



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

**APLICACIÓN DE LA HOMOGENEIZACIÓN A ULTRA ALTA PRESIÓN**

**PARA LA PASTEURIZACIÓN EN FRIO DE CERVEZA**

Memoria presentada para optar al Grado de

Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**OSCAR CEREZO CHINARRO**

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2021



BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, Catedrático de Universidad del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, y OLGA MARTÍN BELLOSO, profesora titular del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universitat de Lleida.

HACEN CONSTAR: que **OSCAR CEREZO CHINARRO**, ha realizado, bajo su dirección, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado **“Aplicación de la homogeneización a ultra alta presión para la pasteurización en frío de cerveza”**, que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente documento en:

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 1 de Mayo del 2021.

Dr. Buenaventura Guamis López

Dra. Olga Martín Belloso



*A mis padres*



## **AGRADECIMIENTOS**

A Xavier Castañer y Manuel Asensio, por ofrecerme esta oportunidad tan enriquecedora de realizar mi tesis en un entorno industrial, del que tanto he aprendido y que me ha hecho crecer profesionalmente y sumergirme en este apasionante mundo de la cerveza.

A mis directores de tesis, Buenaventura Guamis y Olga Martín, por sus consejos, su ayuda constante y por la confianza que han depositado en mí.

A mis compañeros de del Dpto. de I+D+I, que siempre estuvieron a mi lado. Por su apoyo, por todos los buenos momentos compartidos y por hacer del trabajo un espacio de complicidades, gracias.

A Remedios, por su apoyo tanto técnico como personal y por sus contribuciones de gran calidad.

A Ramon Gervilla e Idoia Codina, por su apoyo técnico, su dedicación y por todas sus aportaciones.

A mis amigas y amigos, por vuestras voces de ánimo, vuestra paciencia y por contagiarme vuestra alegría cuando lo he necesitado.

A mi familia, que aún sin entender muy bien qué hacía tantas horas delante del ordenador, me han animado, cuidado y demostrado su apoyo incondicional.

Porque una tesis es como una cerveza, amarga pero refrescante.



## RESUMEN

El objetivo principal de la presente tesis fue estudiar el efecto de la aplicación de la tecnología de homogenización a ultra alta presión (UHPH, de sus siglas en inglés) para la inactivación microbiana y la mejora de la estabilidad sensorial de cerveza filtrada *lager*, como alternativa a la pasteurización térmica convencional. Para ello, la tesis se dividió en tres estudios principales. El primer estudio se centró en identificar las condiciones de operación más adecuadas para la inactivación de los microorganismos presentes típicamente en cerveza, con la premisa de minimizar el efecto térmico de la tecnología. En el segundo estudio, dichas condiciones se aplicaron a escala piloto y se demostró que los tratamientos UHPH [REDACTED] son eficaces para la inactivación de los microorganismos típicos en cerveza. El tercer estudio se basó en comparar la estabilidad de las propiedades fisicoquímicas, oxidativas y sensoriales de cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] con cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP). Los tratamientos UHPH a presiones bajas [REDACTED] no afectaron a las propiedades fisicoquímicas de las cervezas en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente, a diferencia de los tratamientos UHPH a presiones más elevadas [REDACTED], que afectaron negativamente a su calidad. En cambio, las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] evidenciaron una mejor estabilidad oxidativa y sensorial que las cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP).

## RESUM

L'objectiu principal de la present tesis va ser estudiar l'efecte de l'aplicació de la tecnologia d'homogeneïtzació a ultra alta pressió (UHPH, de les seves sigles en anglès) per a la inactivació microbiana y la millora de la estabilitat sensorial de cervesa filtrada *lager*, com a alternativa a la pasteurització tèrmica convencional. La tesis es va dividir en tres estudis principals. El primer estudi es va centrar en identificar les condicions de operació més adequades per a la inactivació dels microorganismes presents típicament en cervesa, amb la premissa de minimitzar l'efecte tèrmic de la tecnologia. En el segon estudi, tals condicions es van aplicar a escala pilot i es va demostrar que els tractaments UHPH ( ) son eficaces per a la inactivació dels microorganismes típics en cerveses. El tercer estudi es va basar en comparar l'estabilitat de les propietats fisicoquímiques, oxidatives i sensorials de cerveses tractades amb UHPH ( ) amb cerveses pasteuritzades tèrmicament (15 UP). Els tractaments UHPH a pressions baixes ( ) no van afectar a les propietats fisicoquímiques de les cerveses en comparació amb les cerveses pasteuritzades tèrmicament, a diferència dels tractaments UHPH a pressions més elevades ( ), que van afectar negativament a la seva qualitat. En canvi, les cerveses tractades amb UHPH ( ) van evidenciar una millor estabilitat oxidativa i sensorial que les cerveses pasteuritzades tèrmicament (15 UP).

## ABSTRACT

The main aim of this thesis was to study the effect of the application of ultra high pressure homogenization (UHPH) technology for the microbiological inactivation and the enhancement of flavor stability of filtered *lager* beer, as an alternative to conventional thermal pasteurization. The thesis was divided in three main studies. The first study focused on finding the most appropriate operation conditions to inactivate the typically present microorganisms in beer, minimizing the technology heat effect. In the second study, such conditions were applied at pilot scale and the efficacy of UHPH treatments (██████████) to inactivate beer spoiling microorganisms was proven. The third study focused on comparing the physicochemical, oxidative and sensory stability of UHPH-treated beers (██████████) to thermal pasteurized beers (15 PU). UHPH treatments at low pressures (██████████) did not affect the physicochemical properties of beers in comparison to thermal pasteurization, unlike UHPH treatments at higher pressures (██████████), that negatively affected beer quality. In contrast, UHPH-treated beers (██████████) demonstrated a higher oxidative and sensory stability than thermal pasteurized beers (15 PU).

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1.</b>	Antecedentes, objetivos y plan de trabajo .....	21
1.1.	Antecedentes .....	22
1.3.	Objetivos .....	23
1.4.	Plan de trabajo .....	24
<b>Capítulo 2.</b>	Introducción .....	26
2.1.	Proceso de elaboración de cerveza .....	27
2.2.	Estabilidad microbiológica de la cerveza .....	28
2.3.	Parámetros de calidad de la cerveza .....	32
2.3.1.	Espuma .....	32
2.3.2.	Color .....	33
2.3.3.	Turbidez coloidal .....	36
2.3.4.	Compuestos amargos .....	38
2.3.5.	Sabor y compuestos volátiles .....	39
2.4.	Pasteurización térmica .....	44
2.4.1.	Teoría de la pasteurización .....	44
2.4.2.	Pasteurización térmica túnel .....	45
2.4.3.	Pasteurización térmica flash .....	45
2.4.4.	Alternativa convencional: La filtración .....	46
2.5.	Nuevas tecnologías de pasteurización no térmica: Tratamiento a altas presiones (HPP) 47	
2.5.1.	Altas presiones hidrostáticas (HHP) .....	47
2.5.1.1.	Descripción de la tecnología .....	47
2.5.1.2.	Aplicación de la tecnología HHP para el tratamiento de cerveza .....	49
2.5.2.	Homogenización a ultra alta presión .....	55
2.5.2.1.	Descripción de la tecnología .....	55
2.5.2.2.	Aplicación de la tecnología UHPH para el tratamiento de cerveza .....	57
<b>Capítulo 3.</b>	Materiales y métodos .....	59
3.1.	Cervezas filtradas .....	60
3.2.	Tratamientos de cerveza .....	60
3.2.1.	Homogenización a ultra alta presión .....	60
3.2.1.1.	UHPH (Benchtop) .....	60
3.2.1.2.	UHPH (equipo piloto) .....	61
3.2.2.	Pasteurización térmica .....	62
3.3.	Envasado, almacenamiento y envejecimiento acelerado de las cervezas tratadas .....	62

3.4.	Caracterización microbiológica, fisicoquímica, oxidativa y sensorial de las cervezas	63
3.4.1.	Análisis microbiológicos	63
3.4.2.	Determinación de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	64
3.4.3.	Compuestos amargos	64
3.4.4.	Capacidad de retención de la espuma	64
3.4.5.	Turbidez coloidal	64
3.4.6.	Color	64
3.4.7.	Potencial de formación de radicales y potencial antioxidante endógeno	65
3.4.8.	Anhidro sulfuroso	65
3.4.9.	Determinación de la percepción sensorial	65
3.4.10.	Degustaciones sensoriales	66
3.	Pruebas de degustación triangular	66
4.	Pruebas de degustación de perfil descriptivo	67
3.5.	Análisis estadístico	67
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Inactivación microbiana de la homogenización a ultra altas presiones aplicada a cerveza</b>	<b>68</b>
4.1.	Resultados y discusión	69
4.1.1.	Estudio preliminar a escala de laboratorio	69
4.1.1.1.	Incremento de la temperatura de la cerveza en la válvula de homogenización	69
4.1.1.2.	Inactivación microbiana de la cerveza	71
4.1.2.	Aplicación de la tecnología UHPH a escala piloto	75
4.1.2.1.	Incremento de temperatura de la cerveza en la válvula de homogenización	75
4.1.2.2.	Inactivación microbiana	76
4.2.	Conclusiones	78
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Efecto de la homogenización a ultra alta presión sobre la estabilidad fisicoquímica y oxidativa de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica convencional</b>	<b>79</b>
5.1.	Resultados y discusión	80
5.1.1.	Estabilidad de las propiedades fisicoquímicas de las cervezas tratadas	80
5.1.1.1.	Compuestos amargos	80
5.1.1.2.	Capacidad de retención de espuma	83
5.1.1.3.	Turbidez coloidal	86
5.1.1.4.	Color	91
5.1.2.	Estabilidad oxidativa de las cervezas	95
5.1.2.1.	Potencial de formación de radicales (T400)	96
5.1.2.2.	Potencial antioxidante endógeno (EAP)	99

5.1.2.3.	Anhidro sulfuroso.....	102
5.2.	Conclusiones .....	106
<b>Capítulo 6.</b>	<b>Efecto de la homogenización a ultra alta presión sobre los compuestos volátiles de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica convencional .....</b>	<b>107</b>
6.1.	Resultados y discusión .....	108
6.1.1.	Formación de compuestos indicadores de envejecimiento .....	108
6.1.2.	Evolución de compuestos volátiles durante el envejecimiento de las cervezas	115
6.1.2.1.	Ésteres .....	115
6.1.2.2.	Alcoholes superiores .....	119
6.1.2.3.	Acetaldehído.....	121
6.1.3.	Análisis de componentes principales del perfil volátil de las cervezas tratadas	122
6.1.3.1.	Efecto del tiempo de envejecimiento acelerado .....	122
6.1.3.2.	Efecto del tipo de tratamiento .....	124
6.2.	Conclusiones .....	128
<b>Capítulo 7.</b>	<b>Efecto de la homogenización a ultra alta presión sobre el perfil sensorial de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica convencional .....</b>	<b>129</b>
7.1.	Resultados y discusión .....	130
7.1.1.	Percepción sensorial de compuestos volátiles e indicadores de envejecimiento	130
7.1.1.1.	Formación de compuestos indicadores de envejecimiento.....	131
7.1.1.2.	Evolución de los compuestos volátiles durante el envejecimiento acelerado	133
7.1.1.3.	Análisis de componentes principales del perfil sensorial de las cervezas tratadas	141
7.1.2.	Evaluación sensorial de la estabilidad de las cervezas obtenidas.....	145
7.1.2.1.	Distinción sensorial entre cervezas mediante pruebas triangulares.....	145
7.1.2.2.	Identificación de diferencias sensoriales entre cervezas mediante pruebas de perfil descriptivo .....	146
7.2.	Conclusiones .....	153
<b>Capítulo 8.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>154</b>
<b>Capítulo 9.</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>157</b>
Anexo	.....	170

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Color y rango de medición según el estilo de la cerveza (tabla adaptada de Shellhammer, 2009)	34
Tabla 2.2. Compuestos formados durante el envejecimiento de la cerveza (Bamforth & Lentini, 2009; Vanderhaegen <i>et al.</i> , 2006a).	41
Tabla 2.3. Principales reacciones implicadas en el deterioro de cerveza (Bamforth & Lentini, 2009; Vanderhaegen <i>et al.</i> , 2006a).	42
Tabla 2.4. Recomendaciones de la <i>European Brewery Convention</i> (EBC) de rangos de unidades de pasteurización (UP) típicos según tipo de cerveza ( <i>EBC Analytica</i> , 2.1.4. <i>Pasteurisation</i> , 2011).	44
Tabla 2.5. Estudios reportados sobre el efecto de los tratamientos HHP sobre la inactivación microbiana en cerveza (tabla adaptada de Santos <i>et al.</i> , 2017).	50
Tabla 2.6. Estudios reportados sobre el efecto de los tratamientos HHP sobre la calidad de la cerveza (Tabla adaptada de Santos <i>et al.</i> , 2017).	53
Tabla 4.1. Parámetros monitorizados durante los tratamientos UHPH: presión (P), temperatura de entrada ( $T_E$ ), temperatura de salida de la válvula ( $T_V$ ) y temperatura de salida de la cerveza ( $T_S$ ). Unidades de pasteurización térmica (UP) calculadas.	70
Tabla 4.2. Parámetros monitorizados durante los tratamientos UHPH a escala piloto: presión (P), temperatura de entrada ( $T_E$ ), temperatura de salida de la válvula ( $T_V$ ) y temperatura de salida de la cerveza ( $T_S$ ). Unidades de pasteurización térmica (UP) calculadas.	75
Tabla 4.3. Población microbiana (log UFC/100 mL) de cervezas tratadas con UHPH a presiones diferentes (██████████ a) y a una temperatura de entrada de 6 °C.	77
Tabla 5.1. Efecto del tipo de tratamiento (pasteurización térmica a 15UP, homogenización a ultra alta presión a ██████████ MPa) y tiempo de envejecimiento acelerado (3 meses a 35°C) sobre los parámetros físicoquímicos de las cervezas obtenidas, según el ANOVA multifactorial.	80
Tabla 5.2. Estabilidad de los compuestos amargos de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a ██████████ Pa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C).	81

Tabla 5.3. Estabilidad de la capacidad de retención de espuma de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)	85
Tabla 5.4. Estabilidad del color de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a 2 [REDACTED] MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)	92
Tabla 5.5. Efecto del tipo de tratamiento (pasteurización térmica a 15UP, homogenización a ultra alta presión a [REDACTED] MPa) y tiempo de envejecimiento acelerado (3 meses a 35°C) sobre los parámetros de estabilidad oxidativa de las cervezas obtenidas, según el ANOVA multifactorial.	96
Tabla 5.6. Estabilidad del potencial de formación de radicales (T400) de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH [REDACTED] MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)	98
Tabla 5.7. Estabilidad del potencial antioxidante endógeno (EAP) de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a 2 [REDACTED] MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)	101
Tabla 5.8. Estabilidad del contenido de anhídrido sulfuroso (SO <sub>2</sub> ) de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)	103
Tabla 6.1. Compuestos indicadores de envejecimiento analizados es las diferentes cervezas, clasificados según la categoría de indicador, tipo de compuesto y reacción de formación (De Schutter et al., 2008; Feilner & Oehmichen, 2016; Herrmann et al., 2010; Vanderhaegen et al., 2006b).	109
Tabla 6.2. Concentración <sup>1</sup> (ppb) de compuestos indicadores de envejecimiento en cervezas pasteurizadas térmicamente, cervezas tratadas mediante UHPH a [REDACTED] a durante los 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C.	111
Tabla 6.3. Concentración <sup>1</sup> (ppm) de compuestos volátiles (acetaldehído, ésteres y alcoholes superiores) en cervezas pasteurizadas térmicamente, cervezas tratadas mediante UHPH a [REDACTED] MPa durante los 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C.	117



