonte, en el libro IV de Anábasis, dice que tienen vino de cebada, bebida muy fuerte si no se mezcla con agua (Cerveceros De España, 2001).

En el siglo XII, en Inglaterra, la cerveza era tan importante que su Carta Magna daba la medida adecuada para la venta y consumo. Además, uno de los oficios más antiguos de ese país es el de "Conner" o degustador de cerveza.

En la historia medieval y moderna aparece la tradición alemana. Alemania ha influido mucho en la fijación de las características de la cerveza moderna, al punto que hoy en día aun cuentan con la "Ley de la Pureza" promulgada por el duque bávaro Guillermo IV de Orange en 1516, que obliga a producir la bebida con cebada malteada, agua, lúpulo y levadura.

A España llegó la cerveza procedente de los países del norte de Europa con el advenimiento de la corte flamenca de Carlos I (Siglo XVI). La cerveza en esta época era de uso exclusivo para el servicio de los componentes de la corte.

Las primeras fábricas españolas se ubican en las cercanías de puertos marítimos, como los de Santander (1783) y Barcelona (1864). Los consumidores de este tipo de cerveza eran los

habitantes de grandes ciudades, siendo pocas veces los ambientes rurales los generadores de demanda.

A lo largo del siglo XIX los maestros cerveceros incorporaron mejoras tecnológicas a sus factorías hasta que se permitió la producción a gran escala. Otro de los elementos claves en la producción de comienzos de siglo XX es la introducción en el mercado de las cervezas de baja fermentación (de 4° C a 10 °C). Es precisamente en 1982 cuando el consumo per cápita de vino y cerveza se iguala y es precisamente a partir de los ochenta cuando se comienza a consumir más cerveza que vino en España.

En los últimos años, ha habido un gran auge en la producción y consumo de cervezas llamadas "artesanales". Este éxito está ligado a la falta de variedad e innovación en el mercado de las lagers industriales y al mayor refinamiento de los paladares de los clientes cerveceros (Albán y col., 2015). En la actualidad, la cerveza artesanal es considerada por algunos un producto *gourmet* y es una cerveza de carácter propio, cuyo perfil se ha comparado en los últimos tiempos con el del vino.

En la siguiente tabla se puede observar un eje cronológico en el que se nombran los principales hitos históricos que han contribuido a la evolución y desarrollo de la producción de cerveza.

TABLA 2.1. Evolución y desarrollo de la cerveza. Fuente: (García y col., 2004).

Evento	Año / Época
Evidencias arqueológicas en el valle del Nilo de fermentación.	4000 a.C.
Se introduce la adición de lúpulo en la elaboración de cerveza	Siglo VII
Generalización del uso de lúpulo en Europa	Siglo XVII
Expansión y predominio en Europa de la técnica de Bavaria para la elaboración de cerveza por fermentación baja	Siglo XIX
Los científicos Cagniard de la Tour, Schwann y Kützing establecen que la levadura es un organismo vivo y es responsable de la formación de alcohol. Se acuña el nombre de <i>Saccharomyces</i> (Hongo del azúcar).	1825-1837

Louis Pasteur realiza sus estudios sobre fermentaciones, incluida la cerveza.	1857-1876
Publicación del libro <i>Estudios sobre la cerveza</i> de Louis Pasteur.	1876
Establecimiento de técnicas de aislamiento y propagación de cultivos puros de levadura por Emi Hansen en la cerveza Carlsberg.	1883
Inicio de la taxonomía de levaduras por Hansen.	1896
Diseño y patente de los primeros fermentadores cilindro-cónicos.	1908-1927
Se inicia el uso de papaína en el proceso de clarificación de la cerveza.	1911
Uso de los primeros fermentadores cilindro-cónicos.	Década de los 70

2.2. Situación actual del sector cervecero.

La globalización del consumo de cerveza es un hecho imparable desde hace algunas décadas. Las multinacionales cerveceras se han visto obligadas a poner en marcha nuevos planes de internacionalización, atraídas por las previsiones positivas de nuevos mercados y los beneficios de las economías de escala, así como por la situación de crisis y descenso del consumo que viven las regiones consumidoras por excelencia (Europa y EE. UU.) (Sonneville, 2014).

Según el informe socioeconómico del sector de la cerveza en España publicado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, la producción de cerveza aumentó un 4% en el año 2015. El valor de la cerveza en el mercado supera los 15.500 millones de euros y supone un 1,4 % del PIB (Cerveceros de España, 2015).

España se mantiene en cuarta posición en producción de cerveza en la Unión Europea y es el segundo país de la Unión Europea en el que el sector cervecero genera más empleo, solo por debajo de Alemania. En cuanto a la geografía española el centro de la península es la zona que más ha crecido en ventas. Las exportaciones de cerveza se han multiplicado casi por 4 en la última década (Cerveceros de España, 2015).

En los últimos años se ha observado un gran crecimiento de la Industria Cervecera Artesanal, en especial debido al aumento de pubs y bares que promueven su consumo. Como consecuencia de la diversidad de recetas, insumos, espacios, manipuladores y procesos de fabricación, pueden generarse cambios en la calidad final del producto, entre lotes de producción y diferentes productores (Gutiérrez y col., 2002).

A pesar de no existir una definición concreta y oficial, la cerveza artesanal - "craft beer" en inglés- es la que prioriza el uso de materias primas de buena calidad. Además, por lo general la mayor parte del proceso de elaboración se realiza de manera manual. Aun así, la principal diferencia reside en el proceso productivo, ya que en el artesanal no tiene lugar la pasteurización (Albán y col., 2015).

El sector de la elaboración de cervezas de forma artesanal está en plena ebullición. Lógicamente, por tradición y siglos de historia, hay muchos países de Europa que adelantan nuestros datos. Reino Unido, Alemania y Francia ocupan el cajón de líderes del mercado de la cerveza artesana. Unas posiciones a las que nada tiene que envidiar España si se tiene en cuenta que, según la Asociación "Brewers of Europe", nuestro país es ya el cuarto productor de cerveza artesana de Europa. (The Brewers of Europe, 2016)

España ha sido uno de los últimos países de la Unión Europea en tener su propio nicho de productores de cerveza artesana tanto que el porcentaje del crecimiento de la producción artesanal es, nada menos, que de un 1.600% en apenas 7 años. En 2015 España ocupó el sexto lugar, a nivel europeo, en cuanto a número de micro-cervecerías.

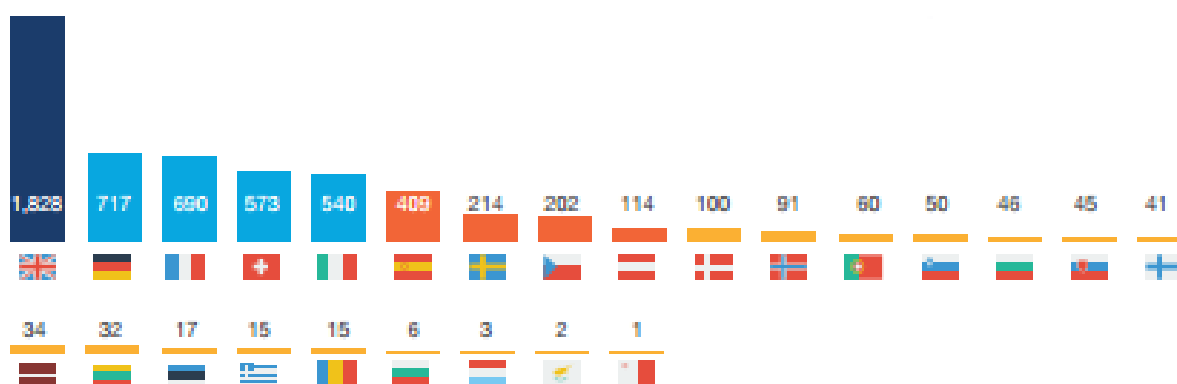


FIGURA 2.1. Número de micro-cervecerías por país. Las barras representan el número de cervecerías que hay en cada país. Fuente: (The Brewers of Europe, 2016).

Dentro de nuestro país, Cataluña ocupa el primer puesto con 76 micro-cervecerías produciendo cerveza artesana, le siguen Andalucía con 56 y Castilla y León con 39. Extremadura se encuentra muy por debajo de estas cifras pero alejado de los acelerados procesos industriales, los aditivos y los conservantes que suelen utilizar las grandes marcas para elaborar principalmente bebidas tipo lager pilsens, hay varios extremeños que prefirieron mirar atrás y recuperar la auténtica esencia de la cerveza artesana. En los últimos años han aflorado pequeñas fábricas, micro-cervecerías, y en torno a ellas suben como la espuma bares y tiendas especializadas.

2.3. Proceso de elaboración de la cerveza artesanal.

La Asociación Española de Cerveceros Artesanos Independientes-AECAI-, definen las cerveceras artesanas como: “Cerveceras con instalaciones propias, que cumplan con la normativa vigente en cuanto a la fabricación de cerveza y su venta; y que no estén participadas, directa o indirectamente, por parte de una empresa del sector que incumpla volúmenes/método/ingredientes. Su volumen de producción anual máxima se establece en 5.000.000 litros, no se emplean ingredientes distintos a la malta, de cebada y/o trigo, como fuente de almidón con la finalidad de abaratar los procesos productivos, a excepción de aquellas cervezas que por sus características requieren usar otro tipo de materia prima y no superen el 10% de la producción total de la fábrica.” (Pro-Chile, 2015)

2.3.1. Materias primas.

Según 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 se establece la siguiente definición relativa al producto y a sus métodos de fabricación:

-Cerveza: Alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales.

-La fabricación artesana se define como aquella elaboración conforme a lo establecido en la presente norma de calidad, 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.

Desde el punto de vista de la calidad alimentaria, además de los requisitos establecidos en su definición, la cerveza y las bebidas de malta deberán presentar las siguientes características:

- Un pH inferior o igual a 5,5.
- Un amargor superior a 5 mg/l (1 mg/l de α isoácidos en cervezas equivale a una unidad de amargor IBU).

2.3.1.1. Agua.

El agua es el elemento principal como mínimo un 90% e interviene no sólo en los momentos iniciales de mezclado con la malta, sino también en algunos de los filtrados posteriores, ejerciendo una notable influencia en el resultado final del producto.

2.3.1.2. Malta.

Se conoce como malta al grano de cebada sometido a la germinación y ulterior deshidratado y tostado en condiciones tecnológicas adecuadas. Existen tres variedades principales de la cebada, de dos, cuatro y seis hileras (o carreras), según el número de ellas que haya en la espiga. La de cuatro hileras no es adecuada para la elaboración de la cerveza. La cebada de dos carreras (*Hordeum distichum*), que presenta dos hileras de semillas en torno al eje de la espiga, la cebada de seis carreras (*Hordeum hexastichum*) o cebada forrajera, con seis hileras de semillas. Esta última es más adecuada para hacer cerveza y whisky. A nivel de gusto, esta aporta sabores más delicados, ya que produce más azúcares fermentables (es más rica en almidón) y tiene menos proteínas.