Tabla 6.4. Pesos y porcentajes de varianza para los tres primeros componentes (PC1, PC2 y PC3). En negrita, se destacan los valores >0,20 en valor absoluto.	127
Tabla 7.1. Pesos y porcentajes de varianza para los tres primeros componentes (PC1, PC2 y PC3). En negrita, se destacan los valores superiores a 0,20 en valor absoluto.	144
Tabla 7.2. Resultados de las pruebas triangulares entre cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión (UHPH) a [REDACTED] y cervezas pasteurizadas térmicamente. Las pruebas triangulares se realizan con cerveza recién tratada (t <sub>0</sub> ), cerveza envejecida 1 mes (t <sub>1</sub> ), 2 meses (t <sub>2</sub> ) y 3 meses (t <sub>3</sub> ) a 35°C.	146
Tabla 7.3. Efecto del tipo de tratamiento aplicado (pasteurización térmica, homogenización a ultra alta presión a [REDACTED] MPa) y del tiempo de envejecimiento acelerado (0 – 3 meses) sobre los atributos sensoriales gustativos y aromáticos evaluados en las cervezas obtenidas.	149
Tabla A.1. Recopilación de umbrales sensoriales (US), concentraciones típicas, umbral sensorial seleccionado para la presente tesis y descriptores sensoriales de los compuestos indicadores de envejecimiento y compuestos del perfil volátil en cerveza, según la base de datos de la <i>American Society of Brewing Chemists</i> (ASBC).	171

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1 Diagrama de proceso típico de elaboración de cerveza (figura adaptada de Cerveceros de España, 2019). 28
- Figura 2.2. Perfil sensorial típico de una cerveza *lager* europea, en unidades de sabor (FU, de sus siglas en inglés (adaptada de Hughes, 2009). 40
- Figura 2.3. Presión y temperatura durante un tratamiento HHP típico: precalentamiento ( $t_1$ ), carga del producto ( $t_2$ ), compresión ( $t_3$ ), tratamiento ( $t_4$ ) y descompresión ( $t_3$ ), tiempo de tratamiento a la presión deseada. Se representa la temperatura inicial ( $T_1$ ), de precalentamiento ( $T_2$ ), de tratamiento ( $T_3$ ) y final ( $T_4$ ), así como la presión atmosférica ( $P_1$ ) y la presión de tratamiento ( $P_2$ ) (figura adaptada de Balasubramaniam *et al.*, 2015). 48
- Figura 2.4. Diagrama del sistema UHPH, que incluye 1) tanque de alimentación, 2) filtro, 3) intercambiador de calor, 4) pistones, 5) válvula de homogenización, 6) intercambiador de calor y 7) tanque de almacenamiento (figura adaptada de Ypsicon Advanced Technologies S.L.). 56
- Figura 3.1. Sección del equipo UHPH con el flujo de cerveza (color verde) desde que entra hasta que sale del equipo (Ypsicon Advanced Technologies S.L.). 62
- Figura 4.1. Superficie de respuesta de la regresión lineal del incremento de la temperatura de la cerveza a la salida de la válvula ( $T_v$ ) en función de la temperatura de entrada ( $T_e$ ) y de la presión de homogenización ( $P$ ). 70
- Figura 4.2. Inactivación (media  $\pm$  desviación estándar,  $n = 4$ ) de *Saccharomyces pastorianus*, *Lactobacillus brevis* y *Gluconobacter oxydans* en cerveza tratada con UHPH a diferentes presiones (██████████ MPa) y a diferentes temperaturas de entrada de a) 15 °C, b) 25 °C y c) 50 °C. 72
- Figura 4.3. Correlación entre la temperatura de la válvula ( $T_v$ ) observada en los tratamientos UHPH (██████████ MPa) a escala piloto ( $n = 2$ ) y la estimada con el modelo descrito a escala laboratorio (Ecuación 4.1). Las barras representan la desviación estándar de las  $T_v$  observadas. 76
- Figura 5.1. Estabilidad de la turbidez medida a un ángulo de 25° (columnas) y a 90° (líneas discontinuas) en cervezas pasteurizadas térmicamente (azul), tratadas con UHPH a ██████████ MPa (amarillo) durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C). 88

- Figura 6.1. Concentración de compuestos indicadores de envejecimiento en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa (300) a lo largo del envejecimiento acelerado. 110
- Figura 6.2. Concentración de ésteres totales en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa a lo largo del envejecimiento acelerado. 116
- Figura 6.3. Concentración de alcoholes superiores totales en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa a lo largo del envejecimiento acelerado. 120
- Figura 6.4. Concentración de acetaldehído en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH a 2 [REDACTED] MPa a lo largo del envejecimiento acelerado. 122
- Figura 6.5. Representación de las cervezas obtenidas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tiempo de envejecimiento acelerado a 35°C: 0 meses ( $\square$ ), 1 mes ( $\times$ ), 2 meses ( $\circ$ ) o 3 meses (+). 123
- Figura 6.6. Gráfico de componentes 3D estandarizado. Se representa la localización de todas las variables (cada compuesto a  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ) en el espacio de los 3 primeros componentes principales. Las variables se dividen en compuestos indicadores de envejecimiento (verde), ésteres (rojo) y alcoholes superiores (amarillo) y acetaldehído (verde). 124
- Figura 6.7. Representación de las cervezas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tipo de tratamiento: pasteurización térmica ( $\square$ ), tratamiento UHPH [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] MPa (+). 125
- Figura 7.1. Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas recién [REDACTED] ( $t_0$ ) y envejecidas durante 1 mes ( $t_1$ ), 2 meses ( $t_2$ ) y 3 meses ( $t_3$ ) a 35 °C. 137
- Figura 7.2. Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas recién [REDACTED] MPa ( $t_0$ ) y envejecidas durante 1 mes ( $t_1$ ), 2 meses ( $t_2$ ) y 3 meses ( $t_3$ ) a 35 °C. 138
- Figura 7.3. Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes

en cervezas [REDACTED] ( $t_0$ ) y envejecidas durante 1 mes ( $t_1$ ), 2 meses ( $t_2$ ) y 3 meses ( $t_3$ ) a 35 °C. 139

Figura 7.4. Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas [REDACTED] ( $t_0$ ) y envejecidas durante 1 mes ( $t_1$ ), 2 meses ( $t_2$ ) y 3 meses ( $t_3$ ) a 35 °C. 140

Figura 7.5. Representación de las cervezas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tiempo de envejecimiento acelerado a 35°C: 0 meses ( $\square$ ), 1 mes ( $\times$ ), 2 meses ( $\circ$ ) o 3 meses ( $+$ ) (ACP no estandarizado). 142

Figura 7.6. ACP no estandarizado ( $t_0, t_1, t_2$ ). Localización de cada variable (percepción sensorial,  $t_0, t_1, t_2$ ) en el espacio de 3 primeros componentes principales, así como las cervezas (puntos azules). Las variables se dividen en compuestos indicadores de envejecimiento (verde), ésteres (rojo) y alcoholes (amarillo), acetaldehído (verde). 142

Figura 7.7. Representación de las cervezas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tipo de tratamiento: pasteurización térmica ( $\square$ ), tratamiento UHPH [REDACTED] MPa ( $+$ ) (ACP no estandarizado). 143

Figura 7.8. Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión [REDACTED] MPa (UHPH) recién obtenidas ( $t_0$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD). 150

Figura 7.9. Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión [REDACTED] a (UHPH) después de 1 mes de envejecimiento acelerado a 35 °C ( $t_1$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD). 150

Figura 7.10. Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión a [REDACTED] (UHPH) después de 2 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C ( $t_2$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo)

indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD). 151

Figura 7.11. Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión a [REDACTED] (UHPH) después de 3 mes de envejecimiento acelerado a 35 °C (t<sub>3</sub>). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD). 151

Figura 7.12. Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión a [REDACTED] Pa (UHPH) recién obtenidas (t<sub>0</sub>) y durante 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD). 152

Figura 7.13. Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP recién obtenidas (t<sub>0</sub>) y durante 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD). 152

## **Capítulo 1.** Antecedentes, objetivos y plan de trabajo



## 1.1. Antecedentes

La cerveza es un producto de gran consumo en el mercado español, que ha vivido un período de crecimiento sostenible desde el final de la crisis económica del 2008 hasta el 2019, previamente a la pandemia de Covid-19 actual. Durante estos años, la producción, el consumo, las ventas y la exportación han ido aumentando de manera paulatina, llegando a alcanzar un 1,5 % del producto interior bruto español. En concreto, en 2019 se consumió en España un 3,5 % más de cerveza que el año anterior, superando por primera vez los 41 millones de hectolitros, equivalentes a una media de 52 litros por cápita. Asimismo, en 2019 se exportaron casi 3,1 millones de hectolitros de cerveza, lo que supone un incremento del 3 % con respecto a 2018 (Cerveceros de España, 2019).

La globalización del mercado y el incremento de las exportaciones de cerveza en los últimos años han fomentado la demanda de productos con una vida útil mayor. La vida útil de la cerveza se define principalmente por su estabilidad microbiológica, fisicoquímica (turbidez coloidal, espuma, color y compuestos amargos) y organoléptica. Tradicionalmente, los principales fenómenos causantes de incidencias en la industria cervecera eran el crecimiento de microorganismos no deseados y la aparición de turbidez coloidal (es decir, turbidez no causada por la proliferación microbiana), limitando y, consecuentemente, definiendo la vida útil del producto. Durante las últimas décadas, los avances en investigación sobre la bioquímica del proceso cervecero y la modernización de las tecnologías de fabricación de cerveza han permitido entender y controlar estos fenómenos. Actualmente, el interés de la industria cervecera se centra en dilucidar los factores que afectan a los cambios del perfil sensorial de las cervezas, parámetro de calidad crítico para establecer su vida útil comercial.

A pesar de años de investigación del sector cervecero, la inestabilidad del sabor durante el envejecimiento de la cerveza sigue siendo un fenómeno muy complejo de entender y controlar. El sabor de la cerveza es impartido por cientos de compuestos químicos, que a su vez reaccionan e interactúan entre sí para dar lugar a una gran variedad de gustos y aromas. En la cerveza, estos compuestos químicos se encuentran en un estado de desequilibrio termodinámico, tendiendo a desencadenar múltiples reacciones químicas que resultan en la pérdida de sabores típicos de cervezas frescas y en la aparición de notas defectuosas durante el envejecimiento de la cerveza (Bamforth & Lentini, 2009; Vanderhaegen *et al.*, 2006a). A diferencia del vino, el envejecimiento de la cerveza es comúnmente considerado negativo para su calidad organoléptica.

La estabilidad sensorial de la cerveza se ve seriamente afectada por la absorción de oxígeno y el aumento de la temperatura durante el proceso de elaboración, pasteurización, envasado y almacenamiento de la cerveza (Bamforth & Lentini, 2009). En concreto, la pasteurización térmica

convencional, que consiste en la aplicación de calor al producto acabado, es una práctica extensamente empleada en la industria cervecera para la estabilización microbiana de la cerveza, pero cuya aplicación puede comprometer su estabilidad sensorial. Estudios previos han demostrado que el aumento de la carga térmica aplicada durante la pasteurización acelera la formación de compuestos aldehídos indicadores de envejecimiento, la pérdida de ésteres volátiles típicamente asociados a cervezas frescas y la degradación de compuestos amargos durante el envejecimiento de la cerveza (Cao *et al.*, 2011).

El desarrollo de nuevas tecnologías de conservación no térmicas, que permiten reducir el efecto negativo de la temperatura sobre la estabilidad sensorial de la cerveza, se presenta como alternativa muy prometedora al proceso de pasteurización térmica convencional para mejorar la vida útil del producto acabado. Durante la última década, se ha demostrado la eficacia de la homogenización a ultra alta presión (UHPH, de sus siglas en inglés) para la inactivación de microorganismos y su potencial para mantener las características nutricionales y organolépticas originales de los productos tratados (Zamora & Guamis, 2014). Además, su compatibilidad con el procesado de alimentos líquidos en continuo y la reciente salida al mercado de equipos de 10.000 L/h (Morata & Guamis, 2020) suponen un aliciente para su implementación a gran escala en la industria cervecera.

### 1.3. Objetivos

El **objetivo general** de la presente tesis fue estudiar el efecto de la aplicación de la tecnología de homogenización a ultra alta presión (UHPH) para la inactivación microbiana y la mejora de la estabilidad sensorial de cerveza filtrada *lager*, como alternativa a la pasteurización térmica convencional.

Para alcanzar el objetivo general, se propusieron los **objetivos específicos** siguientes:

- Evaluar diferentes condiciones de operación, presión de homogenización y temperatura de entrada de la cerveza en el tratamiento UHPH, con la finalidad de encontrar las condiciones de operación más adecuadas para la inactivación microbiana de la cerveza, minimizando al mismo tiempo el efecto térmico.
- Evaluar el efecto de la tecnología UHPH sobre la estabilidad de las propiedades fisicoquímicas de la cerveza, en base a los parámetros de calidad más relevantes del producto, durante su envejecimiento para asegurar que las cervezas obtenidas presentan, como mínimo, los mismos niveles de calidad fisicoquímica que las cervezas pasteurizadas térmicamente.



- Evaluar el efecto de la tecnología UHPH sobre la estabilidad de las propiedades oxidativas y sensoriales de la cerveza, en base a los parámetros de calidad más relevantes del producto, durante su envejecimiento para mejorar la calidad sensorial de las cervezas obtenidas en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente.

#### **1.4. Plan de trabajo**

Para la realización de la presente tesis se llevó a cabo tres estudios principales:

##### ***Estudio 1***

El *Estudio 1* consistió en realizar tratamientos UHPH de cerveza a diferentes condiciones de operación, variando la presión de homogenización (██████████) y la temperatura de entrada de la cerveza (██████████), a escala de laboratorio. Se evaluó la eficacia de los diferentes tratamientos sobre la inactivación de los microorganismos presentes típicamente en cerveza y se seleccionaron las condiciones de operación más adecuadas. Se partió de cerveza pasteurizada inoculada con *Saccharomyces pastorianus*, *Lactobacillus brevis* y *Gluconobacter oxydans*, microorganismos aislados de una cervecería industrial. Los tratamientos se realizaron en la planta piloto del *Centro de Innovación, Investigación y Transferencia en Tecnología de los Alimentos* (CIRTTA) de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona).

##### ***Estudio 2***

A partir de los resultados obtenidos en el *Estudio 1*, se seleccionó el rango de condiciones de operación más adecuado para inactivar los microorganismos típicos de la cerveza, con la premisa de minimizar el efecto térmico. Se realizaron tratamientos UHPH a las condiciones de operación seleccionadas (██████████) para validarlas a escala piloto, evaluando su eficacia para la inactivación de microorganismos típicos de cerveza. Se partió de cerveza sin pasteurizar inoculada con *Saccharomyces pastorianus*, *Lactobacillus brevis* y *Gluconobacter oxydans*, microorganismos aislados de una cervecería industrial. Los tratamientos UHPH se realizaron en la planta piloto de AZTI (Bizcaia).

##### ***Estudio 3***

A partir de las condiciones de operación seleccionadas y validadas en el *Estudio 2*, el *Estudio 3* consistió en comparar cervezas tratadas con UHPH a ██████████ con

cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP), procedentes del mismo lote de fabricación, en base a los parámetros de calidad fisicoquímicos (capacidad de retención de espuma, turbidez coloidal, color y compuestos amargos), oxidativos (potencial oxidativo, potencial antioxidante endógeno y anhídrido sulfuroso) y sensoriales (análisis del contenido y percepción sensorial de compuestos indicadores de envejecimiento y compuestos de perfil volátil y degustaciones sensoriales) más relevantes en la industria cervecera. Todas las cervezas fueron evaluadas recién tratadas y durante 3 meses de envejecimiento acelerado (a 35 °C). Los tratamientos UHPH se realizaron en la planta piloto de AZTI (Bizcaia).

## Capítulo 2. Introducción



## 2.1. Proceso de elaboración de cerveza

El proceso de elaboración de cerveza se divide a grandes rangos en tres procesos principales: i) el malteado, proceso de elaboración de la malta, ii) el cocimiento, proceso de elaboración del mosto y iii) la fermentación, proceso de elaboración de la cerveza (Figura 2.1). Estos procesos de elaboración se resumen muy brevemente a continuación (Briggs et al., 2004).

### *Malteado – Elaboración de la malta*

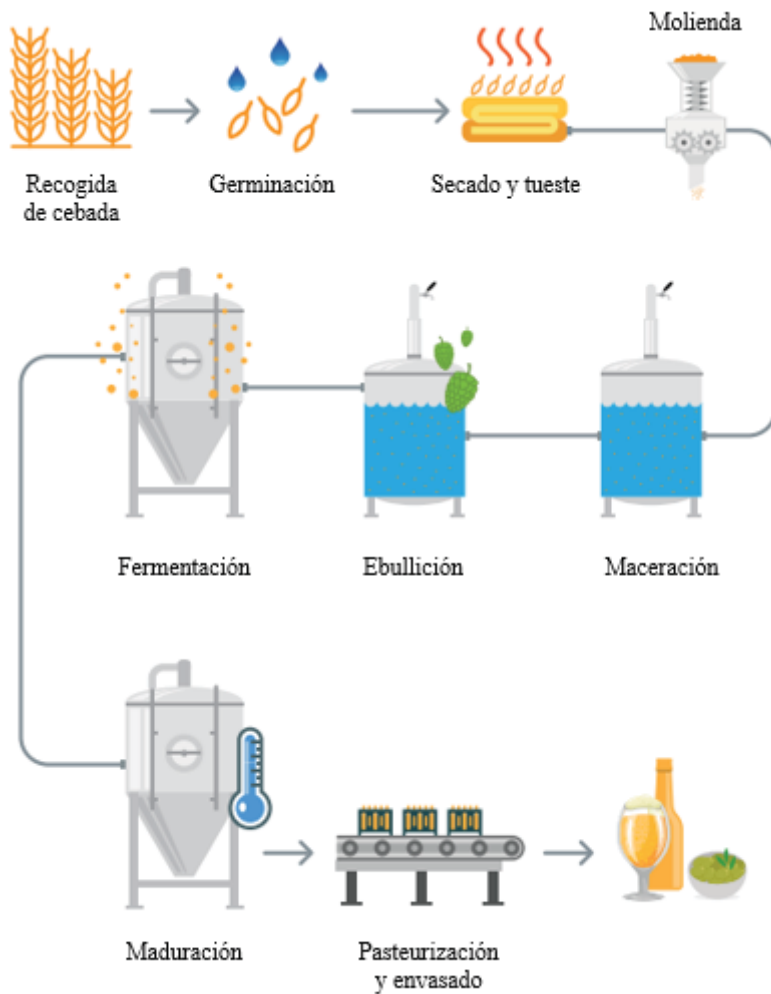
Los granos de cebada son germinados para generar enzimas que, posteriormente permitan la transformación de su almidón en hidratos de carbono durante el proceso de cocimiento. Los granos germinados se secan y se tuestan para conseguir los diferentes tipos de malta en función de su grado de tueste y, por lo tanto, determina el color de la cerveza.

### *Cocimiento – Elaboración del mosto*

El proceso de elaboración del mosto consiste en varias etapas. Primeramente, la malta es molida para romper el grano y mejorar la posterior extracción del almidón (molienda). Los granos molidos son mezclados con agua a temperatura controlada. Esta mezcla se somete a una curva de temperatura que permite a las enzimas extraídas degradar el almidón de la malta en azúcares simples (macерación). La mezcla obtenida es a continuación filtrada para separar el líquido, mosto, de la parte sólida formada principalmente por las cáscaras de los granos, bagazo (filtración). Seguidamente, el mosto se lleva a ebullición, etapa en la que se añade el lúpulo y cuya finalidad es isomerizar los compuestos amargos, coagular proteínas, eliminar compuestos volátiles no deseados (DMS) y esterilizar el mosto (ebullición). Finalmente, el mosto es clarificado para eliminar la proteína coagulada (clarificación) y enfriado.

### *Fermentación – Elaboración de la cerveza*

El mosto es inoculado con levadura, la cual transforma los azúcares en alcohol y dióxido de carbono, generando además los aromas característicos de la cerveza (fermentación alcohólica). A continuación, la cerveza es madurada en frío, para que sus compuestos aromáticos se estabilicen y decante la levadura (maduración o guarda). Seguidamente la cerveza es centrifugada y filtrada para la eliminación de levadura y turbidez. Finalmente, la cerveza se pasteuriza previamente o posteriormente al envasado, dependiendo del formato de envase como se discutirá más adelante.



**Figura 2.1** Diagrama de proceso típico de elaboración de cerveza (figura adaptada de Cerveceros de España, 2019).

## 2.2. Estabilidad microbiológica de la cerveza

La actividad microbiológica de la cerveza ha sido ampliamente revisada por Suzuki (2015), Vriesekoop *et al.*, (2012), cuyas evidencias más relevantes y destacables para la presente tesis son resumidas a continuación.

Durante el proceso de fabricación de cerveza, muchas de las etapas permiten limitar la proliferación de microorganismos y reducir los riesgos de contaminación microbiana, como el proceso de macerado, la ebullición del mosto, la guarda en frío y la filtración de la cerveza. En concreto, la ebullición del mosto es la más letal, inactivando los microorganismos a una temperatura de 100 °C durante 60 – 120 min. No obstante, la cerveza resultante puede seguir presentando microorganismos, requiriendo una etapa final de pasteurización del producto acabado.

Por otro lado, la composición de la cerveza final presenta actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. La presencia de alcohol (0,5 – 10 % v/v, típicamente 3,5 – 5,0 % v/v), compuestos amargos (aprox. 17 – 55 ppm iso- $\alpha$ -ácidos), pH ácido (aprox. 3,9 – 4,4), contenido de dióxido de carbono elevado (aprox. 0,5 % w/w) y de oxígeno bajo (< 0,1 ppm) resulta en un medio desfavorable para el crecimiento y supervivencia de patógenos, como la *Salmonella* o el *Staphylococcus aureus*, y otros microorganismos encontrados típicamente en alimentos. Además, la mayoría de los compuestos nutritivos presentes en cerveza acabada ya han sido metabolizados por la levadura durante la fermentación, limitando también el crecimiento microbiano de otros muchos microorganismos.

A pesar las propiedades antimicrobianas mencionadas, algunos microorganismos pueden crecer en cerveza, comúnmente conocidos como microorganismos de deterioro: aunque no son peligrosos para la salud humana, afectan considerablemente la calidad del producto final. Entre estos se encuentran las bacterias lácticas y acéticas, las más perjudiciales, debido a la elevada frecuencia de incidencias reportadas en el sector cervecero y al impacto negativos que causa su presencia sobre el perfil sensorial de la cerveza. A continuación, se describen las especies de microorganismos de mayor preocupación en la industria cervecera, que pueden crecer potencialmente en cerveza.

### ***Bacterias lácticas***

Las bacterias lácticas son microorganismos Gram positivos, con forma de cocos o bacilos, no formadores de esporas, estrictamente fermentativas y facultativas anaerobias que pertenecen al orden *Lactobacillales*. Estas bacterias se caracterizan por producir ácido láctico, pudiendo crecer sin problemas a pH ácidos como el de la cerveza. A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram positivas, que son inhibidas por la actividad antimicrobiana del lúpulo, existen cepas de bacterias lácticas que se han adaptado evolutivamente, adquiriendo los genes *horA* y *horC* y desarrollando resistencia a estos compuestos antimicrobianos, siendo capaces de crecer en cerveza. Los géneros más comunes son *Lactobacillus* y *Pediococcus*, responsables del 60 – 90 % de las incidencias

causadas por contaminaciones en ambientes cerveceros, generando sabores no deseados e incrementando la turbidez del producto final. Entre estas, destacan *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* y *Pediococcus damnosus*.

La bacteria *L. brevis* ha sido reportada como la más frecuente de todas en cerveza, por lo cual ha sido la más extensamente estudiada. En cambio *L. lindneri* presenta un crecimiento pobre en muchos de los medios de detección descritos, y a menudo puede causar incidencias de deterioro sin ser detectada en las pruebas de control microbiológico establecidos en los protocolos de aseguramiento de calidad de la industria cervecera. El crecimiento de *L. brevis* y *L. lindneri* genera una turbidez de carácter velado en cerveza, sedimentación de partículas y ligera acidificación sin formar otros sabores no deseados. Su capacidad contaminante y efecto de deterioro de la cerveza varía considerablemente dependiendo de la cepa y de su origen de aislamiento. Se ha demostrado que algunas cepas de *L. brevis* deterioran significativamente todos los tipos de cerveza, mientras que cepas aisladas de otros ambientes no cerveceros exhiben generalmente poca o ninguna habilidad de deterioro. Asimismo, las cepas de *L. brevis* y *L. lindneri* aisladas de ambientes cerveceros y adaptadas a la cerveza formaban bacilos de menor tamaño y más cortos que las cepas no adaptadas, probablemente como estrategia de supervivencia en ambientes adversos. Este cambio morfológico les permite reducir el área superficial que se encuentra en contacto con la cerveza, minimizando así la exposición a sus compuestos antimicrobianos y adquiriendo mecanismos de resistencia de membrana de forma más eficiente. Además, se ha observado que, debido a estas características morfológicas, *L. brevis* y *L. lindneri* adaptadas en cerveza son más fácilmente penetrables en procesos de filtración, utilizados para la eliminación de microorganismos en la industria cervecera.

El deterioro causado por *P. damnosus* se caracteriza por la acidificación de la cerveza y por la producción de sabores no deseados, destacando la formación de diacetilo (sabor a mantequilla). *P. damnosus* crece lentamente en medios de detección de laboratorio y ha sido casi exclusivamente aislada de ambientes cerveceros. Por otro lado, *L. paracollinoides*, *L. backi* y *P. clausenii* han sido recientemente propuestas como especies nuevas y aún son poco conocidas, probablemente porque también presentan crecimientos pobres en los medios de cultivo descrito y porque son comúnmente identificadas de forma errónea como otras especies.

Las especies de *Lactobacillus* *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. plantarum* y los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* no aparecen tan frecuentemente ya que exhiben poca resistencia frente a la actividad antimicrobiana del lúpulo y suelen darse mayormente en cervezas poco lupuladas.

### ***Bacterias acéticas***

Las bacterias acéticas o acetobacterias son Gram negativas, con forma de bacilo y generalmente aerobias estrictas. En cerveza, se han identificado varias especies de *Acetobacter* (las más habituales son *A. aceti*, *A. liquefaciens*, *A. pastorianus*, *A. hansenii*) y solamente una de *Gluconobacter* (*Gluconobacter oxydans*). Las bacterias acéticas tienen la habilidad de oxidar el alcohol para producir ácido acético, generando sabores avinagrados en cerveza. Estas bacterias pueden tolerar diferentes concentraciones de alcohol dependiendo de la cepa, pudiendo crecer a concentraciones de hasta el 10 % v/v e incluso sobrevivir a 13 % v/v de alcohol, como es el caso de *Gluconobacter oxydans*. Estos microorganismos se encuentran comúnmente en líneas de envasado y equipos de dispensación, donde es más probable que exista presencia de oxígeno. En las últimas décadas, se ha reducido el número de incidencias gracias a los avances tecnológicos que han permitido minimizar la presencia de oxígeno en cerveza, pero siguen reportándose casos; pues algunas cepas han demostrado ser micro-aerotolerantes.

### ***Enterobacteriaceae***

Las bacterias Enterobacteriaceae son Gram negativa, en forma de bacilo, anaeróbicas facultativas, y típicamente incluyen las especies *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*. No obstante, solamente un número pequeño de Enterobacteriaceae están ocasionalmente asociadas con la industria cervecera, como *Obesumbacterium proteus* (también nombrada *Termobacterium lutescens* o *Shimwellia pseudoproteus*), *Rahnella aquatilis* y *Citrobacter freundii*. La presencia de *O. proteus*, *R. aquatilis* y *C. freundii* en cerveza genera sabores no deseados debido a la formación de acetoína, ácido láctico, propanol, sulfuro de dimetilo (DMS), isobutanol y 2,3-butandiol.

### ***Pectinatus, Megasphaera y Zymomonas,***

Los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera* y *Zymomonas*, bacterias Gram negativas, son menos habituales y presentan comúnmente menos incidencias, pero también pueden afectar considerablemente al producto final. *Pectinatus* y *Megasphaera* son bacterias anaerobias estrictas que provocan la formación de sedimentos, turbidez y sabores desagradables, impactando seriamente al perfil sensorial de la cerveza. En cuanto a *Pectinatus*, (*P. cerevisiiphilus*, *P. frisingensis* y *P. haikarae*), son conocidas por producir ácido sulfhídrico (aroma a huevo podrido) mientras que *Megasphaera* (*M. cerevisiae*, *M. paucivorans* y *M. sueciensis*) producen ácido sulfhídrico, ácido butírico y ácido caproico, aunque ~~en~~ generan un incremento de turbidez menor



y sedimentos casi imperceptibles. *Megasphaera* no tolera concentraciones elevadas de alcohol, por lo cual es más frecuente en cervezas bajas en alcohol.

El avance de las tecnologías cerveceras, que han permitido reducir drásticamente los niveles de oxígeno en cerveza, ha favorecido el aumento de microorganismos anaerobios facultativos mencionados anteriormente. Por el contrario, *Zymomonas* (*Z. mobilis*) son bacterias anaerobias facultativas y aerotolerantes, no pueden utilizar maltosa (el azúcar mayoritario del mosto de cerveza), por lo cual se encuentra principalmente en cervezas que incluyen azúcares añadidos como, por ejemplo, sacarosa. La presencia de *Zymomonas* en cerveza provoca la formación de acetaldehído y ácido sulfhídrico, aportando aromas afrutados desagradables.

### ***Levaduras salvajes***

Se conoce como levaduras salvajes aquellas que no son utilizadas intencionalmente para la fermentación, sino que pueden crecer esporádicamente en cerveza y, por lo cual, también son comúnmente reportadas como microorganismos contaminantes, como algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y las especies de *Debaromyces*, *Dekkera*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Williopsis*.

### ***Ascosporas***

Muchas levaduras y mohos pueden formar esporas sexuales, nombradas ascosporas, como mecanismo de supervivencia. Las ascosporas presentan una elevada resistencia a la temperatura, sobreviviendo bien exposiciones a temperatura por encima 80 °C. Milani *et al.* (2015) demostraron que la pasteurización térmica (15 UP) puede reducir solamente 1,34 logaritmos la concentración de ascosporas de *S. cerevisiae* en cerveza. Afortunadamente, actualmente no son una preocupación para la industria cervecera, pues en cerveza no se crean las condiciones ambientales para la germinación de las esporas.

## **2.3. Parámetros de calidad de la cerveza**

### **2.3.1. Espuma**

La apariencia de las cervezas y, en concreto, la estabilidad de su espuma es muy importante para la aceptación del producto por parte de los consumidores. En general, la mayoría de los consumidores prefieren cervezas con espumas estables y duraderas, en comparación con cervezas con espumas que tienden a colapsar y disminuir rápidamente.

La estabilidad de la espuma depende de factores físicos y químicos. A nivel físico, las espumas uniformemente formadas por burbujas de un tamaño pequeño tienden a ser más estables que las que contienen burbujas de mayor tamaño, ya que permiten aumentar el área superficial del líquido, contrarrestando la tensión superficial existente. Los fenómenos físicos responsables del colapso de las burbujas y consecuente caída de la espuma más importantes son la coalescencia y la disproporción. La coalescencia consiste en la fusión entre dos burbujas, causada por la ruptura de la capa que las separaba y dando lugar a una burbuja de mayor tamaño, pero menos estable. La disproporción consiste en el paso de gas de una burbuja pequeña a otra de mayor tamaño, dando lugar al colapso de la burbuja pequeña e incrementado el tamaño de la otra burbuja.

A nivel químico, la estabilidad de la espuma depende del contenido de moléculas tensioactivas, presentes en la capa superficial de las burbujas y responsables de conformar una matriz que mantiene las burbujas unidas y resistentes al colapso. Las principales moléculas tensioactivas en cerveza son proteínas y polipéptidos, procedentes de la malta, y ácidos amargos, procedentes del lúpulo. Estos compuestos contribuyen a la estabilidad de la espuma debido a su carácter hidrofóbico. En el caso de los ácidos amargos, los iso-ácidos tetra y hexa presentan una mayor hidrofobicidad y favorecen la formación de espumas muy estables, aunque ásperas en boca. Entre los polipéptidos hidrofóbicos, los más conocidos son la proteína Z y la proteína transportadora de lípidos 1 (LTP1, de sus siglas en inglés). Esta proteína proviene del grano de cebada, pero su carácter hidrofóbico lo adquiere durante la ebullición del mosto, donde es desnaturalizada, quedando así grupos hidrofóbicos interiores expuestos.