2.3.1.3. Lúpulo.

El lúpulo *Humulus lupulus* es una de las tres especies de plantas del género *Humulus*, de la familia de las cannabáceas. Proporciona un sabor amargo característico y es el encargado de estabilizar la espuma. Los lúpulos son responsables de los aromas y los sabores florales de algunos tipos de cerveza. La parte de la planta que se utiliza es la flor hembra sin fecundar. Este ingrediente posee efectos tranquilizantes entre otras propiedades medicinales.

2.3.1.4. Levadura.

Las levaduras que se utilizan en la industria cervecera pertenecen a la familia Endomycetaceas del reino de los hongos, concretamente a la subfamilia *Saccharomycetidae* y al género *Saccharomyces*. Dentro de este género se distinguen dos especies: La *Saccharomyces cerevisiae* y la *Saccharomyces uvarum* o *carlsbergensis*. Son también clasificadas según el tipo de fermentación que se produce:

La levadura de alta fermentación (cervezas ales): Pertenece a la *S. cerevisiae*. Se encuentra normalmente en la naturaleza, en los tallos de los cereales y en la boca de los mamíferos. Fue descubierta por Louis Pasteur en 1852. Se caracteriza porque fermenta más fácilmente a temperaturas altas (15-25°C) y la levadura sube a la superficie del tanque al final de su fermentación.

La levadura de baja fermentación (cervezas lager): Pertenece a la *S. uvarum* (*carlsbergensis*). Es una variedad descubierta involuntariamente por los cerveceros del sur de Alemania que sometían sus cervezas a una maduración a bajas temperaturas en las cuevas de los Alpes. Esta especie fue creada a través de un híbrido de las especies *S. cerevisiae* y *S. monacensis* por el danés Emil Christina Hamsen en 1883, cuando trabajaba en la cervecera Carlsberg, de ahí el nombre de la especie, *carlbergensis*. Se caracteriza por fermentar a temperaturas más bajas (5-15°C) y depositarse en el fondo del tanque de fermentación al acabar ésta.

2.3.2. Proceso productivo.

2.3.2.1. Molturación.

Limpieza del grano

Para asegurar la calidad del producto final es necesario realizar una revisión visual del grano para comprobar que el grano está libre de materias extrañas y que tienen la calidad apropiada.

Trituración de la malta

Se trata de romper el grano de cebada malteada para facilitar las siguientes fases de la producción, para ello se utilizará un molino eléctrico que se alimenta manualmente a través de una tolva y que genera grano partido y molido que se recoge para posteriormente ser utilizado en las siguientes fases.

2.3.2.2. Maceración.

También conocido como extracción, empastado o braceado. La maceración es el proceso en el que se mezclan agua caliente con la malta previamente molida. En este punto se gelatinizan los almidones, se extraen enzimas naturales de la malta, y convierten los almidones en azúcares fermentables. Este es un proceso enzimático, ya que son las enzimas, presentes en la malta, las que convierten el almidón en azúcares fermentables. En la maceración se emplean diferentes rangos de temperaturas, cada rango activa y desactiva diferentes enzimas. Gracias al control de la temperatura el cervecero puede controlar el proceso para ajustar las siguientes etapas del proceso y obtener los resultados esperados.

2.3.2.3. Filtración, adición del lúpulo y cocción.

Tras la maceración se realiza un filtrado al mosto y se realiza la adición de los lúpulos. Posteriormente se realiza la cocción del mosto.

2.3.2.4. Enfriado.

Antes de comenzar con la fermentación es necesario ajustar la temperatura del mosto para que las levaduras puedan cumplir su misión. Con la ayuda de un intercambiador de calor de placas se baja la temperatura del mosto de 90-100 °C hasta los 20 °C lo que permite comenzar la fermentación.

2.3.2.5. Fermentación.

Una vez acondicionada la temperatura del mosto tiene lugar la inoculación de la levadura que se lleva a cabo inmediatamente después de enfriar el mosto, para evitar contaminación microbiológica. Es recomendable primero inocular y luego airear, para prevenir que el oxígeno reaccione con compuestos del mosto y evitar compuestos de sabor indeseable.

Las tasas de inoculación son de 1,5 a 2,5 gramos de levadura prensada por litro de producto y los valores de oxigenación deben estar comprendidos entre 8-10 mg/l de oxígeno disuelto (Comunicación personal por el maestro cervecero). Se añaden las levaduras y se comprueba la densidad para ajustar el producto final deseado. La fermentación tiene lugar durante 6 días a una temperatura de 23°C más un día a 4°C para que se produzca la floculación.

2.3.2.6. Carbonatación, embotellado y etiquetado.

Para poder realizar la segunda fermentación, en botella, debemos realizar la carbonatación. Antes del embotellado se añade azúcar o su equivalente en miel, para que las levaduras puedan realizar la segunda fermentación dentro de la propia botella. Para el embotellado se utiliza una embotelladora semiautomática.

2.3.2.7. Segunda fermentación.

Esta fermentación se lleva a cabo durante 21 días a 20 ° C. Se realiza en una sala climatizada para asegurar que el rango de temperaturas no sea inferior a los 15°C ni superior a los 25 °C.

2.3.2.8. Almacenamiento.

El almacenamiento del producto se realizara a temperaturas que van desde los 15 a los 25°C en la sala climatizada.

2.3.3. Diagrama de flujo.

En la figura siguiente se presenta el diagrama de flujo.

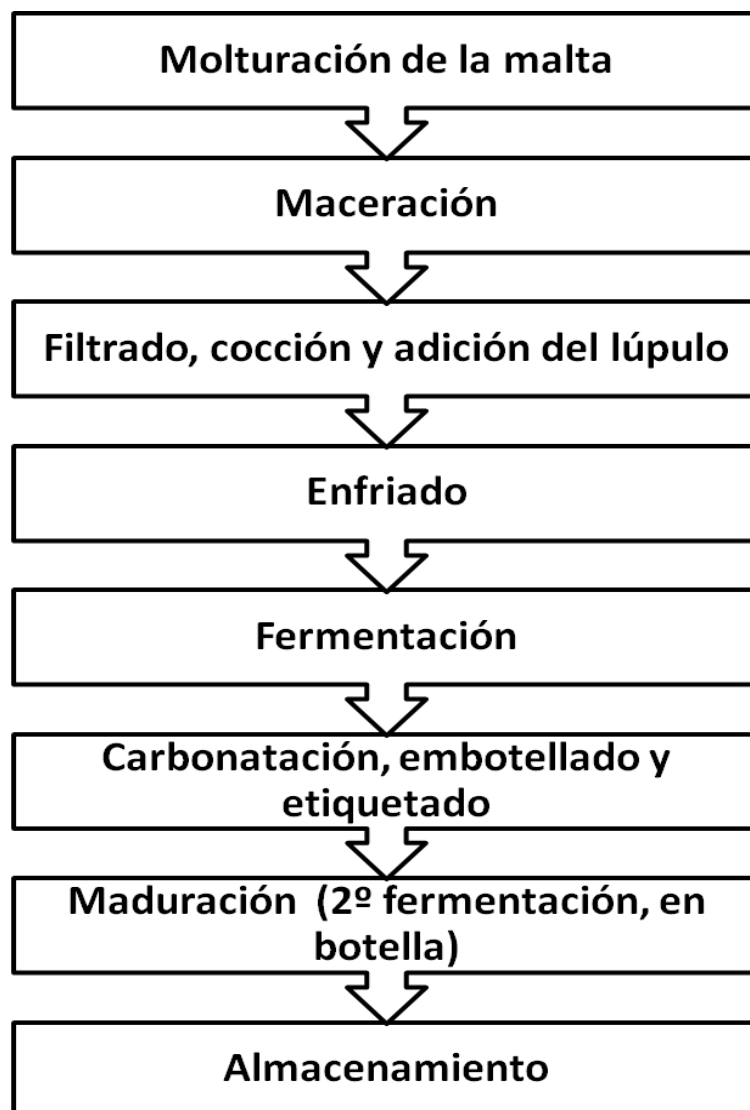


FIGURA 2.2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la cerveza artesana. Fuente: elaboración propia.

2.4. Composición de la cerveza y efecto en la salud.

Los constituyentes de la cerveza provienen de sus cuatro principales materias primas, malta, lúpulo, agua y levadura. El principal componente de la cerveza es el agua, que se acompaña de otros compuestos como etanol, ácidos, compuestos nitrogenados, carbohidratos, sales minerales, vitaminas, sustancias espumantes, sustancias aromáticas y compuestos fenólicos (González, y col 2001).

100 ml de cerveza con un 5% alcohol tienen la valoración nutricional que podemos observar en la siguiente tabla:

TABLA 2.2. Valoración Nutricional de 100 ml de cerveza con 5% de alcohol. Fuente: UNED Facultad de Ciencias. Nutrición y Dietética (2017).

Energía [kcal]	42.40	Calcio [mg]	8.00	Vit. B1 Tiamina [mg]	0.01
Proteína [g]	0.50	Hierro [mg]	0.01	Vit. B2	0.03
				Riboflavina [mg]	
Hidratos	3.10	Yodo [µg]	8.00	Eq. niacina [mg]	0.43
carbono [g]					
Fibra [g]	0.00	Magnesio [mg]	9.60	Vit. B6 Piridoxina [mg]	0.06
Grasa total [g]	0.00	Zinc [mg]	0.01	Ac. Fólico [µg]	6.30
AGS [g]	0.00	Selenio [µg]	1.20	Vit.B12	0.15
				Cianocobalamina [µg]	
AGM [g]	0.00	Sodio [mg]	4.40	Vit.C Ac.ascórbico [mg]	0.00
AGP [g]	0.00	Potasio [mg]	37.00	Retinol [µg]	0.00
Alcohol [g]	4.00	Fósforo [mg]	55.00	Vit. A Eq. Retinol [µg]	Trazas
Agua [g]	92.40			Vit. A Eq. Retinol [µg]	Trazas

La cerveza contribuye significativamente a la ingesta de energía debido a su contenido de etanol ($7 \text{ kcal mL}^{-1} \text{ FW}$), pero también debido a la proteína (4 kcal mL^{-1}) y carbohidrato ($3,75 \text{ kcal mL}^{-1}$) que incluye almidón parcialmente degradado en una forma no fermentable. Una cerveza de 5° aporta aproximadamente 40-45 Kcal/100 ml, de las que dos terceras partes corresponden al alcohol contenido. La ingesta de un litro diario de cerveza aportaría el 17%

de las necesidades energéticas diarias de un hombre y el 22% en el caso de la mujer. La cerveza sin alcohol tiene obviamente un valor calórico mucho más bajo, del orden de 140 Kcal/L.

La cerveza también contiene antioxidantes, compuestos fenólicos, folatos, carbohidratos, fibra soluble, vitaminas y minerales. Existe un considerable debate sobre los posibles beneficios para la salud derivados del consumo moderado de alcohol, como la reducción de la enfermedad coronaria o el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico y una mejor respuesta inmune. El consumo moderado de alcohol se define como una ingesta de alcohol de 10-12 ml día⁻¹ para las mujeres y 20-24 ml día⁻¹ para los hombres (Díaz y col., 2002). Esta cantidad es equivalente a 1-3 bebidas día⁻¹ para los estudios realizados en el Reino Unido (Rimm y col., 1996). Actualmente, hay poca información en la literatura sobre la influencia del estilo de cerveza o el origen en los perfiles minerales de cerveza (Rodrigo y col., 2016).