Las cervezas de trigo presentan mayores propiedades fisicoquímicas espumantes que las cervezas de cebada, debido mayormente a su composición polipeptídica. Otros factores que contribuyen positivamente a la formación de espumas estables son una elevada temperatura y pH bajo durante la maceración, la presencia de productos resultantes de reacciones de Maillard, la presencia de iones metálicos divalentes como, por ejemplo, el zinc y la adición de estabilizante de espuma, como el alginato de propilenglicol. Por el contrario, la presencia de enzimas proteolíticas, que son excretadas por la levadura mayormente bajo condiciones de estrés, afecta negativamente a la estabilidad de la espuma. Por otro lado, envases o vasos limpiados inadecuadamente, con restos de lípidos y detergentes, inhiben también la formación de espumas estables.

### **2.3.2. Color**

El color es la percepción visual humana al interpretar las distintas longitudes de onda que podemos captar de la parte visible del espectro electromagnético (380 – 780 nm). La percepción

del color es un fenómeno que requiere tres elementos: una fuente de luz, un objeto (por ejemplo, la cerveza) y un detector (por ejemplo, el ojo humano o el detector de un espectrofotómetro). Para muestras líquidas que no son opacas, como es generalmente el caso de la cerveza, el principal interés yace en medir cómo la luz es transmitida a través y absorbida por el producto. La luz absorbida es típicamente complementaria a la percibida. La cerveza, que es generalmente percibida de color amarillo, absorbe luz de color violeta. La *European Brewery Convention* (EBC, de sus siglas en inglés) estableció que el color de la cerveza se mide a una absorbancia de 430 nm, ya que esta longitud de onda (violeta) es complementaria a la transmisión de color de las cervezas pálidas (amarillo), las más predominantes en Europa. Sin embargo, es importante asegurar que la cerveza no presenta turbidez, ya que dispersa la luz incidente. Además, esta longitud de onda no es tan adecuada para la medición del color de cervezas oscuras y rojizas. Como se muestra en la Tabla 2.1, el color y los valores típicamente obtenidos varían según el estilo de cerveza.

**Tabla 2.1.** Color y rango de medición según el estilo de la cerveza (tabla adaptada de Shellhammer, 2009)

<b>Estilo de cerveza</b>	<b>Color</b>	<b>Unidades de color (EBC)</b>
<i>Lager</i> pálida europea/americana	Amarillo / pajizo	4 – 8
<i>Pilsner</i> 100 % malta europea/americana	Dorado	6 – 18
<i>Pale Ale</i> inglesa	Dorado / ámbar	20 – 30
<i>Helles</i> (Múnich)	Ámbar	6 – 30
Cervezas rojas	Marrón / ámbar / rojizo	18 – 108
<i>Porter</i> americana	Marrón oscuro	40 – 60
<i>Stout</i> irlandesa	Negro	70 - 140

El color de la cerveza proviene mayormente de los granos utilizados y de las condiciones de procesamiento a las que son sometidos. Inicialmente, la cebada contiene concentraciones de pigmentos muy bajas, pero durante el proceso de malteado se induce la formación de color. En concreto, la formación de color ocurre durante las etapas de germinación y tostado del malteado, mediante reacciones de Maillard y, en algunos casos, de caramelización y pirolisis, las cuales son catalizadas por la aplicación de calor.

Por otro lado, durante el envejecimiento de la cerveza, la oxidación de los polifenoles procedentes de la cáscara de la cebada y del lúpulo también puede contribuir a la formación del color de la cerveza. Además, la oxidación de polifenoles puede favorecer las interacciones entre proteínas y polifenoles, fomentando la formación de turbidez coloidal. La presencia de turbidez en cerveza

dispersa la luz y afecta indirectamente a la percepción del color por parte del consumidor, así como a su medición física (Shellhammer, 2009).

### ***Reacciones de Maillard***

Las reacciones de Maillard juegan un papel clave en la formación de color de la cerveza. Estas reacciones se originan mayormente en el endospermo de la cebada durante el malteado, pero pueden seguir produciéndose durante la ebullición del mosto. Los precursores principales de las reacciones de Maillard son azúcares reductores (principalmente maltosa) y grupos amino de aminoácidos, ya sean proteicos o libres, que dan lugar a la formación de una imina (base Schiff) y su forma isomerizada amino cetona (compuesto de Amadori), que es más estable. Estas moléculas pueden desencadenar diferentes reacciones, dependiendo principalmente del pH, resultando finalmente en la formación de melanoidinas, moléculas de color. En concreto, estas reacciones generan los compuestos intermediarios 5-hidroxiacetilfurfural (a pH < 5) o 3-furanona (a pH 5 – 7), compuestos incoloros de bajo peso molecular pero que están relacionados con aromas tostados y a caramelo. A partir de estos compuestos intermediarios se generan cromóforos dicíclicos (amarillos) y tricíclicos (naranja) que dan lugar a la formación de melanoidinas.

A parte del pH, las reacciones de Maillard pueden ser catalizadas por el aumento de la temperatura. En un rango de 60 – 100 °C, un incremento de 1 °C de temperatura puede incrementar la velocidad de la reacción más de un 10 %. Asimismo, la exposición a elevadas temperaturas promueve la formación de productos de la reacción de Maillard debido a sus elevadas energías de activación que resultan en una mayor formación de color. Algunos colores provienen de intermediarios de bajo peso molecular, la mayoría del color proviene de las melanoidinas, estructuras poliméricas de elevado peso molecular. Los colores producidos por las melanoidinas son inicialmente amarillo, naranja y rojo, que se convierten en marrón con el progreso de las reacciones de Maillard. /en procesos de reacciones de Maillard avanzados. Maltas ligeramente tostadas dan lugar a colores amarillos característicos de cervezas *lager* filtradas mientras que maltas intensamente tostadas dan lugar a tonalidades ámbar y marrón, típicas de cervezas *ale* inglesas (Shellhammer, 2009).

### ***Reacciones de caramelización y pirolisis***

Las reacciones de caramelización y pirolisis ocurren a partir de elevadas concentraciones de azúcar sometidas a altas temperaturas. A temperaturas mayores de 120 °C, la reacción de caramelización se basa en la descomposición térmica de azúcares en ausencia de nitrógeno amino. Se produce 5-hidroxiacetilfurfural, compuesto incoloro, pero con aroma a caramelo, así como

otros productos de color rojizos y marrones. La reacción es pH dependiente, viéndose ralentizada a pH ácidos y acelerada a pH básicos. Por otro lado, a temperaturas mayores de 200 °C, las reacciones de pirolisis predominan. Estas reacciones provocan la aparición de sabores intensos, a quemado, y la formación de pigmentos negros (Shellhammer, 2009)..

### ***Oxidación de polifenoles***

Durante el envejecimiento de la cerveza, la oxidación de polifenoles puede contribuir, aunque en menor medida, a la formación de colores rojizos-ámbar. Estos cambios de color son más fácilmente percibidos en cervezas *lager* pálidas que en cervezas oscuras, pues quedan enmascarados por sus maltas coloradas y tostadas. La oxidación de polifenoles se ve favorecida por niveles de oxígeno disuelto en cerveza elevados y por la presencia de hierro soluble, procedente de los equipos cerveceros, del agua de elaboración o de las tierras de filtración de diatomeas. El uso de compuestos adsorbentes de polifenoles, como la polivinilpirrolidona (PVPP), durante la elaboración de la cerveza permite reducir el posterior aumento potencial de color causado por la oxidación de los polifenoles (Shellhammer, 2009)..

### **2.3.3. Turbidez coloidal**

La turbidez, definida como la falta de transparencia, es una característica no deseada especialmente en cervezas *lager* y *pilsner*. En cambio, otros estilos de cerveza, como por ejemplo las cervezas de trigo, son preferiblemente turbias.

En cerveza, es importante diferenciar entre turbidez biológica y turbidez no biológica. La turbidez biológica es aquella causada por la proliferación de microorganismos que, cuando alcanza elevadas concentraciones, causa la aparición de turbidez visible. En cambio, la turbidez no biológica, también conocida como turbidez coloidal, es formada principalmente por la interacción entre polipéptidos de alto peso molecular (procedentes de la malta) y polifenoles (procedentes de la malta y lúpulo).

Los principales polipéptidos involucrados en la formación de turbidez coloidal proceden de las hordeínas (proteína de la cebada) y presentan niveles elevados de los aminoácidos ácido glutámico, prolina, arginina y glicina. Por otro lado, los principales polifenoles responsables de causar turbidez son flavonoides, compuestos formados por dímeros, trímeros o polímeros de flavanoles (catequina, catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina).

Los flavonoides mayormente asociados a la formación de turbidez son la procianidina B3 (dímero de catequina-catequina) y la prodelfinidina B3 (dímero de galocatequina-catequina), conocidas

también como proantocianidinas. El mecanismo de unión exacto entre flavonoides y proteínas no ha sido del todo elucidado, pero se cree que los flavonoides tienen que ser previamente oxidados y deben polimerizar en moléculas mayores para poder formar complejos polifenoles-proteínas. Las prodelfinidinas B3 son más propensas a formar turbidez que las procianidinas B3, ya que las galocatequinas presentan tres grupos hidroxilos (OH) vecinales en sus anillos aromáticos, susceptibles a oxidarse y unirse a proteínas. mientras que las catequinas tienen solamente dos grupos OH.

La proporción de polifenoles implicados en la turbidez coloidal es muy baja, pues las procianidinas B3 y las prodelfinidinas B3 representan solamente el 3,3 % del total de polifenoles presentes en cerveza. En este sentido, la eliminación de estos compuestos durante el proceso de elaboración de la cerveza no perjudica las propiedades positivas de los polifenoles, que presentan actividad antioxidante frente al deterioro sensorial y nutritivo de la cerveza.

En cerveza, la formación de turbidez sigue dos etapas. Inicialmente, a temperatura ambiente, el contenido de polifenoles y proteínas de la cerveza se encuentra soluble, con un diámetro de partícula inferior a  $0,1 \mu\text{m}$ , sin aportar turbidez visible a la cerveza. Cuando la cerveza es enfriada por debajo de  $0^\circ\text{C}$ , las proteínas y los taninos tienden a agruparse en partículas de un diámetro de  $0,1 - 1 \mu\text{m}$ , reflejando la luz y formando turbidez visible. Estas uniones son no covalentes (formados por enlaces iónicos, hidrofóbicos y puentes de hidrogeno) y reversibles. La turbidez fría se redisuelve y desaparece (turbidez invisible) cuando la cerveza es atemperada de nuevo a temperatura ambiente. Sin embargo, con el tiempo, evolucionará a turbidez permanente, por lo cual resulta conveniente eliminar el máximo de turbidez fría durante el proceso de elaboración de cerveza. La turbidez fría es comúnmente eliminada en una etapa de enfriamiento y filtración, con o sin agentes clarificantes, previa a la pasteurización y envasado del producto final.

La turbidez permanente se genera inicialmente de la misma manera que la turbidez fría. En este caso los complejos solubles proteína-polifenoles se convierten en complejos insolubles mediante uniones covalentes e irreversible, que no vuelven a disolverse si se calienta la cerveza. El tamaño de partícula es mayor, entre  $1 - 10 \mu\text{m}$  de diámetro. La reacción de formación se cataliza por la presencia de oxígeno e iones metálicos y la cantidad de turbidez permanente tiene a incrementar durante el envejecimiento de la cerveza.

Por último, la interacción entre polifenoles y polisacáridos, o polifenoles y minerales también puede contribuir a formar turbidez coloidal, aunque en menor medida (Leiper & Miedl, 2009; Mastanjević et al., 2018).

#### 2.3.4. Compuestos amargos

Los compuestos amargos están constituidos mayormente por los compuestos químicos  $\alpha$ -ácidos (o humulonas) y  $\beta$ -ácidos (o lupulonas), procedentes del lúpulo. Entre estos, los  $\alpha$ -ácidos son los más importantes ya que representan un 2 – 15 % w/w del lúpulo, dependiendo de la variedad de lúpulo, y su forma isomerizada es la responsable principal de conferir el carácter amargo a la cerveza. Las cervezas pueden contener concentraciones de 15 – 100 mg/l de iso- $\alpha$ -ácidos, dependiendo del estilo, y su umbral sensorial se encuentra aprox. en 5 mg/l. Existen cinco análogos de los  $\alpha$ -ácidos, que difieren entre sí en la estructura de su cadena lateral: la cohumulona, humulona, y adhumulona son los compuestos mayoritarios, mientras que la prehumulona y posthumulona son minoritarios.

Durante la ebullición del mosto, a elevada temperatura, se produce la isomerización térmica de los  $\alpha$ -ácidos, formándose iso- $\alpha$ -ácidos. Los iso- $\alpha$ -ácidos son compuestos más solubles y confieren un mayor amargor que sus moléculas precursoras, los  $\alpha$ -ácidos. Además, cada iso- $\alpha$ -ácido puede dar lugar a dos epímeros, *cis*-iso- $\alpha$ -ácido y *trans*-iso- $\alpha$ -ácido. Generalmente, las *cis/trans*-isohumulonas y *cis/trans*-isocohumulona destacan por ser los productos más abundantes en las cervezas, representando cada una el 20 – 50 % del contenido total de iso- $\alpha$ -ácidos, seguido por las *cis/trans*-adhumulonas, con un 15%.

Los iso- $\alpha$ -ácidos son especialmente sensibles a la degradación durante el envejecimiento de la cerveza, causando una disminución del amargor sensorial percibido por los consumidores. Entender el proceso de degradación es complejo, debido al número de compuestos y reacciones implicadas. Cada análogo de iso- $\alpha$ -ácidos se encuentra a una concentración diferente, se degrada a una velocidad diferentes y, además, no aportan la misma intensidad de amargor a la cerveza.

En general, la molécula *cis*-isohumulona suele ser la más abundante, los isómeros *cis* son más estables, sufriendo una menor degradación que los isómeros en configuración *trans*. Además, los isómeros *cis* son significativamente más amargos que los isómeros *trans*, y las iso-humulonas más que las iso-cohumulonas.

Las principales causas de degradación de los iso- $\alpha$ -ácidos son la fotodegradación (presencia de luz) y degradación oxidativa (presencia de radicales libres de O<sub>2</sub>). Ambas reacciones son aceleradas a mayores temperaturas de almacenaje. Cuando la cerveza es expuesta a la luz UV, los iso- $\alpha$ -ácidos pueden ser fotodegradados por mecanismos directos o indirectos, ambos resultando en la formación de 3-metil-2-buten-1-ol (MBT), compuesto aromático que imparte gustos y aromas muy desagradables a mofeta. En el mecanismo directo, los iso- $\alpha$ -ácidos son degradados por absorción directa de luz UV, gracias a su grupo cromóforo que absorbe luz principalmente en

la región UV-B (280-320 nm). Por el contrario, en la región del espectro visible (390-700 nm), este cromóforo es transparente y los iso- $\alpha$ -ácidos son degradados de forma indirecta, mediante la intervención de un fotosensibilizador como, por ejemplo, la riboflavina (vitamina B2), la cual se encuentra en cerveza a concentraciones de aproximadamente 1 mg/L.

Por otro lado, los  $\alpha$ -ácidos y los b-ácidos y sus productos transformados también presentan un efecto estabilizador de la espuma de la cerveza y un efecto bacteriostático, inhibiendo el crecimiento de microorganismos contaminantes. El efecto estabilizador depende del carácter hidrofóbico de cada isómero, representando los isómeros *trans* una proporción mayor en la espuma que los isómeros *cis*. Además, los iso- $\alpha$ -ácidos reducidos, como los tetra-iso- $\alpha$ -ácidos y hexa-iso- $\alpha$ -ácidos, presentan un mayor efecto estabilizador (Blanco *et al.*, 2014; Caballero *et al.*, 2012; De Keukeleire *et al.*, 2009; Mezui, 2012).

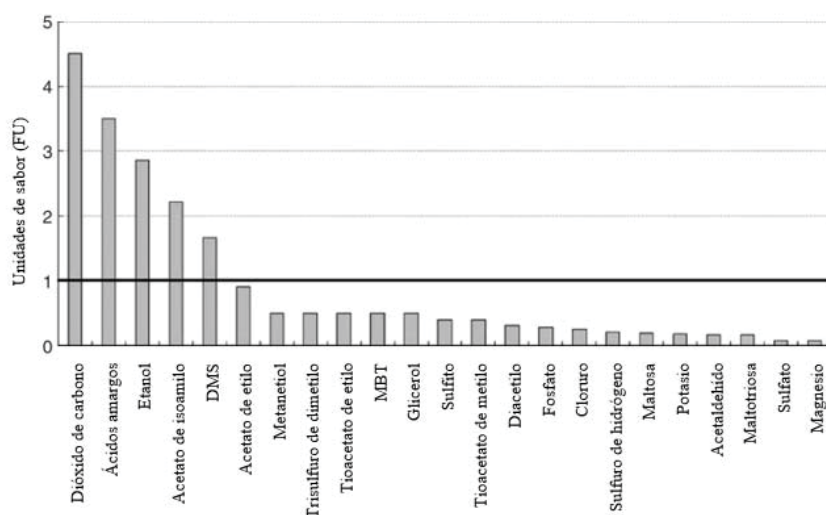
### **2.3.5. Sabor y compuestos volátiles**

El sabor de la cerveza es el resultado de múltiples interacciones complejas entre centenares de compuestos químicos y los receptores de gusto y olor. Los compuestos que imparten gusto pueden ser percibidos directamente en la lengua mientras que los aromas se relacionan con cualquier compuesto que sea percibido tanto en nariz como al final de la boca, de forma retronasal. La percepción del gusto, el aroma y la combinación de ambos describe el sabor de la cerveza. Los principales compuestos implicados en el sabor pueden ser derivados de los ingredientes como la cebada y el lúpulo, generados por la levadura como metabolitos, producidos por microorganismos contaminantes y derivados de reacciones de deterioro durante el envejecimiento de la cerveza.

Estos compuestos son percibidos por los degustadores si se encuentran a concentraciones superiores a su umbral sensorial. El umbral sensorial es determinado mediante paneles de degustación, en los cuales típicamente se va incrementando la concentración del compuesto hasta que es detectado y diferenciado claramente por los degustadores en comparación con los controles sin el compuesto añadido. Los métodos estándar reportan el umbral sensorial cuando al menos el 50 % de los degustadores detectan el compuesto. Se utiliza el concepto de unidad de sabor (FU, de sus siglas en inglés) para predecir la percepción sensorial de cada compuesto, es decir, la contribución de cada compuesto sobre el sabor global de la cerveza. Las unidades de sabor son calculadas como el cociente entre la concentración del compuesto y su umbral sensorial correspondiente. La Figura 2.2 muestra el perfil sensorial típico de una cerveza *lager* europea, obtenido a partir de las unidades de sabor (FU, de sus siglas en inglés). Aquellos compuestos que presentan valores superiores a 1 FU, son probablemente percibidos por los degustadores. Por ejemplo, los compuestos amargos, que suelen encontrarse a una concentración de 20 – 25 mg/L



(equivalente a 20 – 25 IBU), presentan un umbral sensorial de 5 mg/L y, consecuentemente, una percepción sensorial de aprox. 4 – 5 FU, razón por la cual el amargor es percibido notablemente al consumir la cerveza. Este análisis se utiliza de forma indicativa, pues presenta limitaciones. La sensibilidad de cada degustador para percibir un cierto compuesto puede variar considerablemente. Además, la percepción sensorial de cada compuesto puede depender substancialmente de la matriz en la que se encuentra, es decir, de la presencia y/o ausencia de otros compuestos en la cerveza. Hay compuestos que pueden interactuar entre sí, realzando sabores, enmascarando sabores o incluso cambiando el sabor (Holt *et al.*, 2019; Hughes, 2009; Meilgaard, 1975; Saison *et al.*, 2009).



**Figura 2.2.** Perfil sensorial típico de una cerveza *lager* europea, en unidades de sabor (FU, de sus siglas en inglés (adaptada de Hughes, 2009).

Numerosos tipos de compuestos están involucrados en el perfil sensorial de la cerveza, destacando mayormente los compuestos volátiles. La fracción volátil puede estar compuesta por más de 800 compuestos diferentes, aunque solamente decenas de ellos son conocidos por estar directamente implicados e influenciar la percepción sensorial del producto consumido. Los compuestos volátiles pueden ser clasificados en distintas familias según su naturaleza química: alcoholes superiores, ésteres, ácidos grasos, compuestos carbonilos (aldehídos), compuestos sulfurados, compuestos furanos, monoterpenoles, C13-norisoprenoides y fenoles volátiles (Olaniran *et al.*, 2017; Vanderhaegen *et al.*, 2006a).

La Tabla 2.2 muestra los compuestos volátiles relacionados con el deterioro del sabor de la cerveza. En cervezas frescas, los compuestos volátiles no se encuentran en equilibrio, de manera que tienden a desencadenar múltiples reacciones químicas, resultando en la pérdida de compuestos y sabores deseados (típicamente atribuidos a cervezas frescas) y la aparición de

compuestos y sabores no deseados (típicamente atribuidos a cervezas envejecidas) durante el envejecimiento de la cerveza. Estas reacciones pueden ser aceleradas principalmente por la presencia de oxígeno molecular y el aumento de la temperatura de la cerveza. En la Tabla 2.3 se resumen todas las reacciones descritas en bibliografía que, aunque viables, pueden ocurrir en mayor o menor grados de prevalencia durante la vida útil del producto.

**Tabla 2.2.** Compuestos formados durante el envejecimiento de la cerveza (Bamforth & Lentini, 2009; Vanderhaegen *et al.*, 2006a).

Clasificación	Compuesto	Clasificación	Compuesto
<i>Aldehídos</i>	Acetaldeído	<i>Compuestos heterocíclicos</i>	Furfural
	E-2-Nonenal		5-Hidroximetilfurfural
	E-2-Octenal		5-Metilfurfural
	E,E-2,4-Decadienal		2-Acetilfurano
	E,E-2,6-Nonadienal		2-Acetil-5-metilfurano
	2-Metilbutanal		2-Propionilfurano
	3-Metilbutanal		Furano
	Benzaldehído		Alcohol furfurílico
	2-Fenilacetaldehído		2-Ethoximethyl-furano
	3-(Metiltio)propionaldehído		2-Ethoximethyl-5-furfural
<i>Ésteres de etilo</i>	3-metilbutirato de etilo	2-Ethioxi-2,5-dihidrofurano	
	2-metilbutirato de etilo	Maltol	
	2-metilpropionato de etilo	Dihidro-5,5-dimetil-2(3 H)-furanona	
	Nicotinato de etilo	5,5-Dimetil-2(5 H)-furanona	
	Succinato de dietilo	2-Acetilpirazina	
	Lactato de etilo	2-Metoxipirazina	
	Fenilacetato de etilo	2,6-Dimetilpirazina	
	Formiato de etilo	Trimetilpirazina	
	Cinamato de etilo	Tetrametilpirazina	
	<i>Cetonas</i>	E- $\beta$ -Damascenona	<i>Acetales cíclicos</i>
Diacetilo		2-Isopropil-4,5-dimetil-1,3-dioxolano	
3-Metil-2-butanone		2-Isobutiril-4,5-dimetil-1,3-dioxolano	
4-Metil-2-butanona		2-Sec butil-4,5-dimetil-1,3-dioxolano	
4-Metil-2-pentanona			
2,3-Pentanediona			
<i>Compuestos de sulfuroso</i>	Trisulfuro de dimetilo	<i>Lactonas</i>	$\gamma$ -nonalactona
	Formiato de 3-Metil-3-mercaptoputil		$\gamma$ -hexalactona

**Tabla 2.3.** Principales reacciones implicadas en el deterioro de cerveza (Bamforth & Lentini, 2009; Vanderhaegen *et al.*, 2006a).

<b>Reacción</b>	<b>Descripción</b>
Oxidación enzimática de ácidos grasos insaturados	La lipoxigenasa (LOX), enzima producida durante la germinación de la cebada, cataliza la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (p.ej. ácido linoleico), formando hidroperóxidos, a partir del cual se desencadenan reacciones que conllevan finalmente a la formación de compuestos carbonilos instaurados (p.ej. E-2-nonenal).
Oxidación no enzimática de ácidos grasos insaturados	Los ácidos grasos insaturados (por ejemplo, ácido linoleico) pueden ser oxidados de forma autocatalítica, partiendo de radicales de oxígeno como hidroxilos y perhidroxilos.
Oxidación de iso- $\alpha$ -ácidos	A partir de compuestos amargos, alcoholes superiores y melanoidinas se pueden formar carbonilos volátiles. Los iso- $\alpha$ -ácidos reducidos no producen carbonilos relacionados con el deterioro.
Oxidación de alcoholes superiores	Los alcoholes superiores pueden ser convertidos a su aldehído equivalente, en presencia de melanoidinas. Esta reacción puede ser inhibida por los polifenoles y requiere de la incidencia de luz.
Degradación Strecker de aminoácidos	Los aminoácidos pueden reaccionar con compuestos $\alpha$ -dicarbonilos, como compuestos intermedios en las reacciones de Maillard. Los aminoácidos son convertidos en aldehídos. Los polifenoles pueden actuar como catalizadores de dicha degradación.
Condensación de aldeos	Aldehídos o cetonas reaccionan para formar compuestos carbonilos mayores. La reacción entre acetaldehído y heptanal puede formar E-2-nonenal. La prolina puede actuar como catalizadora.
Formación de acetales	La condensación de 2,3-butanediol con carbonilos (p.ej. acetaldehído) puede formar acetales cíclicos.
Unión de carbonilos por dióxidos de sulfuro	El sulfito producido por la levadura es capaz de formar complejos con compuestos carbonilos, resultando en un aducto que típicamente no imparte sabor en cerveza. Durante el envejecimiento de la cerveza, el sulfito es progresivamente liberado y consumido en otras reacciones.

(continuación)

**Tabla 2.3.** Continuación

<b>Reacción</b>	<b>Descripción</b>
Unión de carbonilos y grupos amino	Compuestos carbonilos se unen a grupos amino, incluidos grupos amino proteicos, para la formación de bases Schiff.
Reducción de compuestos carbonilos por la levadura	La levadura puede reducir compuestos carbonilos, incluyendo aldehídos y cetonas, (p.ej. acetaldehído a etanol, o diacetilo a acetoina y butanediol), mediante mecanismos enzimáticos
Liberación enzimática de compuestos volátiles	La levadura excreta enzimas que deterioran la cerveza como glucosidasas, que catalizan carbohidratos aromáticos del lúpulo. La $\beta$ -glucosidasa favorece la liberación de (E)- $\beta$ -damascenone en cerveza.
Neutralización de radicales de oxígeno por polifenoles y melanoidinas	Los polifenoles y las melanoidinas pueden neutralizar reacciones de oxidación catalizadas por la presencia de radicales de oxígeno. Los polifenoles pueden neutralizar superóxido, hidroxilos y radicales <i>proxí</i> generados durante la oxidación autocatalítica de ácidos grasos insaturados, actuar como quelantes de iones metálicos e inhibir la actividad de la lipoxigenasa.
Eliminación de peróxido de hidrogeno por peroxidasas	El peróxido de hidrogeno, radical clave en las reacciones oxidativas, puede ser eliminados por peroxidasas en presencia de polifenoles.
Liberación de dicetonas vecinales	El ácido acetoláctico y el acetohidroxitobutirato pueden ser degradados si no son completamente transformados a diacetilo y pentanodiona por la levadura durante la fermentación y maduración.
Compuestos sulfurosos	Agentes reductores (p.ej. el aminoácido cisteína o la levadura) pueden liberar progresivamente sulfuro de dimetilo (DMS) a partir de dimetilsulfóxido (DMSO) durante el envejecimiento de la cerveza. Además, la levadura puede reducir dióxido de azufre a sulfuro de hidrógeno. Se pueden formar compuestos aromáticos no deseados como el formiato de 3-metil-3-mercaptobutil y el 4-mercapto-4-metil-penta-2-ona.
Evolución de los niveles de ésteres	Algunos ésteres (p.ej. nicotinato de etilo o fenilacetato de etilo) pueden incrementar durante el almacenamiento. En cambio, otros (p.ej. acetato isoamilo) puede decrecer durante el envejecimiento de la cerveza.

## 2.4. Pasteurización térmica

### 2.4.1. Teoría de la pasteurización

El objetivo principal de la pasteurización térmica es alcanzar la estabilidad microbiológica de la cerveza mediante la inactivación térmica de levaduras y bacterias y, así, extender la vida útil del producto final. La eficacia de los tratamientos de pasteurización térmica depende de la temperatura y tiempo de tratamiento, así como de la composición del producto. La temperatura y el tiempo de tratamiento definen la carga térmica aplicada sobre el producto, medida en unidades de pasteurización (UP) según la Ecuación 2.1.

$$UP = \Delta t * 1,393^{(T - 60)} \quad \text{(Ecuación 2.1)}$$

Donde: UP = Unidades de pasteurización

$\Delta t$  = Tiempo de tratamiento (min)

T = Temperatura de tratamiento (°C)

Esta ecuación, basada en los parámetros de letalidad microbiana reportados por Vecchio *et al.*, (1951), es ampliamente utilizada en la industria cervecera, según recomienda la *European Brewery Convention* (ECB) (*EBC Analytica, 2.1.4. Pasteurisation, 2011*). La ecuación describe que 1 UP equivale a 1 minuto de tratamiento a 60 °C, pudiendo variar el tiempo de tratamiento con el aumento o disminución de la temperatura aplicada. En la Tabla 2.4 se muestra la cantidad de UP que la EBC recomienda aplicar en cerveza para lograr la estabilidad microbiana en función del tipo de cerveza.

**Tabla 2.4.** Recomendaciones de la *European Brewery Convention* (EBC) de rangos de unidades de pasteurización (UP) típicos según tipo de cerveza (*EBC Analytica, 2.1.4. Pasteurisation, 2011*).

Tipo de cerveza	Típicas UP mínimas	Típicas UP máximas
<i>Pilsner y lager</i>	15	25
<i>Ale y Stout</i>	20	35
Baja en alcohol	40	69
Sin alcohol	80	120

Actualmente, en la industria cervecera se alcanza la inactivación microbiana mediante equipos de pasteurización túnel (para producto envasado), pasteurización *flash* o filtración estéril (previamente al envasado del producto).

#### **2.4.2. Pasteurización térmica túnel**

En un pasteurizador túnel, la cerveza envasada pasa a través del equipo mediante un sistema de transporte mientras es rociada con agua a temperatura controlada. Los sistemas de aspersión de agua están situados en diferentes zonas, dosificando agua a diferentes temperaturas de manera que la temperatura de los envases aumenta de forma gradual a medida que pasa por las diferentes zonas hasta alcanzar la temperatura de pasteurización deseada, normalmente de 60 °C. La cerveza envasada es mantenida a esta temperatura durante el tiempo necesario para alcanzar las UP establecidas. A continuación, la cerveza envasada es transportada a otras zonas de aspersión para ser gradualmente enfriada con agua cada vez más fría, hasta que sale del equipo por el extremo contrario a su entrada. Los pasteurizadores túnel modernos aprovechan las diferencias de temperaturas entre las diferentes aguas de aspersión empleadas para calentar y enfriar las aguas del sistema y así disminuir el consumo energético del equipo. La temperatura y tiempo de residencia del producto en todas las zonas es monitorizada y registrada por el equipo para calcular de forma autónoma las unidades de pasteurización reales aplicadas a la cerveza envasada. El proceso de pasteurización completo dura normalmente una hora. Durante la pasteurización, el incremento de temperatura provoca el aumento de la presión en los envases debido al contenido de carbónico de la cerveza. Los envases están diseñados para soportar dichas presiones, pero el nivel de presión alcanzada depende del volumen de espacio de cabeza, por lo cual se requiere que sea controlado de forma extremadamente precisa durante el proceso de llenado previo para evitar problemas de estallido de los envases.

La ventaja de la pasterización en túnel es que tanto la cerveza como el envase son pasteurizados simultáneamente, eliminando cualquier riesgo de contaminación microbiana posterior. No obstante, los pasteurizadores túnel pueden fácilmente sobrepasteurizar el producto, debido a paradas técnicas en la línea de producción, con el efecto adverso que esto supone sobre la calidad del producto. Además, estos equipos son de grandes dimensiones, requiriendo un área de ocupación extensa, y tienen un coste de inversión y de operación mayor que los pasteurizadores flash y los sistemas de filtración (Briggs et al., 2004).