Los compuestos de la cerveza con propiedades funcionales son, fundamentalmente, alcohol etílico, folatos, flavonoides, arabinosilanos y (1-3),(1-4)-β-D-glucanos. Todas las propiedades positivas de la cerveza exigen su consumo moderado y responsable. En caso de un consumo excesivo, predominarán sin duda los efectos negativos del alcohol (González y col., 2001).

2.5. Clasificación de las cervezas.

La clasificación de las cervezas se puede realizar en función de un sinfín de variables. En este estudio nos hemos centrado en el análisis de cinco variedades de cerveza. A continuación se nombran:

- Blonde ale
- Strong ale
- Ipa
- Doble ipa
- Stout

2.5.1. Según el tipo de fermentación.

Existen básicamente dos grandes tipos de cerveza: Las *lager*, elaboradas con levaduras de “fermentación baja” y las *ale*, elaboradas con levaduras de “fermentación alta”. Dentro de cada uno de estos tipos básicos existen subtipos de diferentes características cuya nomenclatura es variable y confusa. (García y col., 2004). Las cervezas de baja fermentación, *lager*, (fermentación en el fondo), son cervezas ligeras obtenidas cuando la levadura aportada ha trabajado en la parte baja del tanque y que evolucionan mejor a temperaturas más bajas, entre 0° y 5°. Lager es una palabra alemana que significa almacén. Por otro lado, en las cervezas de alta fermentación, el término *ale*, se debe a que las levaduras trabajan a temperatura alta (20°-25°) en la parte alta del tanque de fermentación, transformando los azúcares del mosto en cerveza.

Podemos distinguir entre varias subcategorías. El nombre, en la mayoría de los casos, corresponde al lugar de producción, al proceso productivo o al color, entre otros. En la siguiente figura podemos observar una breve clasificación en función del tipo de fermentación. (García, y col 2004).

TABLA 2.3. Subcategorías de cervezas según el tipo de levadura empleada en su elaboración Lager y Ale. Fuente (García y col., 2004).

Lager	Fermentadas con levaduras bajas
Pilsener, Hell o Pale	Clara, mucho lúpulo, seca. Poco cuerpo.
Dortmunder	Igual que la pilsener pero con menos lúpulo y sabor más suave.
Munich, Dunkel o Dark	Oscura, sabor intenso, aromática, poco lúpulo, poco amarga, dulce, mucho cuerpo.
Bock, Marzen, o Marzenbier	Igual que la Munich pero con más alcohol.

Ale	Fermentadas con levaduras altas
Pale ale	Clara, mucho lúpulo, seca, muy amarga.
Brown ale	Oscura, poco lúpulo, dulce.
Bitter	Clara, mucho lúpulo, mucho cuerpo (pale ale de barril).
Mild ale	Semioscura, dulce, poco densa, amarga.
Stout o Poter	Muy oscura, mucho cuerpo, mucho lúpulo, amarga, dulce o seca.

2.5.2. Según el estilo de la cerveza.

El "Beer Judge Certification Program", conocido como el BJCP, es una organización sin fines de lucro cuyo propósito es promover el conocimiento de la cerveza y la apreciación de la verdadera cerveza, y para reconocer las habilidades de degustación y evaluación de cerveza. En el año 2008 publicaron el programa de certificación para juzgar cervezas. Según esta organización, la cerveza puede clasificarse según el estilo de la misma en las siguientes categorías (Strong, 2008).

1.Light Lager

- 1A.Lite American Lager
- 1B. Standard American Lager
- 1C. Premium American Lager
- 1D. Munich Helles
- 1E. Dortmunder Export

2.Pilsner

- 2A. German Pilsner (Pils)
- 2B. Bohemian Pilsener
- 2C. Classic American Pilsener

3.European Amber Lager

- 3A.Vienna Lager

3B.Oktoberfest/Marzen

4.Dark Lager

- 4A. Dark American Lager
- 4B. Munich Dunkel
- 4C. Schwarzbier (Black Beer)

5.Bock

- 5A. Maibock/Helles Bock
- 5B. Traditional Bock
- 5C. Doppelbock
- 5D. Eisbock

6.Light Hibrid Beer

- 6A. Cream Ale

6B. Blonde Ale

6C. Kölsch

7.Amber Hibrid Beer

7A. Nothern German Altbier

7B. California Common Beer

7C. Düsseldorf Altbier

8.English Pale Ale

8A. Standar/Ordinary Bitter

8B. Special/Best/Premium Bitter

8C. Extra Special/Strong Bitter (Pale Ale)

9.Scottish and Irish Ale

9A. Scottish Light 60/-

9B. Scottish Heavy 70/-

9C. Scottish Export 80/-

9D. Irish Red Ale

9E. Strong Scotch Ale

10.American Ale

10A. American Pale Ale

10B. American Amber Ale

10C. American Brown ale

11.English Brown Ale

11A. Mild

11B.Southern English Brown Ale

11C. Nothern English Brown Ale

12.Porter

12A.Brown Porter

12B. Robust Porter

12C. Baltic Porter

13.Stout

13A. Dry Stout

13B.Sweet Stout

13C.Oatmeal Stout

19A.Old Ale

19B.English Barleywine

13D.Foreingn Extra Stout

13E.American Stout

13F.Imperial Stout

14.India Pale Ale (IPA)

14A.English IPA

14B.American IPA

14C.Imperial IPA

15.German Wheat and Rye Beer

15A.Weizen/Weissbier

15B.Dunkelweizen

15C.Weizenbock

15D.Roggenbier (German Rye Beer)

16.Belgian and French Ale

16A.Witbier

16B.Belgian Pale Ale

16C.Saison

16D.Biere de Garde

16E.Belgian Specialty Ale

17.Sour Ale

17A.Berliner Weisse

17B.Flanders Red Ale

17C.Flanders Brown Ale/Oud Bruin

17D.Straight (Unblended) Lambic

17E.Gueze

17F.Fruit Lambic

18.Belgian Strong Ale

18A.Belgian Blonde Ale

18B.Belgian Dubbel

18C.Belgian Tripel

18D.Belgian Golden Strong Ale

18E.Belgian Dark Strong Ale

19.Strong Ale

19C.American Barleywine

20.Fruit Beer

21.Spice/Herb/vegetable Beer

21A.Spice, Herb o Vegetable Beer

21B.Christmas/Winter Specialty Spiced Beer

22.Smoke Flavored and Wood Aged Beer

22A.Classic Rauchbier

22B.Other Smoked Beer

22C.Wood-Aged Beer

23.Specialty Beer.

2.6. Características organolépticas.

Según el "Beer Judges Certification Program", las cervezas pueden también clasificarse en función de sus características organolépticas en los siguientes tipos:

Blonde ale

- **Aroma:** De ligero a moderado aroma dulce maltoso. Es opcional, pero aceptable, un carácter frutal de bajo a moderado. Puede tener aroma a lúpulo en un nivel de bajo a medio y puede reflejar casi cualquier variedad de lúpulo. Sin diacetilo.
- **Aspecto:** color amarillo claro a dorado profundo. Cristalina a brillante. El nivel de espuma es de bajo a medio, con lo justo para una buena retención.
- **Sabor:** inicialmente un suave sabor a malta dulce, pero opcionalmente también puede estar presente un poco del suave carácter de la malta (pan, tostado, bizcocho, trigo). Los sabores a caramelo típicamente están ausentes. Los ésteres, en un nivel bajo a medio, son opcionales, pero comúnmente están presentes en muchos ejemplos. Sabor a lúpulo de ligero a moderado (cualquier variedad), pero no debe ser demasiado agresivo. El amargor es de bajo a medio, pero el balance es normalmente hacia la malta. De gusto final medio seco a un poco dulce. Sin diacetil.
- **Sensación en boca:** cuerpo medio liviano a medio-pleno. El nivel de carbonatación es de medio a alto. Suave, sin amargor áspero o astringencias.

Strong ale

- **Aroma:** a malta dulce con ésteres frutados, a menudo con una compleja mezcla de aromas a frutas secas, a vino, a caramelo, melazas, nuez, toffee y/o a otras maltas

especiales. Son aceptables algunas notas oxidativas y a alcohol, similares a aquellas que se encuentran en el jerez o en el oporto. Los aromas a lúpulo usualmente no están presentes debido al añejamiento prolongado.

- **Aspecto:** ámbar claro a color marrón-rojizo muy oscuro (la mayoría son bastante oscuras). El añejamiento y la oxidación pueden oscurecer bastante a la cerveza. Puede ser casi opaca (si no lo es debe ser cristalina). La espuma de moderada a baja de color marrón claro, puede ser afectada negativamente por el alcohol y el añejamiento.
- **Sabor:** carácter de medio a alto de la malta, con una deliciosa complejidad de la malta, a menudo con sabores a nuez, caramelo y/o como a melazas. Los sabores a chocolate o a tostado son opcionales, pero nunca deben ser prominentes. El balance a menudo es a dulzor de la malta pero puede estar bien lupulada (la impresión del amargor frecuentemente depende de la cantidad de tiempo de añejamiento). Son comunes los ésteres frutados moderados a altos y puede tomar un carácter a frutas secas o a vino. El gusto final puede variar de seco a un tanto dulce. El extenso añejamiento puede contribuir a los sabores oxidativos similares a un buen jerez añejado, a un oporto o a un vino de Madeira. La graduación alcohólica debe ser evidente aunque no abrumadora. Diacetil bajo a ninguno. Algunas versiones algo añejadas en madera o mezcladas, pueden tener carácter láctico o Brettanomyces pero esto es opcional y no debe ser muy intenso (si así fuera entrarían en la categoría de cervezas especiales).
- **Sensación en boca:** cuerpo de medio a pleno, denso, aunque los ejemplos más viejos pueden ser de cuerpo más reducido debido a la atenuación continuada durante el acondicionamiento. La tibieza del alcohol a menudo es evidente y siempre bienvenida. Carbonatación de baja a moderada dependiendo del añejamiento y el acondicionamiento.

IPA - (*IPA americana*)

- **Aroma:** un prominente a intenso aroma a lúpulo con carácter floral, cítrico, como el del perfume, a pino, resinoso y/o frutal, derivado de los lúpulos americanos. Muchas versiones tienen dry-hopping y pueden tener aroma adicional a hierbas aunque esto no

es requerido. Algo de dulzor maltoso limpio puede hallarse en el gusto de fondo, pero debe ser a un nivel menor que en los ejemplos de cervezas inglesas. En algunas versiones puede detectarse un carácter frutal, ya sea de los ésteres o de los lúpulos, aunque el carácter neutro de la fermentación también es aceptable. Algo de alcohol puede ser percibido.