#### **2.4.3. Pasteurización térmica flash**

En la pasteurización térmica *flash*, la cerveza es pasteurizada en continuo, y posteriormente, envasada asépticamente, comúnmente en barriles. El equipo consiste básicamente en un intercambiador de calor de placas. La cerveza es bombeada desde un tanque pulmón y circulada a contracorriente de cerveza caliente (que sale del equipo ya tratada) para ser precalentada (zona de regeneración). A continuación, es calentada a la temperatura de pasteurización mediante su

circulación a contracorriente de agua caliente o vapor (zona de calentamiento). La cerveza se mantiene en esta zona durante el tiempo de residencia necesario para alcanzar las UP establecidas. Típicamente, la temperatura máxima alcanzada suele ser de 71 – 79 °C durante un periodo de tiempo de 15 a 60 segundos. Después, la cerveza caliente vuelve a circular a contracorriente de cerveza fría (que entra al equipo sin ser tratada) para ser enfriada y almacenada en otro tanque pulmón. Con este sistema, las diferencias de temperatura entre la cerveza de entrada (no tratada) y de salida (tratada) son aprovechadas para precalentar y enfriar el producto. Para que todo el producto reciba de forma homogénea la misma carga térmica, se requiere un flujo de régimen turbulento (número de Reynolds > 3.000). La cerveza es bombeada a una presión de 8,5 – 10 bar, con una contrapresión de 1 bar, para evitar la expansión del carbónico durante el incremento de temperatura, y contra presionada a 1 bar.

Las ventajas de la pasteurización térmica *flash* es que requiere de menos área de ocupación y conlleva un coste de inversión y de operación menor que la pasteurización túnel. En cambio, su desventaja es que presenta mayores riesgos de contaminación en etapas posteriores al tratamiento. Por este motivo, requiere de un control microbiológico de los procesos de lavado de los envases y del llenado muy riguroso, para evitar posibles contaminaciones tanto del envase (entre la lavadora de envases y la llenadora), como de la cerveza (entre la pasteurización y su envasado).

#### **2.4.4. Alternativa convencional: La filtración**

La filtración estéril es un método físico no térmico aplicado para la eliminación de microorganismos en cerveza, previamente a su envasado. Aunque existen varios tipos de filtración, actualmente la filtración de membranas es la única tecnología que ha demostrado retener los microorganismos típicos de cerveza y ser considerada un método de filtración estéril. Las membranas están fabricadas de ésteres de celulosa, de un grosor de 150  $\mu\text{m}$ , con poros uniformemente distribuidos de 0,45  $\mu\text{m}$ . A medida que la cerveza pasa a través del filtro todos los microorganismos de dimensiones mayores que el tamaño del poro son retenidos en su superficie, proporcionando una esterilidad absoluta del producto filtrado.

La filtración estéril presenta la ventaja de que es un tratamiento no térmico, respetuoso con la calidad de la cerveza, que permite minimizar el efecto negativo sobre el sabor. Sin embargo, no inhibe la actividad de enzimas que favorecen el deterioro de las cervezas, como por ejemplo la proteinasa A o las esterases, que catalizan la degradación de la espuma y de los ésteres volátiles, respectivamente, a diferencia de la pasteurización térmica convencional. Se ha demostrado que cervezas filtradas presentan una vida útil menor que cervezas pasteurizadas térmicamente. Por otro lado, la filtración estéril conlleva un coste de inversión y operación menor que la

pasteurización túnel. No obstante, la principal desventaja de las membranas es que son propensas a colmatarse y requieren que la cerveza haya sido previamente filtrada adecuadamente, mediante el uso de dos o tres filtros de cartuchos secuenciales con tamaños de poros progresivamente más pequeños ( $5 - 1 \mu\text{m}$ ), situados después de la filtración por tierras de diatomeas. En este sentido, no es tecnología compatible con la producción de cervezas turbias. Además, posteriormente al proceso de filtración, la cerveza debe ser envasada bajo condiciones estériles, lo cual añade complejidades operativas durante el proceso de envasado. Asimismo, debe incluirse un tanque pulmón entre el filtro y la envasadora, y se requiere monitorizar atentamente el caudal (que debe ser constante) y la caída de la presión durante la filtración (2 bares es aceptable) para evitar cambios de presión repentinos que dificulten el filtrado y comprometan la esterilidad del sistema (Briggs et al., 2004).

## **2.5. Nuevas tecnologías de pasteurización no térmica: Tratamiento a altas presiones (HPP)**

El tratamiento a altas presiones (HPP, de sus siglas en inglés) es un método de conservación de alimentos no térmico, considerado no convencional, menos invasivo y dañino para el producto que las tecnologías existentes y comúnmente utilizadas en la industria alimentaria, como son los procesos térmicos (Buzrul *et al.*, 2005a). Las altas presiones pueden aplicarse con dos tecnologías diferentes, que no deben ser confundidas entre ellas: las altas presiones hidrostáticas (HHP, de sus siglas en inglés) y la homogenización a ultra alta presión (UHPH, de sus siglas en inglés).

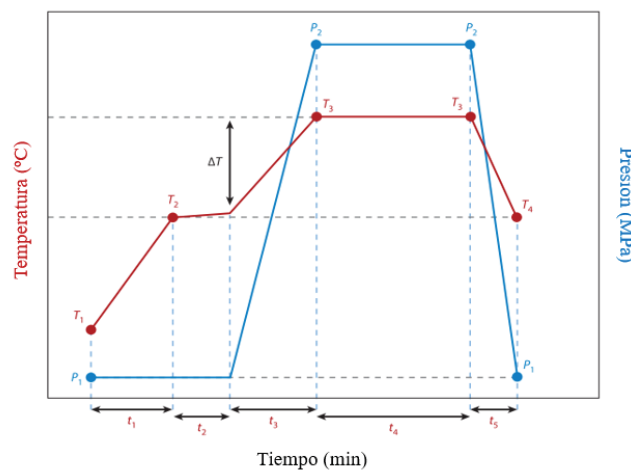
### **2.5.1. Altas presiones hidrostáticas (HHP)**

#### **2.5.1.1. Descripción de la tecnología**

La tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP, de sus siglas en inglés) es uno de los desarrollos más significantes en el procesamiento de alimentos sólidos y líquidos de las últimas décadas. Esta tecnología se basa en la aplicación de elevadas presiones, en un rango de 200 – 800 MPa, en combinación o no de calor, para alcanzar la inactivación microbiana de los alimentos sin afectar la calidad del producto, ya que, en general, retiene sus propiedades fisicoquímicas (p.ej. color) y organolépticas. No obstante, una de sus principales desventajas es que los equipos operan en lotes (*batch*), en el caso de productos previamente envasados, o en semi-continuo, para tratar líquidos no envasados.



El funcionamiento de los equipos HHP (*batch*) consiste en situar el producto envasado en cestas de carga que son debidamente colocadas dentro de un tanque de presurización. Cuando se cierra el tanque, el resto de su volumen es llenado con agua a baja presión, la cual actuará como el fluido transmisor de presión. Una vez lleno, los intensificadores bombean agua a alta presión dentro del tanque hasta alcanzar la presión de tratamiento establecida. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento deseado, el tanque es despresurizado mediante la liberación del agua. En los equipos semi-continuos, los depósitos cuentan con pistones de presión móviles para presurizar el líquido. El depósito de presión se llena con el líquido a tratar a través de una bomba de transferencia de baja presión y una vez llenado, se cierra la válvula de entrada al depósito. A continuación, se presuriza el líquido mediante la presión ejercida por un fluido de transmisión de presión, normalmente agua, situado al otro lado del pistón móvil. Después de mantener la presión durante el tiempo deseado, el sistema es despresurizado mediante la liberación de presión del fluido transmisor de presión y el líquido tratado puede ser descargado en un tanque estéril, para ser posteriormente envasado asépticamente en envases estériles. En este sentido, en un modo semi-continuo, tres depósitos *batch* pueden ser concatenados: el primero descarga el producto, el segundo es presurizado y el último es cargado al mismo tiempo, para mantener una producción continua. En la Figura 2.3 se representan las etapas principales de un proceso HHP estándar. En el proceso HHP, los parámetros principales a controlar y que definen la eficacia de los tratamientos son la presión, el tiempo y la temperatura de tratamientos. No obstante, las demás variables de diseño, como son el tiempo de presurización y de despresurización y la temperatura inicial del producto también son determinantes (Balasubramaniam *et al.*, 2015).



**Figura 2.3.** Presión y temperatura durante un tratamiento HHP típico: precalentamiento ( $t_1$ ), carga del producto ( $t_2$ ), compresión ( $t_3$ ), tratamiento ( $t_4$ ) y descompresión ( $t_5$ ), tiempo de tratamiento a la presión deseada. Se representa la temperatura inicial ( $T_1$ ), de precalentamiento ( $T_2$ ), de tratamiento ( $T_3$ ) y final ( $T_4$ ), así como la presión atmosférica ( $P_1$ ) y la presión de tratamiento ( $P_2$ ) (figura adaptada de Balasubramaniam *et al.*, 2015).

### **2.5.1.2. Aplicación de la tecnología HHP para el tratamiento de cerveza**

#### ***Inactivación microbiana***

La eficacia de los tratamientos HHP para la inactivación microbiana depende principalmente de la presión aplicada y del tiempo de duración del tratamiento, aunque la resistencia microbiana puede variar considerablemente en función de la matriz del producto tratado (pH, viscosidad y composición) y del tipo de microorganismo. En general, los microorganismos procariotas han demostrado ser más resistentes que los eucariotas y las bacterias Gram positivas – cuya pared celular cuenta con una capa de peptidoglucanos gruesa – más resistentes que las bacterias Gram negativas – que cuentan con una membrana externa y una capa de peptidoglucanos delgada – (Rendueles *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2017).

La Tabla 2.5 resume los estudios realizados con la tecnología HHP para la inactivación microbiana de cerveza, según la bibliografía consultada. En general, se ha demostrado la eficacia de los tratamientos HHP para la inactivación de levaduras, bacterias lácticas, bacterias acéticas y aerobias en cervezas modelo (Fischer *et al.*, 2006; Ulmer *et al.*, 2000, 2002), cervezas *lager* (Buzrul *et al.*, 2005a), cervezas *pale ale, mild ale* (Castellari *et al.*, 2000) y cervezas de trigo (Yin *et al.*, 2016). En la Tabla 2.5 se muestran las condiciones de tratamiento aplicadas y microorganismos ensayados en los diferentes estudios. De manera similar a la pasteurización térmica, los tratamientos HHP alcanzaron inactivación microbiana mayores en cervezas con contenidos de alcohol y extractos de lúpulo mayores y pH más ácidos, tanto para microorganismos vegetativos (Fischer *et al.*, 2006; Gänzle *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2000) como para ascosporas (Milani *et al.*, 2016a).

#### ***Efecto de la tecnología HHP sobre la calidad de la cerveza***

La Tabla 2.6 presenta el efecto de la tecnología HHP sobre las propiedades fisicoquímicas (color, turbidez, espuma y compuestos amargos) y sensoriales de la cerveza, según los estudios reportados en bibliografía.

Estos estudios han demostrado que la tecnología HHP incrementa el color de las cervezas cuando se aplican presiones elevadas y/o tiempos de tratamiento largos, mientras que a condiciones de tratamiento más suaves no se ve alterado. (Buzrul *et al.*, 2005a) no encontró diferencias de color entre cervezas *lager* sometidas a HHP (200 – 350MPa, 3 – 5 min) y cervezas pasteurizadas térmicamente, mientras que en el estudio reportado por (Stulikova *et al.*, 2020), en el que tampoco

**Tabla 2.5.** Estudios reportados sobre el efecto de los tratamientos HHP sobre la inactivación microbiana en cerveza (tabla adaptada de Santos *et al.*, 2017).

Tipo de cerveza	Condiciones de tratamiento	Resultados observados	Referencia
Cerveza <i>lager</i>	350 MPa, 3 – 5 min	No crecieron levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas durante 1, 28 y 56 días de almacenamiento (20 °C)	Buzrul <i>et al.</i> (2005b)
Cerveza <i>pale ale</i> y <i>mild ale</i>	600 MPa, 5 min	Alcanzaron 4 reducciones logarítmicas de hongos, levaduras y bacterias aerobias. No crecieron bacterias lácticas	Castellari <i>et al.</i> (2000)
Cerveza de trigo	400 MPa, 15 min; 500 MPa, 10 min; 600 MPa, 15 min	No crecieron bacterias aerobias y bacterias lácticas durante 84 días de almacenamiento (20 °C)	Yin <i>et al.</i> (2016)
Cerveza <i>lager</i>	200, 300 y 400 MPa	Se obtuvieron 2,5 reducciones logarítmicas de ascosporas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 200 MPa, 30 min; 300 MPa, 27s y 400 MPa, 12 s.	Milani <i>et al.</i> (2016a)
Cerveza <i>lager</i> (0,0, 4,8, 7,0 % v/v alcohol)	400, 600 MPa; 5, 15, 20 y 30 s	Alcanzaron 7 reducciones logarítmicas de ascosporas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 600 MPa durante 5 s. A 300 MPa, tiempos de tratamiento de 120, 7,2 y 1,0 s fueron suficientes para pasteurizar cervezas 0,0 %, 2,8 % y 7,0 % de alcohol.	Milani <i>et al.</i> (2016b)
Cerveza modelo con diferentes extractos de lúpulo (20 y 100 mg/L) y etanol (5 y 10 %)	200, 300, 400, 500 y 600 MPa; 15 °C, varios tiempos.	Se observó inactivación microbiana de <i>Lactobacillus plantarum</i> a a 600 MPa. A 200 MPa / 30 a 60 min. las células perdieron su resistencia al lúpulo El extracto de lúpulo (50 y 100 mg / L) y el contenido de etanol (5% y 10%) aceleraron la inactivación y el alcohol tuvo un efecto más positivo.	Ulmer <i>et al.</i> (2000, 2002)
Cerveza modelo	300 MPa, 20 °C, varios tiempos	Se inactivó el 99% de <i>Lactobacillus plantarum</i> en 10 min a 300 MPa. La adición de extracto de lúpulo (100 mg / L) y alcohol (10% v/v) aumentó la eficacia.	Gänzle <i>et al.</i> (2001)
Cerveza modelo	200 y 300MPa/ 20°C hasta 120 min	No se alcanzaron reducciones significativas de <i>Lactobacillus plantarum</i> , pero se demostró una mayor inactivación a pH bajos y con la adición de lúpulo.	Fischer <i>et al.</i> (2006)

observó un incremento significativo en cervezas tratadas a mayor presión (550 MPa, 5 min), en comparación con cervezas sin tratar. Asimismo, Yin *et al.* (2016) tampoco reportó diferencias significativas entre cervezas de trigo tratadas con HHP (400 MPa, 5 min; 500 MPa, 10 min; 600 MPa, 5 min), cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas sin tratar, mientras que tratamientos HHP más intensos (700 MPa; 10 min) incrementaron el color. Por otro lado, en el estudio reportado por Castellari *et al.* (2000), el efecto dependió del parámetro evaluado, pues la tecnología HHP no afectó al brillo (*L*) de cervezas *pale ale* y *mild ale*, pero sí a otros parámetros de color, como el nivel de saturación de color, los cuales fueron inferiores que en cervezas pasteurizadas térmicamente. Además, en los estudios Buzrul *et al.* (2005b) y Castellari *et al.* (2000), los resultados observados se mantuvieron durante los 56 y 49 días de almacenamiento (a 20 °C) evaluados, respectivamente.

Respecto a la turbidez de la cerveza, la tecnología HHP favorece su incremento, aunque en menor o mayor grado dependiendo de las condiciones de tratamiento aplicadas. Según reportaron Buzrul *et al.* (2005a), ambos tratamientos, HHP y la pasteurización térmica (60 °C, 15 min), de cervezas *lager* provocaron el incremento de la turbidez en comparación con cervezas sin tratar. Asimismo, los tratamientos HHP más intensos (350 MPa, 5 min) favorecieron la aparición de una mayor turbidez en comparación con la pasteurización térmica convencional (60 °C, 15 min) y los tratamientos HHP menos intensos (200, 250 y 300 MPa, 3 y 5 min), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, Fischer *et al.* (2006) observaron que cervezas *lager* y *Pilsen* tratadas con HHP (300, 500, 700 MPa, 5 min) presentaron niveles de turbidez más elevados, independientemente de las condiciones de tratamiento, aunque las compararon con cervezas pasteurizadas térmicamente con cargas térmicas muy bajas (60 °C/ 2 min, equivalente a 2 UP). En cervezas *pale ale* y *mild ale* tratadas con HHP a elevadas presiones (600 MPa/5min), se observaron niveles de turbidez elevados en comparación con cerveza del mismo lote pasteurizada térmicamente a 10 UP (60 °C/ 10 min, equivalente a 10 UP) (Castellari *et al.*, 2000). De forma similar, en cervezas de trigo turbias, la tecnología HHP (400 MPa/ 15 min, 500 MPa/ 10 min, 600 MPa/ 6 min) también aumentó la turbidez en comparación con la pasteurización térmica (60 °C, 15 min, 15 UP) (Yin *et al.*, 2016).