- **Aspecto:** el color varía de dorado medio a cobre rojizo medio; algunas versiones pueden tener un tinte anaranjado. Debe ser cristalina, aunque las versiones no filtradas, con dry-hopping, pueden ser un poco turbias. Buena espuma, con sostén, de color blancuzca que debe persistir.
- **Sabor:** a lúpulo, medio a alto y debe reflejar un carácter a lúpulo americano con aspectos cítricos, floral, resinoso, a pino o aspectos frutales. El amargor de los lúpulos va de medio-alto a muy alto aunque la columna vertebral de la malta apoyará el fuerte sabor a lúpulo y proporcionará el balance óptimo. El sabor a malta debe ser bajo a medio y generalmente es límpido y con maltosidad dulce aunque son aceptables, a bajos niveles, algo de sabores a caramelo o a tostado. Sin diacetil. Es aceptable un bajo carácter frutal pero no es requerido. El amargor puede permanecer en el retrogusto pero no debe ser áspero. El gusto final es medio seco a seco. Puede percibirse algún sabor a alcohol límpido en las versiones más fuertes. La avena es inapropiada para este estilo. Puede ser levemente sulfurosa pero la mayoría de los ejemplos no exhiben este carácter.
- **Sensación en boca:** cuerpo medio-liviano a medio, suave, sensación en boca sin astringencia derivada del lúpulo, aunque la carbonatación moderada a medio-alta puede combinarse para entregar una sensación seca en su totalidad, en presencia del dulzor de la malta. Alguna tibieza a alcohol puede y debe ser percibida en versiones más fuertes (pero no en todas). El cuerpo es generalmente menor que sus contrapartes inglesas.

Doble IPA o imperial.

- **Aroma:** un prominente a intenso aroma a lúpulo que puede ser derivado de las variedades americanas, inglesas o nobles (aunque un carácter cítrico del lúpulo casi siempre está presente). La mayoría de las versiones tienen dry-hopping y pueden tener un aroma adicional resinoso o a hierba, aunque esto no es absolutamente requerido.

Puede encontrarse algo de dulzor maltoso límpido en el fondo. En algunas versiones también puede detectarse carácter frutal ya sea por los ésteres o por el lúpulo, aunque es típico un carácter neutro de la fermentación. Puede percibirse, usualmente, algo de alcohol, pero no debe tener un carácter “caliente”.

- **Aspecto:** el color varía de ámbar dorado a cobre rojizo medio, algunas versiones pueden tener un tinte anaranjado. Debe ser cristalina, aunque las versiones no filtradas, con dry-hopping, pueden ser un poco turbias. Buena espuma, con sostén, de color blancuzca que debe persistir.
- **Sabor:** a lúpulo intenso y complejo y puede reflejar el uso de variedades de lúpulos americanos, ingleses o nobles. El amargor del lúpulo es alto a absurdamente alto aunque la columna vertebral de la malta generalmente apoyará el fuerte sabor a lúpulo y proporcionará el balance óptimo. El sabor a malta debe ser bajo a medio y generalmente es límpido y maltoso aunque son aceptables, a bajos niveles, algo de sabores a caramelo o a tostado. Sin diacetil. Es aceptable un bajo carácter frutal pero no es requerido. Una larga, larga persistencia del amargor, está usualmente presente en el retrogusto pero no debe ser áspera. El gusto final es medio-seco a seco. Un sabor a alcohol límpido, suave, usualmente está presente. La avena es inapropiada para este estilo. Puede ser levemente sulfurosa pero la mayoría de los ejemplos no exhiben este carácter.
- **Sensación en boca:** cuerpo medio-liviano a medio-pleno, suave. Sin astringencia áspera derivada del lúpulo, aunque la carbonatación moderada a medio-alta puede combinarse para entregar una sensación seca en su totalidad, en presencia del dulzor de la malta. Suave tibieza a alcohol.

Stout

- **Aroma:** son prominentes los aromas a malta tostada y cebada tostada con aroma similar al café, puede tener leves notas secundarias de chocolate, cacao y/o granos. Ésteres medio-bajos a ninguno. Sin diacetil. El aroma del lúpulo de bajo a ninguno.
- **Aspecto:** color negro azabache a marrón profundo con reflejos granate en el color. Puede ser opaca (si no lo es, debe ser cristalina). Espuma gruesa, cremosa, persistente, es característico el color marrón claro (como el del café claro o la canela) a marrón.

- **Sabor:** tostado moderado, intensidad de los granos, opcionalmente con leve a moderado gusto agrio-ácido y lúpulo de amargor de medio a alto. Gusto final seco, como a café, proveniente de los granos tostados. Puede tener un carácter a chocolate agridulce o chocolate sin dulzor en el gusto en paladar, prolongándose en el gusto final. El equilibrio entre los factores puede incluir algo de cremosidad, carácter frutal medio-bajo a ninguno y lúpulo de sabor medio a ninguno. Sin diacetíl.
- **Sensación en boca:** cuerpo medio-liviano a medio-pleno, con un carácter cremoso. Baja a moderada carbonatación. Para el nivel alto de lúpulo de amargor y la proporción significativa de granos oscuros que presente, esta cerveza es remarcadamente suave. La percepción del cuerpo puede estar afectada por la densidad en general con cervezas suaves siendo algunas cervezas más livianas. Puede tener una ligera astringencia proveniente de los granos tostados, aunque la aspereza es indeseable.

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El sector de la elaboración de cervezas de forma artesanal está en plena ebullición en nuestra región. Las cervezas artesanales fabricadas en Extremadura alcanzan un alto compromiso de sabor y pureza, respetando los estilos tradicionales basados en materias primas de alta calidad.

La cerveza se ha considerado desde la antigüedad como el pan líquido y se le atribuyen un sinnúmero de beneficios siempre que se consuma de forma responsable. Actualmente están aflorando una gran variedad de estilos de cerveza y observamos la necesidad de establecer parámetros que nos ayuden a diferenciarlas y clasificarlas. Para la realización de este estudio se han seleccionado cinco tipos diferentes de cerveza artesanal en base a sus características organolépticas, con la finalidad de poder ofrecer resultados representativos dentro de la amplia gama de variedades que podemos encontrar actualmente en el mercado.

Los objetivos que se pretenden conseguir con la realización del presente trabajo fin de grado son los que se exponen a continuación:

- Caracterización física y química de distintas cervezas artesanales elaboradas en nuestra región.
- Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos más importantes presentes en los diferentes tipos de cerveza.
- Estudio de la capacidad antioxidante *in vitro* de la cerveza artesanal
- Servir de base para futuros trabajos y proyectos que se planteen en relación a la mejora de la calidad y procesado de las cervezas artesanales.

CAPÍTULO IV
MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material.

4.1.1. Reactivos.

Los productos químicos empleados en el desarrollo de la parte experimental de este estudio fueron suministrados por las firmas comerciales PANREAC (Barcelona, España), SIGMA (St. Louis, MO. EEUU) y SCHARLAU CHEMIE S.A. (Barcelona, España); en todos los casos fueron al menos de calidad reactivo para análisis.

4.1.2. Equipos utilizados.

Las pesadas de precisión se realizaron en una balanza analítica METTLER TOLEDO, Mod. AB54-S ($\pm 0,0001$ g), en tanto que para las pesadas rutinarias se utilizó una balanza digital NAHITA, Mod. 5041/250 ($\pm 0,1$ g).

Para medir volúmenes se utilizaron pipetas automáticas WITOPED DIGITAL (mod. Biohit Proline).

Las centrifugaciones fueron realizadas a 4 °C en una centrífuga EPPENDORF (mod. Centrifuge 5810-R).

El pH se midió con un pHmetro (pHmeter basic 20+ CRISON).

Para la medición del color se utilizó un colorímetro MINOLTA, Mod. Chroma Meter CR-600.

Para la extracción del alcohol se utilizó una unidad de destilado semi-automática VELP SCIENTIFICA.

Para la turbidez se utilizó un medidor de turbidez PORTABLE HAZE METER ASBC compliant, HI 847492.

La extracción de los polifenoles se realizó utilizando un rotavapor HEIDOLPH, Mod. Laborota 4000 conectado a una bomba de vacío DINKO, Mod. D-95.

Las medidas de las absorbancias fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis modelo biomate 3, de la marca THERMO SCIENTIFIC.

Para la identificación y cuantificación del perfil de compuestos fenólicos se utilizó un equipo HPLC.

Para el almacenamiento a -80 °C se utilizó un congelador FORMA SCIENTIFIC (mod. 917).

Durante la descongelación de las muestras, 24 horas antes de la realización de los análisis se almacenaron en un frigorífico ZANUSSI del laboratorio de la Escuela de Ingenierías Agrarias a una temperatura de 4°C.

4.1.3. Software.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleó el programa informático SPSS para Windows (UEX, 2009), utilizándose el programa EXCEL 2007 para el manejo y ordenación de los mismos.

4.1.4. Obtención de las muestras de cerveza.

Para la realización de este estudio se partió 16 botellines de cerveza de 33 cl y de 4 botellas de 0.75 cl, procedente de la empresa (Cervecería artesana natural extremeña S.L.), situada en el polígono industrial “El Nevero”, calle 18 A 19, Nave 25, Badajoz.

Se estudiaron cinco tipos de cervezas: Blonde ale, Strong ale, Ipa, Doble Ipa y Stout.

Los ingredientes empleados en la elaboración de las cervezas fueron los que se presentan en la siguiente tabla.

TABLA 4.1. Ingredientes empleados en la elaboración de las cervezas. Fuente: Elaboración propia a partir de las recetas de elaboración del maestro cervecero.

	Blonde ale	Strong ale	Ipa	Doble Ipa	Stout
Maltas (%)					
Pilsen	85.40	-	80.00	83.30	79.70
Cara20	6.10	-	10.00	4.20	3.98
Trigo	6.10	-	-	-	-
Biscuit	2.40	5.60	-	-	-
Pale	-	83.30	-	-	-
Cara120	-	11.10	5.00	-	3.98
Cara50	-	-	5.00	4.20	-
Munich15	-	-	-	8.30	-
Special B	-	-	-	-	3.98
Mroost 1400	-	-	-	-	3.98
Avena	-	-	-	-	2.39
Roasted Barley	-	-	-	-	1.99
Lúpulos (%)					
Centennial	33.30	-	-	-	-
Hhallertauer	66.70	-	-	-	-
Polaris	-	50.00	-	-	-
Willamett	-	50.00	-	-	-
Columbus	-	-	7.70	-	-
Simcoe	-	-	38.46	6.90	-
Citra	-	-	30.77	-	-
Amarillo	-	-	23.07	-	-
Mandarina	-	-	-	27.59	-
Summit	-	-	-	13.80	-
Mosaic	-	-	-	17.24	-
Saphire	-	-	-	34.47	-
Magnum	-	-	-	-	26.66
Perle	-	-	-	-	60.00
EKG	-	-	-	-	13.34
Composición de la elaboración (%)					
Agua	85.50	82.92	81.08	78.54	76.92
Maltas	15.40	16.96	18.43	20.95	21.95
Lúpulos	0.09	0.08	0.48	0.51	0.08
Levaduras	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02

Todas las muestras fueron almacenadas en refrigeración en las cámaras de planta piloto de la Escuela de Ingenierías Agrarias a una temperatura de 7 °C hasta el momento de comenzar los análisis.

Las muestras para el análisis de amargor, turbidez, polifenoles y actividad antioxidante, fueron almacenadas en un congelador a – 80 °C, en un congelador FORMA SCIENTIFIC (mod. 917), hasta 24 horas antes del análisis.

Para descongelar las muestras, 24 horas antes del análisis de amargor, turbidez, polifenoles y actividad antioxidante, fueron almacenadas en un frigorífico ZANUSSI del laboratorio de la Escuela de Ingenierías Agrarias a una temperatura de 4°C.

4.1.5. Material utilizado.

Material de vidrio; matraces aforados, vasos de precipitado, probetas, embudos de vidrio, erlenmeyer, matraces de fondo redondo, pipetas estériles, buretas, pipetas pasteur, perlas de vidrio.

Gradillas, filtros de nylon, frascos lavadores, imanes, bateas, tubos falcón, tubos de centrifugas, viales, jeringas, espátulas,...

4.2. Metodología

4.2.1. Obtención de las cervezas artesanales.

Las cervezas fueron suministradas por la empresa “Cervecería Artesana Natural Extremeña S.L.” un total de 4 botellas de 33cl de cerveza (n=4) y 1 de 70cl de cerveza (n=4) Las 20 muestras fueron conservadas en refrigeración hasta el momento de comenzar con los análisis (no más de una semana).

4.2.2. Conservación de las muestras.

Para una adecuada conservación de las muestras, se procedió a desgasificar cada una de las cervezas. La desgasificación se realizó mediante agitación automática en vasos de precipitado de 1000 ml durante 30 min. Posteriormente se procedió a conservar a -80°C las muestras que no iban a ser analizadas en ese momento.

4.2.3. Análisis de las características físico-químicas.

Se llevaron a cabo las determinaciones físico-químicas inmediatas ($n=4$). Estos análisis se realizaron en los laboratorios del Área de Tecnología de los Alimentos en la Escuela de Ingeniería Agrarias de la UEX. La metodología se desarrolló de la siguiente manera:

4.2.3.1. Medición instrumental del pH.

El pH se determinó siguiendo el protocolo de la AOAC (1995). La cerveza se desgasificó durante 30 minutos en agitación constante, se atemperó la cerveza a 20°C midiéndose el pH con un pHmetro previamente calibrado.

4.2.3.2. Medición instrumental del grado alcohólico.

En la determinación del grado de alcohol, se usó la metodología descrita por Schmidt-Hebbel (1966). Se tomaron 100 ml de cerveza previamente desgasificada en un tubo de destilación Kjeldal, junto 6 perlas de vidrio, para evitar la producción de una cantidad excesiva de espuma. En la zona de recogida del destilado se situó un Erlenmeyer con 25 ml de agua destilada. Una vez terminado el programa de destilado se recogieron unos 75 ml de destilado. A continuación, se echó el destilado en una probeta graduada, completando el volumen hasta 100 ml con agua destilada. Finalmente, se procedió a medir el grado alcohólico con el alcoholímetro de Gay-Lussac a 20°C .

4.2.3.3. Medición instrumental del color.

El color de la cerveza fue analizado inmediatamente después de la desgasificación.

Se determinaron las coordenadas (L^*) luminosidad, (a^* , rojo \pm verde) intensidad del color rojo, y (b^* , amarillo \pm azul) intensidad del color amarillo. Los parámetros de color se determinaron usando un colorímetro de reflectancia Minolta CR-600 (Minolta Cámara Co, Osaka, Japón) (Iluminación de 65/0° observador estándar 0,8 cm puerto/área de visualización). Previo a su uso, el colorímetro se estandarizó usando un azulejo blanco (mod CR-A43).

4.2.3.4. Medición instrumental de la turbidez.

Para la determinación de la turbidez se utilizó un medidor de turbidez PORTABLE HAZE METER ASBC compliant, HI 847492. Para ello se introdujeron 10 ml de muestra en el recipiente que trae el turbidímetro y se dejaron en un baño con hielo durante 24 horas a una temperatura de 0°C. Tras las 24 horas se realizó la medición siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se describen a continuación:

1. Se encendió el equipo con antelación suficiente, para conseguir la estabilidad de la señal luminosa.
2. Se realizó el calibrado del aparato utilizando los patrones adecuados, siguiendo el manual de uso y la instrucción técnica correspondiente.
3. Se limpió el exterior del vial y se puso un poco de aceite de silicona en el exterior del vial, distribuyéndolo con un paño suave. El objeto del aceite es evitar daños en la superficie del vial o cubeta. Se efectuó la lectura de las muestra, expresando su resultado en FTU.

4.2.3.5. Medición instrumental del amargor.

La determinación del grado de amargor se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por la AOAC (1995). Se transfirieron 10 ml de cerveza atemperada a 10°C, a un tubo centrífuga de 50 ml, y se homogenizó con 20 ml de iso-octano (2,2,4, trimetilpentano) en un medio acidificado con 1 ml de HCl 3N. A continuación se centrifugó a 3500 rpm durante 15

minutos. Se separó el sobrenadante midiéndose la absorbancia frente a un blanco con iso-octano, a 275 nm. El resultado se expresó en grados IBU° mediante la siguiente fórmula:

$$^{\circ} \text{IBU} = 50 \times A_{275}, \quad (4.1.)$$

dónde A_{275} es la absorbancia de la muestra a 275 nm y el coeficiente 50 (redondeado del valor 51.2) que relaciona la pendiente de la correlación y la relación de disolvente utilizado.

Este método fue propuesto por el equipo de A.B. Moltke y M. Meilgaard, (1995), los cuales midieron y analizaron datos y desarrollaron la ecuación por regresión lineal para el amargor percibido en función de las medidas espectrofotométricas. El European Breweing Congress (EBC) y la American Society of Brewing Chemists (ASBC) trabajaron sobre este método para desarrollar finalmente, en 1968, la ecuación que a día de hoy se sigue utilizando para determinar el amargor.

Este método no mide únicamente iso- α -ácidos. De hecho, la adición de 1ppm de iso- α -ácidos a una muestra, sólo incrementa el valor IBU en 0,7 unidades.

La cromatografía de líquidos a alta resolución (HPLC), es una técnica que también se utiliza para separar y determinar los iso- α -ácidos del lúpulo, aunque puede llevar a errores del 10% y es poco adecuada para uso rutinario en producción (Tomlinson y col., 1995).

4.2.4. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*.

4.2.4.1. Determinación de la actividad secuestradora del radical libre DPPH.

La actividad secuestradora del radical libre DPPH (ASR) de los extractos acuosos fue determinada de acuerdo con el método descrito por (Broncano y col, 2001), con ligeras modificaciones. Se elaboraron diluciones de cerveza con agua destilada a seis concentraciones diferentes (TABLA 3.2.). De cada una de estas soluciones se cogieron 0,5 ml y se mezclaron con 500 μ l de etanol absoluto (99,5 %) y con 125 μ l de etanol absoluto (99,5 %) conteniendo 0,03 % de DPPH. La mezcla fue conservada en oscuridad a temperatura ambiente durante 45 min, antes de medir su absorbancia a 517 nm. El DPPH en forma radical tiene su máximo de absorbancia a 517 nm. Por tanto, una baja absorbancia indica alta capacidad secuestradora del

radical DPPH. La actividad secuestradora de radicales se calcula utilizando la siguiente formula:

$$\text{Capacidad secuestradora de radicales (\%)} = [(Ac - Am)/Ac] \times 100 \quad (4.2)$$

Donde Am es la absorbancia de la muestra y Ac es la absorbancia del control negativo con agua destilada en lugar de muestra.

La vitamina C fue utilizada como control positivo a las mismas concentraciones que las muestras, con el objetivo de comparar su actividad secuestradora con la de las muestras de cerveza. Las medidas de la ASR de la vitamina C se hicieron por triplicado. Tras la medición de los resultados se determinó que la dilución 0,1 fue la más adecuada a la hora de realizar los análisis. De aquí en adelante utilizaremos como muestra la dilución 0,1.

TABLA 4.2. Diluciones de cerveza. Fuente: Elaboración propia.

Concentración	Muestra (μl)	Agua destilada (μl)
1	500	-
0.8	400	100
0.6	300	200
0.4	200	300
0.2	100	400
0.1	50	450

4.2.5. Determinación del contenido en polifenoles totales.

La determinación de polifenoles totales de cerveza se determinó de acuerdo con el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) con algunas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 0.1 ml de muestra de cerveza, 0.4 ml de agua desionizada con 2.5 ml de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu diluido 10 veces y se dejó reaccionar durante 5 min. A continuación, se añadieron 2 ml de solución de Na₂CO₃ al 7,5%, y el volumen final se completó hasta 10 ml con agua desionizada. Después de 1 h de reacción a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia 760 nm. La medida se comparó con una línea de

calibración de la solución preparada de ácido gálico (GA), y los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de cerveza (mg GAE / l).

4.2.6. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos.

Para la extracción de los compuestos fenólicos se procedió de la siguiente manera. En un tubo de centrífuga se echaron 10 gramos de NaCl, 25 ml de ethyl acetate y 10 ml de la cerveza. Se agitó y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se añadió 25 ml de ethyl acetate al tubo de centrifuga, se agitó, se centrifugó y se extrajo el sobrenadante. Nuevamente se añadió 25 ml de ethyl acetate al tubo de centrifuga, se agitó, se centrifugó y se extrajo el sobrenadante. Se destilaron los 70 ml de obtenido en la extracción. Para recuperar los fenoles se añadió 1 ml de metanol, se pipeteó y se introdujo en los viales haciéndolos pasar por un filtro hidrófilo. Los viales se guardaron a -80°C hasta el momento de analizarse en el HPLC.

Los análisis de HPLC se realizaron usando una bomba Waters 1525 (Waters, Milford, MA) equipada con un autoamplificador Waters 717 plus acoplado con un detector de absorbancia Waters 2478 dual k a 280 y 254 nm de acuerdo con un protocolo establecido (Zhao y col., 2006). La separación se realizó con una columna Symmetry C18 (5 lm, 3.9 mm \ leq 150 mm) (Waters, Milford, MA) a temperatura ambiente. La elución se llevó a cabo usando un procedimiento de gradiente con una fase móvil que contenía disolvente A (ácido acético al 0.1% en agua) y disolvente B (ácido acético al 0.1% en metanol) de la siguiente manera: 0 min, 5% B; 15 min, 20% de B; 35 min, 40% de B; 42 min, 65% de B; 50 min, 80% de B; 52 min, 5% de B; 60 min, 5% B. El tiempo de funcionamiento fue de 60 min, el caudal de disolvente fue de 0.8 ml / min y el volumen de inyección fue de 10 l. Los compuestos fenólicos se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención y parámetros espectrales con los de las normas. Las concentraciones de compuestos fenólicos individuales en la cerveza se calcularon usando líneas de calibración. Los resultados se expresaron en miligramos por litro de cerveza (mg / l)

4.2.7. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se expresaron como $\text{media} \pm \text{error estándar}$ de la media para cada una de las cervezas en estudio. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el Modelo Lineal General (MGL) para llevar a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) con (SPSS v.15.0 Institute Inc., Cary, NC). Las medias se compararon mediante prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson mediante el programa estadístico SPSS v.15.0.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis de las características físico-químicas.