En cuanto a la estabilidad de la espuma de la cerveza, se ha demostrado que los tratamientos HHP no afectan o incluso mejoran su durabilidad en cervezas *lager*, cervezas *ale* (Santos *et al.*, 2017) y en cervezas de trigo (Yin *et al.*, 2016) en comparación con la pasteurización térmica convencional.

Los estudios reportados también demostraron que las cervezas tratadas con HHP presentan menor contenido de compuestos amargos que las pasteurizadas térmicamente, diferencia que se sigue observando durante toda la vida útil de las cervezas (Buzrul *et al.*, 2005a, 2005b).

Por último, Milani *et al.* (2016b) demostraron que los tratamientos HHP no afectan sensorialmente a cervezas *lager* en comparación con la pasteurización térmica, ya que no encontraron diferencias significativas entre ambas cervezas mediante pruebas de degustación triangulares y de preferencia. Sin embargo, otros estudios que realizaron pruebas de degustación descriptivas demostraron que las cervezas *lager* tratadas con HHP pierden plenitud en boca, amargor y aroma a lúpulo en comparación con cervezas sin tratar (Stulikova *et al.*, 2020), aunque no se compararon con cervezas pasteurizadas térmicamente. Yin *et al.* (2016) también realizaron degustaciones descriptivas y demostraron que las cervezas de trigo tratadas con HHP conservaron un mayor aroma de plátano, una mayor sensación en boca y frescor que las pasteurizadas térmicamente.

Así pues, los estudios reportados apuntan que el perfil sensorial de las cervezas tratadas con HHP podrían presentar características atribuidas generalmente a cervezas más frescas que las cervezas pasteurizadas térmicamente. Sin embargo, se propone realizar más investigación al respecto, pues los resultados no son consistentes entre los diferentes estudios reportados, probablemente debido al tipo de cerveza, condiciones de tratamiento aplicadas e incluso metodología analítica utilizada. Asimismo, se carece de estudios que evalúen la evolución del perfil sensorial de cervezas tratadas con HHP durante su vida útil, en comparación con la evolución del perfil sensorial de cervezas pasteurizadas térmicamente.

**Tabla 2.6.** Estudios reportados sobre el efecto de los tratamientos HHP sobre la calidad de la cerveza (Tabla adaptada de Santos *et al.*, 2017).

Tipo de cerveza	Condiciones de tratamiento	Resultados observados	Referencia
<b>Color</b>			
Cerveza <i>lager</i>	200, 250, 300, 350 MPa, 3 – 5 min	El aumento de la presión no afectó al color, incluso durante su almacenamiento (56 días a 20 °C).	Buzrul <i>et al.</i> (2005b)
Cerveza <i>pale ale</i> y <i>mild ale</i>	600 MPa, 5 min	No diferencias en brillo ( <i>L</i> ). Los demás parámetros de color ( <i>a</i> , <i>b</i> , <i>C</i> ) fueron mayores en pasteurización térmica	Castellari <i>et al.</i> (2000)
<b>Análisis sensorial</b>			
Cerveza <i>lager</i>	300, 500 y 700 MPa/5 min	No se observaron diferentes entre la cerveza tratada con HPP y el control tratado térmicamente.	Fischer <i>et al.</i> (1998)
Cerveza <i>Pilsen Lager</i>	250 MPa	Reducción del potencial <i>redox</i> después de 100 días de almacenamiento.	Franchi <i>et al.</i> (2011a)
Cerveza <i>lager</i> y <i>ale</i>	600 MPa/30 s	No se observaron diferencia entre las cervezas sin tratar y las tratadas con HPP	Milani <i>et al.</i> (2016b)
Cerveza de trigo	400 MPa/15 min, 500 MPa/10 min y 600 MPa/5 min	A diferencia de las cervezas tratadas térmicamente, las cervezas HHP mantuvo el aroma a plátano y presentaron sensación de boca y frescura fue ligeramente mayor.	Yin <i>et al.</i> (2016)
<b>Estabilidad de la espuma</b>			
Cerveza <i>lager</i>	300, 500 y 700 MPa/5 min	No se observaron diferencias significativas entre las cervezas tratadas con HPP y las tratadas térmicamente.	Fischer <i>et al.</i> (1998)
Cerveza de trigo	400 MPa/15 min, 500 MPa/10 min y 600 MPa/15 min	Los tratamientos HHP resultaron en una mejor estabilidad de la espuma comparada con el tratamiento térmico.	Yin <i>et al.</i> (2016)
Cerveza <i>ale</i> y <i>lager</i>	300, 400, 500 y 600 MPa/20 min	Aumento de la estabilidad de la espuma tratada de 300 a 600 MPa / 20 min.	Pérez-Lamela <i>et al.</i> (2004)

(Continuación)

**Tabla 2.6.** Continuación

Tipo de cerveza	Condiciones de tratamiento	Resultados observados	Referencia
<b>Turbidez</b>			
Cerveza <i>lager</i>	200, 250, 300 y 350 MPa/3 y 5 min	Aumentó en cerveza tratada con HHP en comparación con cerveza tratada térmicamente. La turbidez alcanzó el máximo a 350 MPa / 3 y 5 min durante 56 días de almacenamiento (20 °C)	Buzrul <i>et al.</i> (2005a, 2005b)
Cerveza <i>pale ale</i> y <i>mild ale</i>	600 MPa/5 min	Aumentó en la cerveza tratada con HHP en comparación con cerveza tratada térmicamente.	Castellari <i>et al.</i> (2000)
Cerveza <i>lager</i>	300, 500 y 700 MPa/5 min	Aumentó en cerveza tratada con HHP en comparación con el tratamiento térmico, especialmente en los tratamientos al 500 y 700 MPa / 5 min	Fischer <i>et al.</i> (1998)
Cerveza <i>ale</i> y <i>lager</i>	300, 400, 500 y 600 MPa/20 min	Mayor turbidez en las cervezas tratadas con HHP	Pérez-Lamela <i>et al.</i> (2004)
Cerveza de trigo	400 MPa/15 min, 500 MPa/10 min y 600 MPa/15 min	Mayor turbidez en la cerveza tratadas con HHP	Yin <i>et al.</i> (2016)
Cerveza <i>Pilsen lager</i> no pasteurizada	100, 150, 200, 250 y 300 MPa	Mayor turbidez en las cervezas sometidas a homogeneización a alta presión (HPH)	Franchi <i>et al.</i> (2011a)
<b>Compuestos amargos</b>			
Cerveza <i>lager</i>	200, 250, 300 y 350 MPa/3 y 5 min	No se observó un aumento del amargor en la cerveza sometida a HHP incluso después de 56 días de almacenamiento (20 ° C en la oscuridad), en comparación con el aumento del amargor de la cerveza tratada térmicamente	Buzrul <i>et al.</i> (2005a, 2005b)

## **2.5.2. Homogenización a ultra alta presión**

### **2.5.2.1. Descripción de la tecnología**

La homogenización a ultra alta presión (UHPH, de sus siglas en inglés), también conocida como altas presiones dinámicas, es una de las tecnologías emergentes más innovadoras y con mayor potencial industrial para el tratamiento en continuo de productos líquidos, diferenciándose de otras tecnologías por su capacidad simultánea de estabilización y sanitización (pasteurización o esterilización, según deseado) del producto tratado. El principio de funcionamiento de la tecnología UHPH se basa en el mismo principio que la tecnología de homogenización a altas presiones convencional (HPH, de sus siglas en inglés), utilizada comúnmente en la industria. Este consiste en forzar el paso de un líquido bajo el efecto de la presión generada por una válvula de disrupción (homogenización), específicamente diseñada para ello, con la finalidad de obtener una distribución homogénea del tamaño de las partículas suspendidas en dicho líquido. Además, a parte de la presión y descompresión, también se generan fuerzas de cizalla, turbulencia, cavitación e impacto durante el paso del líquido por la válvula de homogenización.

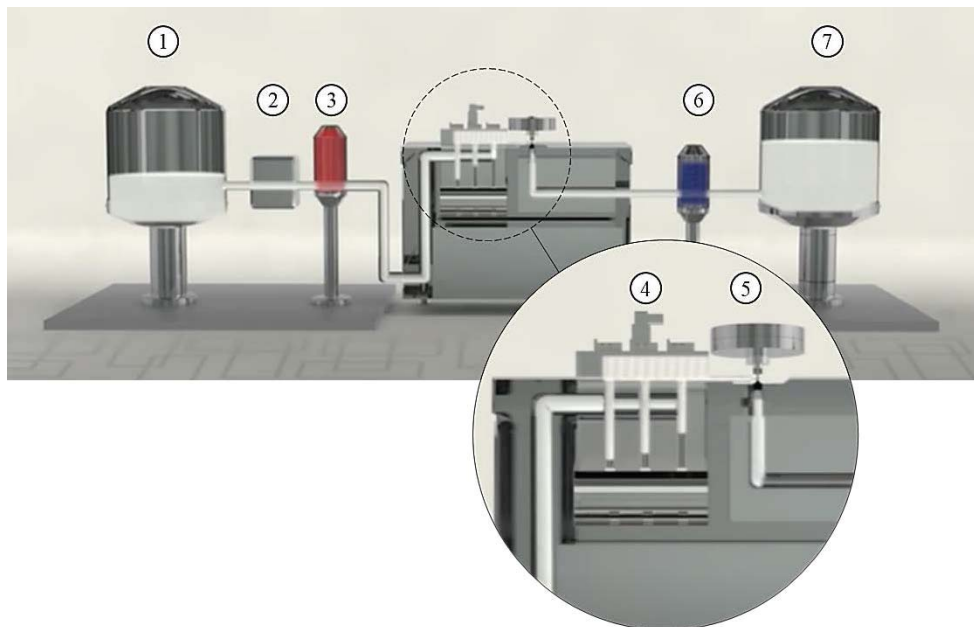
Actualmente, la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica utiliza homogeneizadores convencionales a presiones de hasta 100 MPa para reducir el tamaño de partículas y, consecuentemente, incrementar la estabilidad de emulsiones. Sin embargo, los últimos equipos HPH desarrollados pueden operar a presiones de hasta 100 – 200 MPa, dependiendo del diseño y características de cada equipo. Algunos fabricantes son Microfluidics (EE. UU.), Bee International (EE. UU.), Avestin (Canadá), Gea Niro Soavi (Italia), y APV (Reino Unido). No obstante, en 2006, Stansted Fluid Power Ltd (Reino Unido) modificó la configuración y diseño de la válvula de homogenización para alcanzar presiones mayores, permitiendo operar a presiones de 150 – 200 MPa, consideradas HPH, y también a presiones de 200 – 400 MPa, consideradas UHPH. Estos avances permitieron ampliar el abanico de aplicaciones industriales de la tecnología que, a parte de la homogenización, ha demostrado su potencial para la sanitización (pasteurización y esterilización) de productos líquidos, inactivación de enzimas, nonofragmentación y producción de nanoemulsiones (disrupción de nanogotas) a presiones de 200 – 400 MPa (preferiblemente  $\geq$  300 MPa). El sistema UHPH en continuo para dichas aplicaciones industriales fue patentado por la Universidad Autónoma de Barcelona (WO 2012010284 A2, WO2012130794 A1) y licitado para su explotación exclusiva a Ypsicon Advanced Technologies S.L (Morata & Guamis, 2020; Zamora & Guamis, 2014).

Como se muestra en la Figura 2.4, el sistema UHPH consta de un tanque de alimentación, desde el cual se bombea el fluido hacia un intercambiador de calor, que permite acondicionarlo a la



temperatura deseada (en frío o hasta 90 °C) antes de ser tratado. A continuación, el fluido entra en el equipo UHPH, el cual consta de un motor eléctrico que mediante un cigüeñal mueve a 3 pistones (igual que el motor de explosión de un vehículo) impulsando a presión el fluido contra una válvula de alta presión (hasta 350 MPa). A la salida de la válvula, el fluido es enfriado instantáneamente como resultado de la descompresión. Además, el fluido pasa a través de un segundo intercambiador de calor para acabar de ser enfriado a la temperatura de salida deseada, antes de ser enviado a un segundo tanque aséptico, para su posterior envasado. Durante el proceso, se experimenta una subida de temperatura del fluido durante un tiempo extremadamente corto, inferior a 0,2 segundos, lo que explica que el efecto térmico sea inexistente y permita preservar las propiedades originales del producto tratado. La presión de homogenización y la temperatura de entrada son los parámetros de diseño clave que definen la eficacia del tratamiento, los cuales se establecen en función del producto tratado y aplicación deseada.

El consumo energético de la UHPH es menor que el de otras tecnologías emergentes, 50 % inferior a la HPP (Ypsicon Advanced Technologies S.L.).



**Figura 2.4.** Diagrama del sistema UHPH, que incluye 1) tanque de alimentación, 2) filtro, 3) intercambiador de calor, 4) pistones, 5) válvula de homogenización, 6) intercambiador de calor y 7) tanque de almacenamiento (figura adaptada de Ypsicon Advanced Technologies S.L.).

### **2.5.2.2. Aplicación de la tecnología UHPH para el tratamiento de cerveza**

#### ***Inactivación microbiana***

La eficacia de los tratamientos UHPH para la inactivación de los microorganismos presentes en cervezas *lager* ha sido demostrada previamente en bibliografía. Franchi *et al.* (2011) reportó inactivaciones parciales de *Lactobacillus brevis* (reducciones de < 3 unidades logarítmicas), una de las principales bacterias contaminantes responsable del deterioro de la cerveza, a presiones de homogenización de 60 – 140 MPa, mientras que a presiones de homogenización mayores, de 150 MPa, se observaron reducciones de > 6 unidades logarítmicas. El estudio no reporta la temperatura de entrada de la cerveza.

Además, Franchi *et al.* (2013) evaluaron la resistencia de diferentes microorganismos en cervezas *lager* tratadas con UHPH. La concentración de todos los microorganismos fue reducida 1 – 2 unidades logarítmicas a 100 MPa mientras que, a presiones de 150 MPa, alcanzaron la inactivación máxima para todos ellos (aprox. 6 unidades logarítmicas). A 150 MPa, se inactivaron los microorganismos obtenidos de colecciones de cultivos de laboratorio (*Saccharomyces diastaticus*, *Lactobacillus brevis* y *Acetobacter aceti*), los cuales demostraron estar menos adaptados a la cerveza, mientras que a 200 – 250 MPa se inactivaron los microorganismos obtenidos aislados de una cervecería (*Schizosaccharomyces ludwigii*, *Pediococcus* spp. y *Lactobacillus delbreuckii*), mejor adaptados a las propiedades antimicrobianas de la cerveza. Las temperaturas de entrada de la cerveza no fueron reportadas.

#### ***Efecto los tratamientos UHPH sobre la calidad de la cerveza***

Hasta la fecha, los estudios publicados que evalúan el efecto de la tecnología UHPH sobre las principales características de la cerveza, tanto a nivel fisicoquímico como a nivel sensorial, son escasos, a pesar de las ventajas de esta tecnología frente a otras tecnologías no térmicas. Franchi *et al.* (2011) evaluó el efecto de la tecnología UHPH (homogeneizador Stansted Fluid Power Ltd®, Essex, UK) sobre el color, la turbidez y el potencial *redox* de la cerveza, aunque los resultados no fueron comparados con cervezas pasteurizadas térmicamente.