En la tabla 5.1. se representan los resultados de las mediciones instrumentales de pH, grado alcohólico, turbidez, color, amargor y contenido en compuestos fenólicos totales para cada una de las distintas cervezas artesanales evaluadas.

TABLA 5.1. pH, grado alcohólico, Turbidez (FTU), Amargor ($^{\circ}$ IBU), parámetros colorimétricos y polifenoles totales (mg GAE/l). Niveles de significación: ***=P<0.001; a, b, c: Diferentes letras indican diferencias significativas entre cervezas, test de Tukey.

	Doble ipa	Strong ale	Blonde ale	Ipa	Stout	P
pH	4.53±0.03a	4.33±0.03bc	4.27±0.01b	4.41±0.01b	4.31±0.02b	***
Grado Alcohólico	9.00±0.20a	6.00±0.20b	6.75±0.14b	8.00±0.54a	8.50±0.20a	***
Turbidez (FTU)	41.78±1.55a	37.65±4.59a	24.85±0.97b	35.95±1.97a	4.90±0.80c	***
Amargor ($^{\circ}$ IBU)	8.05±0.31a	3.08±0.53c	3.48±0.46c	8.10±0.54a	4.98±0.47b	***
L*	27.45±0.09ab	27.43±0.01ab	27.88±0.30a	27.16±0.17b	25.69±0.12c	***
a*	0.54±0.03a	0.84±0.15a	0.14±0.03b	0.78±0.06a	-0.11±0.03b	***
b*	1.10±0.16b	1.41±0.13ab	1.92±0.26a	1.54±0.06ab	0.00±0.09c	***
pH	4.53±0.03a	4.33±0.03bc	4.27±0.01b	4.41±0.01b	4.31±0.02b	***
Polifenoles totales (mg GAE/l)	291.60±6.00b	255.10±10.50c	178.20±8.10d	254.00±3.50c	386.30±2.80a	***

5.1.1. Medición instrumental del pH.

El pH es un factor importante en la fermentación, debido al control que ejerce frente a la contaminación bacteriana así como el crecimiento de las levaduras, la velocidad de

fermentación y la producción de alcohol. Durante la fermentación anaeróbica se produce, aparte de etanol, una serie de ácidos orgánicos como el láctico, propiónico y pirúvico que influyen en la disminución del pH. La producción de carbónico, durante la fermentación, al encontrarse en disolución provoca una caída de pH. El valor de pH óptimo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra entre 4.4 y 5 siendo el óptimo 4.5.

Los valores de pH obtenidos en el presente trabajo de investigación oscilaron entre un mínimo de 4.27 ± 0.01 en el caso de la cerveza tipo Blonde ale hasta un máximo de 4.53 ± 0.03 para la Doble Ipa. El rango de valores encontrados en esta investigación fue similar al señalado por (Kunze, 1996), el cual indicó que el pH se situaba entre 4.2 y 4.4 en el caso de cervezas industriales, y los obtenidos por (García-Latorre, 2016) (4.31 ± 0.04) en cervezas artesanales. Valores inferiores a los del presente trabajo, fueron encontrados por (Swistowicz, 1977), quien registró un promedio de pH de 4.1, si bien en ese caso las cervezas fueron tipo Lager. Según el Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprobó la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta, se establece que desde el punto de vista de la calidad alimentaria, además de los requisitos establecidos en sus respectivas definiciones, la cerveza y las bebidas de malta deberán presentar un valor de pH inferior a 5.5, por lo tanto los valores obtenidos en el presente trabajo de investigación cumplen con la normativa vigente.

Por otra parte, existieron diferencias significativas para el valor de pH entre las distintas cervezas artesanales estudiadas ($P < 0.001$), presentando la Doble Ipa el valor más elevado y la Stout el menor valor.

5.1.2. Medición instrumental del Grado Alcohólico.

En la tabla 5.1. se encuentran los valores de grado alcohólico obtenidos. Al analizar los datos referentes al grado alcohólico se observó que las distintas cervezas artesanales presentaron diferencias significativas ($P < 0.001$) para dicho parámetro. El valor más bajo se encontró en la Strong Ale (6.00 ± 0.20) seguido de la Blonde Ale (6.75 ± 0.01). La Doble Ipa (9.00 ± 0.20) y la Stout (8.50 ± 0.20) reflejaron los valores más elevados. En el mercado se pueden encontrar a día de hoy cervezas, principalmente artesanales o especiales, con valores similares a los obtenidos en este estudio. El contenido en alcohol obtenido en el presente estudio fue superior al presente en el etiquetado del producto y superior a los valores obtenidos por (Gutiérrez, 2002) tanto para cervezas artesanales como industriales.

Por norma general las cervezas artesanales no se pasteurizan. Por ello un grado alcohólico mayor al de las cervezas industriales junto con un pH inferior a 4.5 permiten prolongar la vida útil del producto. Esta tecnología de obstáculos es muy útil para productos de este tipo que no se someten a tratamientos térmicos (Leinstner y col., 1995).

5.1.3. Medición instrumental de la turbidez.

Los resultados de turbidez se han expresado en FTU (Formazin Turbidity Unit) donde 1FTU equivale a 4 EBC. En cuanto a los valores de turbidez, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) entre los distintos lotes. Por un lado, la Doble Ipa (41.78 ± 1.55), Strong ale (37.65 ± 4.59) e Ipa (35.95 ± 1.97) mostraron los valores de turbidez más altos, seguidos por la Blonde ale (24.85 ± 0.97) y finalmente la Stout, que tuvo los valores de turbidez más bajos (4.90 ± 0.80). Estos resultados fueron muy superiores a los señalados por (Rodríguez, 2003), para cervezas tipo Lager (9.64 ± 0.03 FTU) que observó un valor mínimo de 7.84 FTU y un valor máximo de 12 FTU; y a los obtenidos por (Posada, 1995), quienes indicaron que el valor promedio de turbidez debe ser menor a 2 FTU para cervezas industriales. De acuerdo al estándar del ASBC (American Society Brewing Chemists) las cervezas analizadas se clasificaron como bastante opacas.

Los valores que obtuvimos durante el análisis están muy alejados de los 2 FTU aplicables a las cervezas industriales pero hay que señalar que las cervezas analizadas son de estilo artesanal y poseen una turbidez biológica (Bamforth, 1999). Estas cervezas artesanales se caracterizan por su ausencia de filtración, que no están pasteurizadas y existe una segunda fermentación en la propia botella. Por todo ello, los valores elevados de turbidez eran de esperar en el presente trabajo de investigación.

5.1.4. Medición instrumental del color.

Se determinaron las coordenadas luminosidad (L^*), intensidad del color rojo (a^* , rojo \pm verde), y intensidad del color amarillo (b^* , amarillo \pm azul) en las diferentes cervezas y se obtuvieron los resultados reflejados en la tabla 5.1. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) entre los cinco tipos de cervezas artesanales analizados. A la vista de los resultados se vio que el valor de L^* fue positivo y similar en todas las muestras exceptos

para la Stout que mostraba un valor inferior, indicando así una menor luminosidad. El parámetro a^* fue positivo y similar para Strong ale, Ipa y Doble ipa, ligeramente inferior en la Blonde ale y llegó a valores negativos en la Stout. Para el parámetro b^* nos encontramos con valores positivos. El valor más alto en la Blonde ale y el más bajo en la Stout. Los resultados se ajustan a los valores esperados ya que como pudimos ver en la clasificación realizada por (Strong, 2008) para el "Beer Judge Certification Program" (BJCP), la Blonde ale es de color amarillo claro o dorado profundo, la Doble ipa varía entre el ámbar dorado y cobre rojizo medio, la Strong ale de ámbar claro a color marrón-rojizo muy oscuro y la Stout de color negro azabache a marrón profundo con reflejos granate.

5.1.5. Medición instrumental del amargor.

Los resultados obtenidos siguiendo el procedimiento de análisis descrito para el cálculo de grados IBU (International Bitterness Unit), se muestran en la anterior tabla 5.1. Los grados IBU reflejan la medida de los iso- α -ácidos del lúpulo contenido en la cerveza y otros componentes de la misma, como polifenoles naturales o sintéticos con cualidades antioxidantes. Durante el almacenamiento se produce una pérdida de moléculas que producen amargor debido a procesos oxidativos o por la unión de los polifenoles a las proteínas presentes en la cerveza, por lo que no se puede descartar que los valores iniciales fuesen ligeramente superiores a los obtenidos.

Los valores de amargor mostrados en la tabla 5.1, indican que las cervezas artesanales analizadas tienen un amargor bajo en comparación con los resultados observados en otros estudios, en los cuales se analizaron cervezas de todos los estilos con valores que llegaban a hasta los 45 ° IBU (Suarez, 2013)

Respecto a las diferencias entre cervezas artesanales, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) entre los cinco tipos de cervezas artesanales analizados. Es importante destacar que la cantidad y los tipos de lúpulos empleados en la fabricación son decisivos a la hora de proporcionar las características organolépticas de las cervezas, como el amargor. De hecho, podemos observar que las cervezas con mayor porcentaje de lúpulos, como la Doble ipa (0.51%) e Ipa (0.48%) mostraron los valores más altos y la Blonde ale (0.09%) y Strong ale (0.08%) los más bajos.

5.2. Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*.

5.2.1. Determinación de la actividad secuestradora del radical libre DPPH.

El 1,1-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre estable que presenta una coloración púrpura en medio metanólico. Cuando hay donación de un electrón o un protón por un compuesto con poder antioxidante esta tonalidad desaparece (Naranjo y col., 2011). En la tabla 5.2. se muestran los resultados expresados como porcentaje de capacidad secuestradora de radicales DPPH. Como se observa en dicha tabla, hubo diferencias estadísticamente significativas para la actividad antioxidante entre las distintas cervezas artesanales en estudio ($P < 0.001$). Como podemos observar en la tabla número 5.2, la vitamina C mostro un porcentaje de capacidad secuestradora de radicales de (94.87 ± 0.30) . La Stout (34.48 ± 1.21) obtuvo los valores más altos y La Blonde ale (8.07 ± 1.25) los más bajos.

Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre las variables estudiadas (Tabla 5.3.) Los resultados mostraron correlaciones significativas al nivel 0.01 entre la actividad secuestradora del radical libre DPPH y las coordenada del color L (luminosidad) de ($R^2 = -0.805$); la b^* (amarillo±azul) intensidad del color amarillo de ($R^2 = -0.841$) y el contenido en polifenoles totales de ($R^2 = 0.943$). La cerveza Stout pertenece al grupo de cervezas negras en las cuales se realiza un tostado y por consiguiente se producen reacciones de Maillard que incrementan su contenido en compuestos antioxidantes de ahí que destacasen sus valores con respecto a las demás muestras.

TABLA 5.2. Actividad antioxidante *in vitro* en las distintas cervezas en estudio. (%) DPPH = (%) capacidad secuestradora de radicales DPPH. Niveles de significación: ***= $P < 0.001$; a, b, c,d,e,: Diferentes letras indican diferencias significativas entre cervezas, test de Tukey.

	CONTROL	Doble ipa	Strong ale	Blonde ale	Ipa	Stout	P
	+						
(%) DPPH	94.87±0.30a	24.53±0.57c	21.51±0.98cd	8.07±0.93e	20.72±1.25d	34.48±1.21b	***

TABLA 5. 3. Correlación de Pearson. Parámetros colorimétricos, pH, grado alcohólico, Turbidez (FTU), Amargor (°IBU), y polifenoles totales (mg GAE/l), % capacidad secuestradora del radical DPPH. *. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral). **. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

		L	a	b	PH	° OH	Turbidez (FTU)	° IBU (50xA275nm)	Polifenoles (mg GAE/l)	DPPH capacidad secuestradora de radicales (%)
L	Correlación de Pearson	1	.466*	.747**	.086	-.390	.699**	-.087	-.840**	-.805**
	Sig. (bilateral)		.038	.000	.717	.089	.001	.714	.000	.000
A	Correlación de Pearson	.466*	1	.541*	.323	-.229	.731**	.253	-.377	-.176
	Sig. (bilateral)	.038		.014	.165	.332	.000	.283	.102	.457
B	Correlación de Pearson	.747**	.541*	1	-.071	-.486*	.547*	-.105	-.922**	-.841**
	Sig. (bilateral)	.000	.014		.768	.030	.013	.660	.000	.000
PH	Correlación de Pearson	.086	.323	-.071	1	.540*	.582**	.743**	.181	.211
	Sig. (bilateral)	.717	.165	.768		.014	.007	.000	.446	.372
° Grado alcohólico	Correlación de Pearson	-.390	-.229	-.486*	.540*	1	-.170	.698**	.531*	.513*
	Sig. (bilateral)	.089	.332	.030	.014		.474	.001	.016	.021
Turbidez (FTU)	Correlación de Pearson	.699**	.731**	.547*	.582**	-.170	1	.289	-.481*	-.385
	Sig. (bilateral)	.001	.000	.013	.007	.474		.217	.032	.093
Amargor (° IBU) (50xA275nm)	Correlación de Pearson	-.087	.253	-.105	.743**	.698**	.289	1	.226	.293
	Sig. (bilateral)	.714	.283	.660	.000	.001	.217		.337	.210
Polifenoles (mg GAE/l)	Correlación de Pearson	-.840**	-.377	-.922**	.181	.531*	-.481*	.226	1	.943**
	Sig. (bilateral)	.000	.102	.000	.446	.016	.032	.337		.000
(% capacidad secuestradora de radicales DPPH)	Correlación de Pearson	-.805**	-.176	-.841**	.211	.513*	-.385	.293	.943**	1
	Sig. (bilateral)	.000	.457	.000	.372	.021	.093	.210	.000	

Los fenoles tienen la capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno debido a su propiedad como donadores de electrones. La efectividad de su capacidad antioxidante va a depender de su estabilidad en los diferentes sistemas, así como también del número y localización de grupos hidroxilo. En muchos estudios *in vitro* los compuestos fenólicos han demostrado alta actividad antioxidante, incluso mayor que la presentada por vitaminas y carotenoides (Vinson y col, 1995). Los resultados obtenidos, por tanto, reflejan nuevamente los beneficios de incluir la cerveza dentro de una alimentación variada y equilibrada. No debemos olvidar que el consumo moderado de pequeñas cantidades de alcohol es favorable para la salud de las personas mayores de edad.

5.3. Determinación del contenido en polifenoles totales.

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor de los vegetales. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres (Kuskoski y col, 2005).

En la tabla 5.1 se presentan los datos del contenido en polifenoles totales. Los datos más bajos los encontramos en la Blonde ale (178.20 ± 8.10 mg GAE/l). La Ipa (254.005 ± 3.50 mg GAE/l) y la Strong ale (255.105 ± 10.50 mg GAE/l) mostraron valores muy similares entre ellas. La Doble ipa (291.60 ± 6.00 mg GAE/l) se situó por encima de las anteriores. La cerveza con el mayor valor en polifenoles totales fue la Stout (386.305 ± 2.80 mg GAE/l). Las diferencias en el contenido en polifenoles totales fueron estadísticamente significativas ($P < 0.001$). Los polifenoles presentes en la cerveza provienen esencialmente de la cáscara de la cebada malteada y del lúpulo (González y col., 2001). En este sentido, se observó que las cervezas que contenían mayor porcentaje de malta y lúpulo, como la Stout (22.03%) y la Doble ipa (21.46%) reflejaron un mayor contenido de polifenoles y la Blonde ale que contenía un (15.49%) de malta y lúpulo obtuvo los contenidos más bajos.

En la bibliografía hemos encontrado estudios realizados a cervezas como por ejemplo el realizado por (Zhao y col., 2010) sobre el perfil de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en cervezas comerciales, que nos muestran valores de polifenoles totales que iban desde los 152.01 mg GAE/l hasta los 339.12 mg GAE/l. Al realizar el análisis de

correlación de Pearson se mostraron correlaciones significativas entre el contenido en polifenoles totales y las coordenada del color L (luminosidad) de ($R^2=-0.840$; $P<0.01$).

5.4. Identificación y cuantificación del compuestos fenólicos.

La cerveza es una de las principales fuentes de compuestos fenólicos, los cuales contribuyen a la formación de la espuma, aroma, color y propiedades sensoriales de la cerveza.

Las cervezas de distintos tipos presentan normalmente un perfil fenólico similar, pero pueden existir variaciones significativas en la cantidad de compuestos individuales concretos debido a la materia prima, proceso de elaboración, etc. (Zhao, 2014) La tabla 5.4. se muestra el porcentaje de cada uno de los compuestos fenólicos identificados y cuantificados en los distintos tipos de cerveza analizada. La mayoría de estos compuestos se han seleccionado en base a su identificación previa en otros trabajos (Nardini y Ghiselli, 2004; Quifer-Rada y col., 2015).

Se han identificado y cuantificado ácidos fenólicos pertenecientes al grupo químico de los ácidos hidroxibenzoico, tales como el ácido gálico, el protocatechuico, 4-hidroxibenzoico y vanillico. Estos compuestos tienen una estructura química basada en C6-C1 y son los mayoritarios en la cerveza junto con los flavonoides (Zhao y col., 2010; Piazzon y col., 2010)

También se han identificado en el presente estudio ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico, cumarínico, transferúlico y sinapico. Estos tienen una estructura química común (C6-C3) con un doble enlace en la cadena lateral, en configuración -cis o -trans. Los ácidos hidroxicinámicos son metabolitos secundarios generados a partir de fenilalanina y tirosina y son los precursores de otros polifenoles en otras rutas metabólicas vegetales (El-Seedi y col., 2012)

Se ha identificado también el ácido hidroxifenilacético. La cerveza, de hecho, es una de las principales fuentes de este ácido en las dietas europeas, además de las aceitunas, sidra o vino (Zamora-Ros y col., 2013).

La catequina es un compuesto flavonoide, concretamente un flavanol. Los flavonoides son una familia muy extensa de compuestos con una estructura química común: un esqueleto de

difenilpropano con dos anillos de benzeno conectados por un anillo de pirano ligado a uno de los anillos de benzeno.

Respecto a las diferencias entre cervezas analizadas, hay que destacar el mayor contenido en catequina y ácido transferúlico en la cerveza tipo Stout, en comparación con el resto. Estos compuestos fenólicos son los más efectivos como antioxidantes en cerveza (Waters y col., 1997); (Pascoe y col., 2003). Este tipo de cerveza también presentó los mayores contenidos en ácido sirínico, que también contribuye en gran medida a la actividad antioxidante de la cerveza según lo observado por (Zhao y col., 2010).

TABLA 5.4. Contenido en compuestos fenólicos individuales (expresado en porcentaje %) en 5 cervezas artesanas analizadas *. a,b,c,d, Diferentes letras indican diferencias significativas entre cervezas (p<0.05);

	Doble IPA	Strong ale	Blonde Ale	Ipa	Stout	P
Gallic acid	0.66±0.14	0.42±0.01	0.48±0.06	0.19±0.01	0.39±0.03	0.478
Protocatechuic acid	0.43±0.09	0.73±0.64	0.49±0.09	1.48±0.26	0.70±0.29	0.330
Vanillic acid	3.06±0.19	3.04±0.15	3.87±1.78	4.25±0.24	4.48±0.19	0.131
4-hydroxybenzoic acid	2.29±0.02	3.01±0.11	3.86±0.78	3.25±0.88	3.56±0.11	0.148
Siryngic acid	1.90±0.51b	1.33±0.06b	0.20±0.06c	1.40±0.14b	2.50±0.02a	0.009
Caffeic acid	5.03±0.47b	4.44±0.30b	1.04±0.38c	6.32±0.12ab	7.52±0.53a	0.012
Coumaric acid	2.66±0.47	3.33±0.54	3.58±0.55	3.76±1.71	3.27±0.06	0.542
Transferulic acid	7.67±0.55b	7.32±0.72b	2.37±1.35c	7.53±0.64b	9.47±0.30a	0.032
Sinapic acid	71.49±4.52	73.43±4.55	81.67±5.85	67.57±4.87	60.14±4.52	0.148
4-hydroxyphenylacetic acid	0.67±0.14	0.33±0.56	0.99±0.52	1.23±0.14	1.01±0.25	0.401
Catechin	4.14±0.89b	2.62±0.06c	1.45±0.12d	3.02±0.29c	6.96±0.11a	0.014

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- La cerveza artesanal tipo Stout fue la que mayor contenido en polifenoles totales presentó y una actividad antioxidante *in vitro* más intensa, en comparación con el resto de cervezas analizadas.
- La cerveza tipo Stout presentó los mayores contenidos en catequina, ácido sirínico y ácido transferúlico, en comparación con el resto de cervezas analizadas, lo que puede relacionarse con su mayor potencial antioxidante *in vitro*.
- Finalmente, el presente estudio asienta las bases para futuros trabajos de investigación relacionados con la mejora de la calidad y procesado de las cervezas artesanales.

CAPÍTULO VII
BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Albán, B; Núñez, J; Sánchez, S. (2015). “El sector cervecero artesanal español y sus posibilidades de internacionalización”. *Regional and sectoral economic studies* vol. 15-2.

Almonacid, S.F.; Nájera, A.L.; Young, M.E.; Simpson, R.J.; Acevedo, C.A. (2012). “Comparative study of stout beer batch fermentation using free and microencapsulated yeasts.” *Food Bioprocess Technol.* 5: 750–758.

Bamforth, C. W. (2000). “Beer quality: Oxidation”. *Brewer’s Guardian.* 4: 31–34.

Bamforth, C. W. (2003). “Beer Tap Into the Art and Science of Brewing”, second ed. Oxford University Press, 198 Madison Avenue, New York. ISBN: 13 978-0-19-515479-5.

Bamforth, C. W.; Muller, R. E.; Walker, M. D. (1993). “Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: A review.” *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53: 79–88.

Benzie, I. F. F.; Strain J. J. (1996). “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay”. *Analytical Biochemistry.* 239: 70-76.

Biancolillo, A.; Bucci R.; Magrù, A.L.; Magrì, A.D.; Marini, F. (2014). “Characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication”. *Analytica Chimica Acta.* 820: 23-31.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, G.; Gorinstein, S.; Caspi, A.; Zemser, M.; Trakhtenberg, S. (2000). “Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. *Nutrition Research*, 20: 131–139.

Broncano, J.M.; Timón, M.L.; Parra, V.; Andrés, A.I.; Petró, M.J. (2011) “Use of proteases to improve oxidative stability of fermented sausages by increasing low molecular weight compounds with antioxidant activity” *Food Research International* 44: 2655–2659.

Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. (1997). “Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships”. *Free Radicals Biol. Med.* 22: 749-760.

Cerveceros De España. (2015), “Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España” 2015, disponible en:

http://www.cerveceros.org/pdf/CE_Informe_socioeconomico_2015_v2.pdf

Cerveceros de España, (2001), “Libro blanco de la cerveza”. Cerveceros de España (eds) Pp. 2-54. Madrid, 31 de diciembre de 2001, España.

Cerveza Artesana (2014), “La preservación de la cerveza: los consejos para sobrevivir sin la pasteurización”, 11/08/2014, disponible en:

<http://cervezartesana.es/tienda/blog/la-preservacion-de-la-cerveza-los-consejos-parasobrevivir-sin-la-pasteurizacion.html> [Último acceso: 30 de enero de 2015].

Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B.(2003). “Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies”. J Agric Food Chem. 2003 Apr 23; 51(9):2512-9.

Denke, M. A. (2000). “Nutritional and health benefits of beer”. J. Med. Sci. 320 (5): 320-6

Di Stefano R.; Cavrero MC. (1990). “Frazionamiento dei polifenoli dei vini rossi”. L’enotecnico. 26: 99-106.

Díaz, I.e.; Montero, A.; Gonzalez-Gross, M.; Vallejo, A.I.; Romero, J.; Marcos, A., (2002). “Influence of alcohol consumption on immunological status: a review”. Eur J Clin Nutr. 56: 50-53.

Donadini. G.; Fumi, M.D.; Newby-Clark,I.R. (2014). “Consumer’s preference and sensory profile of bottom fermented red beers of the Italian market”. Food Research International. 50: 69-80.

El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.-K., et al. (2012). “Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(44): 10877–10895.

Falder, A. (2006). “Enciclopedia de los alimentos. Cervezas Distribución y Consumo”, mayo-junio 2006:107-118

García, M; Quintero, R; López-Munguía, A. (2004). “Biotecnología alimentaria”, México D.F. Mexico. Editorial LIMUSA, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. Pp. 269-288.

Ghasemi-Varnamkhasti, M.; Mohtasebic, S.S.; Rodriguez-Mendez, M.L.; Gomesd, A.A.; Araújo, M.C.U.; Galvão, R.K.H. (2012). “Screening analysis of beer ageing using near infrared spectroscopy and the successive projections algorithm for variable selection”. *Talanta* 89: 286–291.

Gingliano, D. (2000). “Dietary antioxidants for cardiovascular prevention”. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 10 (1): 38-44

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.

Girotti, S.; Bolelli, L.; Fini, F.; Budini, R.; Arfelli, G. (2002). “Chemiluminescent determination of antioxidant capacity of beverages”. *Italian Journal of Food Science*, 14:113–122.

González, M.L.; Muñoz, P.; Valls, V. (2001). “Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo”. *Centro de información Cerveza y Salud*. 8: 4-52.

Gordon Strong, (2008). “Pautas de estilos para Cerveza, Hidromiel, & Sidra Edición 2008.” *Beer Judge Certification Program*. (2008). Pp. 4-94.

Gutiérrez, A.; Elizondo, A.; Dias Vieira, A.; Rousseau, I.; Roa, R.; Alvarez, M.; Pozo, L.; Olmedo, M.; Cerdán, M.; Tissone, M. “Cervezas artesanales: características físicoquímicas y microbiológicas - Comparación con cervezas industriales”. 4º Jornadas de Desarrollo e innovación, Noviembre 2002

Halliwell, B. (1996). “Antioxidants in human health and disease”. *Ann. Rev. Nutr.* 16: 33-50

Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M. And Kromhout, D. (1997). “Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk”. *Lancet* 349: 699

Kaneda, H., Kobayashi, N., Furusho, S., Sahara, H. and Koshino, S. (1995). “Reducing activity and flavor stability of beer”. *Master Brew. Assoc. Am., Tech. Q.* 32: 90-94.

Kirsanov, D.; Legin, A.; Papieva, I.; Rudnitskaya, A.; Kartsova, A.; Bocharnikov, A.; Artyushenko, V.; Bogomolov, A.; (2010). “Beer quality assessment by hybrid spectroscopicelectrochemical technique. Modern methods of data analysis”. In: *Proceedings*

of the Seventh Winter Symposium on Chemometrics Russia, Saint Petersburg, February 15–19.

Knudsen, F. (1977). “El Cervecerero en la práctica”. Segunda Edición. Asociación de Maestros cerveceros de las Américas, Madison, Wisconsin. Pp. 211.

Kunze, W. (1996). “Technology brewing and malting”. Berlín, Editorial VLB, Pp. 726

Lachenmeier, D.W., 2007. “Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra”. *Food Chem.* 101: 825–832.

Leinstner, L.; Gorris, L.(1995); “Food preservation by hundle technology”. *Trends in Food Science & Techno.* Vol 6.

Mc Murrough I, Roche G.P. y Cleary K.G. (1984). “Phenolics in beers and worts”. *J. Inst. Brew.* 90:181.

Minolta (1993). *Precise color communication. Manual de colorímetros.* MINOLTA. Mintel GNPD (2008). *Review: prepared meals.* 11 Junio de 2008.

Miranda, C.L.; Stevens, J. F.; Ivanov, V.; McCall, M.; Frei, B.; Veinzer, M. L; Buhler, D. R. (2000). “Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and non-prenylated chalcones and flavanones in vitro”. *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 3876-3884.

Naranjo M., Luz T.; Vélez B.; Rojano A. (2011). “Antioxidant activity of different grades of Colombian coffee”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 16(2): 164-173.

Nardini, M., & Ghiselli, A. (2004). “Determination of free and bound phenolic acids in beer”. *Food Chemistry,* 84(1): 137–143.

Noel, S., Liégeois, C., Lermusieau, G., Bodart, E., Badot, C. and Collin, S.(1999). “Release of deuterated nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized in the boiling kettle”. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4323-4326.

Paronetto, L. (1977). “Polifenoli e Tecnica enologica”. Selepress. Milan

Pascoe, H. M., Ames, J. M., & Chandra, S. (2003). “Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in ale”. *Journal of the American Society of Brewing Chemists,* 61: 203–209.

Piazzon, A., Forte, M., Nardini, M., (2010). “Characterization of phenolic content and antioxidant activity of different beer types.” *J. Agric. Food Chem.* 58: 10677–10683.

ProChile (2015). “Cerveza artesana en España. Tendencias de Mercado”. ProChile, Madrid. http://www.prochile.gob.cl/wp-content/files_mf/1444936784Tendencia_Espana_Cerveza_2015.pdf)

Quifer-Rada, P.; Vallverdú-Queralt, A.; Martínez-Huélamo, M.; Chiva-Blanch, G.; Jáuregui, O.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. (2015) “A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS)” *Food Chemistry* 169: 336–343.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231–1237.

Ribero, P.; Barbosa, R.; Delerue-Matos, C. (2010). “Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research International*”. 43: 1702-1709.

Rimm, E.B.; Klatsky, A.; Grobbee, D.; Stampfer, M.J., (1996). “Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits”. *Brit Med J.* 312: 731-736.

Rodrigo, S.; Young, S.D.; Cook, D.; Wilkinson, S.; Clegg, S.; Bailey, E.H.; Mathers, A.W.; Broadley, M.R.; (2015). “Selenium in commercial beer and losses in the brewing process from wheat to beer. *Food Chemistry*”. 182: 9-13.

Rodrigo S.; Young, S. D.; Talaverano, M. I.; Broadley, M. R. (2016). “The influence of style and origin on mineral composition of beers retailing in the UK Received”. *Eur Food Res Technol.* : 6 June 2016 / Revised: 26 September 2016 / Accepted: 15 October 2016.

Rodríguez H. (2003), “Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager Elaborada por Compañía Cervecería Kunstmann S.A.” Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos.

Sanna V. Pretti L. (2014) “Effect of wine barrel ageing or sapa addition on total polyphenol content and antioxidant activities of some Italian craft beers”. *International Journal of Food Science + Technology*. Received 26 May 2014; Accepted in revised form 13 August 2014.

Singleton, V.L.; Rossi, J.A. (1965). “Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents”. *American Journal of Enology and Viticulture*. Enero 1965: 144-158.

Sonneville, F. (2014), “Africa set to be the fastest growing market for beer”. Rabobank, 24/03/2014, disponible en: <http://rabobank-food-agribusinessresearch.pr.co/73008-rabobank-africa-the-newfrontier-for-beer> [Último acceso: 3 de marzo de 2015].

Suarez, M. (2013), “Cerveza: componentes y propiedades”. Trabajo Fin de Master. Julio 2013

Swistowicz, W. (1977). “El Cerveceros en la práctica.” Segunda Edición. Asociación de Maestros cerveceros de las Américas, Madison, Wisconsin. Pp. 413.

The Brewers of Europe (2016), *Beer Statistics 2016 edition*, Pp.3-32. Bruselas, Belgium.

Tomlinson, J.B.; Ormrod, I.H.L.; Sharpe, F.R. (1995) “A novel method for bitterness determination in beer using a delayed fluorescence technique”. *Institute of Brewing*. 101: 113-118.

Ueda, T.; Ueda, T. and Armstrong, D. (1996). “Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye”. *Ophthalmic Res*. 28: 184-192.

Villarino, A. L.; Martínez, J.R.; Posada, P. (2000) “Biblioteca de publicaciones internacionales sobre el consumo de la cerveza y su posible relación con la salud de la población”. *Centro de información Cerveza y Salud*.5: 4-67.

Vinson, J. A.; Jang, J.; Babbagh, Y. A.; Serry, M. A.; Cai, S. (1995).”Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in Vitro oxidation model for heart disease”. *J. Agric. Food Chem*. 1995, 43: 2798-2799.

Walters, M.T., Heasman, A.P., Hughes, P.S., 1997. “Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability”. *Forced-aging. J. Am. Soc. Brew. Chem*. 55: 83–89.

Zamora-Ros, R., Rothwell, J. A., Scalbert, A., Knaze, V., Romieu, I., Slimani, N., et al. (2013). “Dietary intakes and food sources of phenolic acids in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study”. *The British Journal of Nutrition*, 110(8): 1500–1511.

Zhao, H. (2014), “Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beers”. Chapter 2. june 2014.

Zhao, H., Chen, W., Lu, J. & Zhao, M. (2010). “Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers”. *Food Chemistry*, 119: 1150-1158.