Los tratamientos UHPH (100 – 300 MPa,  $T_E = 6$  y  $25$  °C) no afectaron el color de las cervezas *lager* tratadas en comparación con la cerveza sin tratar. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias de color entre cerveza tratada a 250 MPa ( $T_E = 6$  °C) y la cerveza sin tratar a lo largo de su vida útil (100 días a  $25$  °C). Respecto a los niveles de turbidez, los tratamientos UHPH (100 – 300 MPa) favorecieron su formación en cervezas *lager*, en comparación con la cerveza sin tratar, independientemente de la temperatura de entrada de la cerveza ( $T_E = 6$  y  $25$  °C). A presiones inferiores a 150 MPa, el incremento observado fue relativamente bajo, mientras que a presiones

superiores incrementó exponencialmente con el aumento de la presión de homogenización aplicada. En las cervezas tratadas con UHPH a 250 MPa (6 °C) se evaluó el turbio a lo largo de su vida útil y se observó que, durante los 7 días se mantuvo constante y, posteriormente, aumentó hasta 4 veces durante los 30 primeros días, a partir de los cuales se mantuvo relativamente constante. Por otro lado, Franchi *et al.* (2011a) observaron que el potencial *redox* de cervezas tratadas con UHPH (250 MPa,  $T_E = 6\text{ °C}$ ) no se vio afectado durante los primeros 7 días de vida útil, incrementando posteriormente durante los siguientes 70 días, a partir de los cuales decreció rápidamente (almacenamiento a 25 °C). A pesar de que el potencial *redox* es un parámetro indicador de la estabilidad oxidativa y, consecuentemente, de la estabilidad sensorial de la cerveza durante su vida útil, estos resultados no son fácilmente interpretables si no se comparan con otras muestras referencia. En este sentido, se requiere una mayor investigación sobre el efecto de la tecnología UHPH sobre las propiedades fisicoquímicas, oxidativas y sensoriales de la cerveza, para evaluar su viabilidad como alternativa a la pasteurización térmica convencional.

### **Capítulo 3. Materiales y métodos**



### 3.1. Cervezas filtradas

Para todos los estudios se utilizó cerveza filtrada (*lager*, alcohol 5,4 % v/v), proporcionada por una empresa cervecera local. Para el estudio realizado en el *Apartado 4.1 (Capítulo 4)*, se partió de cerveza pasteurizada, la cual fue desgasificada mediante agitación y posteriormente inoculada con la levadura cervecera *Saccharomyces pastorianus* y las bacterias contaminantes *Lactobacillus brevis* y *Gluconobacter oxydans*, previamente aisladas por la empresa cervecera, a una concentración de [REDACTED] en cerveza final. Para el estudio realizado en el *Apartado 4.2 (Capítulo 4)*, se utilizó cerveza sin pasteurizar inoculada con *Saccharomyces pastorianus*, *Lactobacillus brevis* y *Gluconobacter oxydans*, a una concentración de [REDACTED]. Para los estudios realizados en los *Capítulos 5 y 6*, se utilizó cerveza sin pasteurizar del mismo lote de fabricación en ambos tratamientos, UHPH y pasteurización térmica.

### 3.2. Tratamientos de cerveza

#### 3.2.1. Homogenización a ultra alta presión

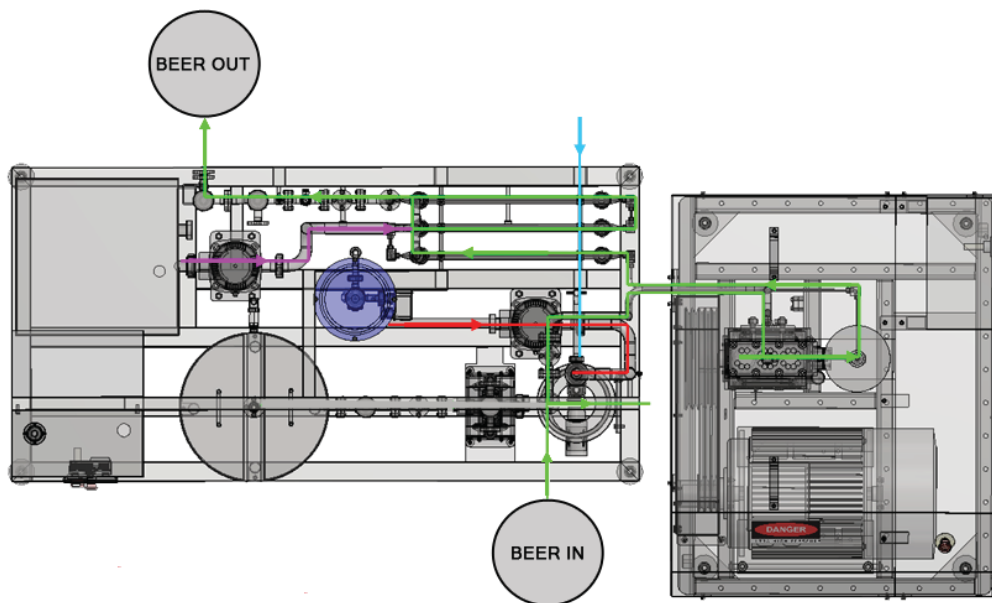
Los tratamientos de homogenización a ultra alta presión (UHPH) se realizaron con dos equipos diferentes, uno a escala laboratorio (Benchtop) y el otro a escala piloto. Para el estudio realizado en el *Apartado 4.1 (Capítulo 4)*, se utilizó el equipo Benchtop y para los estudios realizados en el *Apartado 4.1 (Capítulo 4)*, *Capítulo 5* y *Capítulo 6* se utilizó el equipo piloto.

##### 3.2.1.1. UHPH (Benchtop)

Cerveza pasteurizada y previamente descarbonatada fue tratada con un homogeneizador de alta presión Benchtop (modelo FPG12500, Stansted Fluid Power Ltd., UK) a un caudal de 15 L/h. El equipo consta de dos intensificadores impulsados por una bomba hidráulica y una válvula de alta presión de cerámica. En todos los tratamientos, las temperaturas de entrada y de salida de la cerveza se controlaron mediante dos intercambiadores de calor, situados antes de la entrada al equipo UHPH y justo a la salida de la válvula de alta presión. Durante los tratamientos, se monitorizó la presión, la temperatura de entrada, la temperatura después de la válvula de homogenización y la temperatura de salida mediante sondas. Para el estudio de inactivación microbiana, se realizaron tratamientos UHPH a presiones de homogenización de [REDACTED] a temperaturas de entrada de la cerveza de [REDACTED] (tiempo de tratamiento de 0,2 s), en duplicado. Las muestras de cervezas tratadas por UHPH se recogieron en recipientes estériles, en condiciones higiénicas bajo una campana de flujo laminar, en duplicado y fueron conservadas a 4 °C hasta el día siguiente, cuando se realizaron las siembras microbiológicas.

### 3.2.1.2. UHPH (equipo piloto)

Los tratamientos UHPH se realizaron con un equipo de 150 L/h, patentado por la Universidad Autónoma de Barcelona (EP2409583) y licitada para su explotación exclusiva a Ypsicon Advanced Technologies S.L. (Barcelona, Spain). La cerveza fue alimentada al equipo desde un tanque móvil (*beertank*) de 1.000 L (Duotank Beverage Solutions B.V, Waalre, The Netherlands), refrigerado a 1 °C y contrapresionado a 1,5 bar, que evitó la descarbonatación del producto durante su trasiego. La cerveza fue alimentada al equipo UHPH sin usar su depósito de alimentación original, según representado en la Figura 3.1, para poder garantizar su trasiego en condiciones anaeróbicas y a contrapresión. El equipo UHPH consta de un motor eléctrico que mediante un cigüeñal mueve a 3 pistones (igual que el motor de explosión de un vehículo) impulsando a presión el fluido (cerveza) contra una válvula de alta presión de carburo de tungsteno. En todos los tratamientos, las temperaturas de entrada y de salida de la cerveza se controlaron mediante dos intercambiadores de calor situados a la entrada del equipo UHPH e inmediatamente después de la válvula de alta presión. Todos los tratamientos se realizaron en duplicado, a una presión [REDACTED] MPa y a una temperatura de entrada de la cerveza de [REDACTED] (tiempo de tratamiento de 0,2 s). Durante la duración de los tratamientos, se monitorizó constantemente la presión, la temperatura de entrada, la temperatura después de la válvula de homogenización y la temperatura de salida mediante sondas, cuyas determinaciones fueron registradas digitalmente. Para el estudio microbiológico del *Apartado 4.2 (Capítulo 4)*, se recogieron muestras de las cervezas tratadas en duplicado, en recipientes estériles (500 mL) bajo condiciones higiénicas y se conservaron a 4 °C hasta el día siguiente, cuando se realizaron las siembras microbiológicas. Para el *Capítulo 5 y 6*, la cerveza tratada fue envasada directamente en barriles Keykeg® de 30 L (OneCircle, Den Helder, The Netherlands), en duplicado y a una contrapresión controlada de 1,2 bar, que evitó la formación de espuma y aseguró su correcto llenado en condiciones anaeróbicas. Para cada tratamiento, se recogió un volumen de 60 L, por lo cual se garantizó la homogeneidad del producto obtenido.



**Figura 3.1.** Sección del equipo UHPH con el flujo de cerveza (color verde) desde que entra hasta que sale del equipo (Ypsicon Advanced Technologies S.L.).

### 3.2.2. Pasteurización térmica

Las cervezas envasadas en botellas fueron pasteurizadas térmicamente en un equipo HT205 *Spray Pasteurizer* (OMVE, De Meern, Países Bajos). El equipo roció constantemente agua sobre las botellas a una temperatura y durante un tiempo definido según las unidades de pasteurización (UP) programadas. El agua es recirculada hacia un depósito interno, donde es calentada con un calentador eléctrico para seguir usándose para rociar las botellas. Se realizaron tratamientos térmicos de 15 UP a temperatura máxima de 60 °C, valor típico para cerveza *pilsner* y *lager*, según recomendado en *EBC Analytica, 2.1.4. Pasteurisation*, (2011). El software calculó las UP aplicadas según la Ecuación 2.1 y las UP empezaron a acumularse a partir de una temperatura de 50 °C. Una vez alcanzada las 15 UP, el equipo refrigeró las botellas con el rocío de agua fría. La temperatura fue monitorizada por una sonda térmica insertada en una botella control.

### 3.3. Envasado, almacenamiento y envejecimiento acelerado de las cervezas tratadas

Para los *Capítulos 5, 6, 8 y 9*, los barriles de cerveza obtenidos fueron envasados en botellas de vidrio color ámbar estériles (330 mL) y con tapones corona estériles mediante una llenadora semiautomática Carbo-Fill modleo CF210 (OMVE, De Meern, Países Bajos), que garantizó un envasado anaeróbico. Después del llenado, se comprobó el contenido de oxígeno de 3 botellas al

azar para validar el correcto envasado (<0,1 ppm O<sub>2</sub>). Una vez envasadas en botellas, las cervezas se conservaron a ≤ 4°C para los análisis correspondientes del producto recién tratado, mientras que las demás botellas se almacenaron bajo condiciones de envejecimiento acelerado (35 °C) y protegidas de la luz durante 3 meses. Cada mes se analizaron 2 botellas diferentes de cada tratamiento (n = 4), abriéndolas justamente en el momento previo al análisis.

### **3.4. Caracterización microbiológica, fisicoquímica, oxidativa y sensorial de las cervezas**

La caracterización microbiológica, fisicoquímica, oxidativa y sensorial de todas las cervezas obtenidas se realizó de acuerdo con los procedimientos y métodos analíticos estandarizados internacionalmente por la *European Brewery Convention* (EBC) y la *American Society of Brewing Chemists* (ASBC), reconocidos y empleados comúnmente por la industria cervecera.

#### **3.4.1. Análisis microbiológicos**

Para el estudio realizado en el *Apartado 4.1 (Capítulo 4)*, el recuento microbiológico se realizó mediante siembras por superficie (*EBC Analytica, 2.3.3.2. Surface spread plating technique, 2011*), por duplicado como mínimo. A partir de las cervezas obtenidas, se prepararon las diluciones decimales requeridas en solución Ringer (*EBC Analytica, 2.3.1 Dilution of samples, 2011*). Para los estudios realizados en el *Apartado 4.2 (Capítulo 4)*, se realizó mediante siembras por filtración (*EBC Analytica, 2.3.2.1. Laboratory membrane filtration technique, 2011*), por duplicado como mínimo. Todas las siembras e incubaciones se realizaron según:

- Recuento de *S. pastorianus* en medio selectivo WL nutritivo (Oxoid, Hampshire, UK), incubado durante a 3 - 5 días a una temperatura de 28 °C en un recipiente en atmosfera de anaerobiosis (7 – 15 % CO<sub>2</sub>), generada con sobres AnaeroGen (Oxoid, Hampshire, UK) (*EBC Analytica, 4.2.5.2. Heat differentiation, 2011*).
- Recuento de *L. brevis* en medio selectivo RakaRay (Oxoid, Hampshire, UK) incubado durante 3 días a una temperatura de 28 °C en un recipiente en atmosfera de anaerobiosis (7 – 15 % CO<sub>2</sub>), generada con sobres AnaeroGen (Oxoid, Hampshire, UK) (*EBC Analytica, 4.2.4.2. Lactobacillus and Pediococcus, 2011*).
- Recuento de *G. oxydans* en medio selectivo WL nutritivo (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), incubado durante 3 días a una temperatura de 28 °C (*EBC Analytica, 4.3.2.1. General aerobic count on beer, 2011*).



### **3.4.2. Determinación de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>**

El contenido de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> disuelto de las cervezas envasadas en botella se determinó mediante un sensor óptico según descrito en EBC method 9.37.1. El sistema consistió en un equipo de llenado PFD (Plus) conectado a un dispositivo analizador CBOX QC At-Line mediante un tubo conector (6 mm/4mm) con un filtro (4 mm) en línea (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Los resultados fueron expresados en ppb de O<sub>2</sub> y en g/L de CO<sub>2</sub>.

### **3.4.3. Compuestos amargos**

Los compuestos amargos, principalmente iso- $\alpha$ -ácidos, de las cervezas obtenidas se determinaron según descrito en *EBC Analytica, 9.8 Bitterness Units (BU) of Beer (IM)* (2020). Las cervezas fueron previamente descarbonatadas y acidificadas y, posteriormente, las sustancias amargas fueron extraídas con iso-octano. Después de centrifugarlas, la absorbancia de la fracción de iso-octano fue medida a 275 nm, en comparación a una muestra control de iso-octano puro. Los resultados se expresaron en unidades internacionales de amargor (IBU, de sus siglas en inglés).

### **3.4.4. Capacidad de retención de la espuma**

La capacidad de retención de la espuma, también conocida como estabilidad de la espuma, se determinó mediante un dispositivo generador de espuma Inpack 2000 Flasher y un equipo analizador NIBEM-T (Haffmans, Venlo, The Netherlands), según descrito en *EBC Analytica, 9.42.1 Foam stability of beer using the Nibem-T meter* (2004). El equipo midió el tiempo de colapso de la espuma durante una distancia de 30 mm, tras una espera de 10 mm, a una temperatura de 20 °C. Los resultados se expresaron en segundos.

### **3.4.5. Turbidez coloidal**

La turbidez coloidal de las cervezas se determinó mediante un turbidímetro Haffmans Vos Rota (Haffmans, Venlo, The Netherlands), según descrito en *EBC Analytica, 9.29 Haze in beer: calibration of haze meters* (2015). Previamente a los análisis, las cervezas fueron atemperadas a 20 °C y desgasificadas mediante agitación. El equipo midió la luz reflejada por las partículas en suspensión, en dirección perpendicular, a un ángulo 90° y a un ángulo de 25° respecto a la luz incidente. Los resultados se expresaron en unidades EBC.

### **3.4.6. Color**

El color de las cervezas se determinó mediante espectrofotometría UV/Vis, según descrito en *EBC Analytica, 9.6 Colour of beer: spectrophotometric method (IM)* (2000). Previamente a los análisis, las cervezas fueron atemperadas a 20 °C, desgasificadas mediante agitación y, en caso

necesario, filtradas (0,45  $\mu\text{m}$ ). Las lecturas de color se realizaron a 430 nm frente a un blanco de agua destilada. Los resultados se expresaron en unidades EBC.

### 3.4.7. Potencial de formación de radicales y potencial antioxidante endógeno

El potencial de formación de radicales (T400) y el potencial antioxidante endógeno (EAP, de sus siglas en inglés) de las cervezas se determinaron mediante un espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica (EPR, de sus siglas en inglés) Bruker Biospin e-scan, (Bruker Biospin, Alemania), según descrito en *ASBC Methods of Analysis. Beer 46. Measurement of Oxidative Resistance in Beer by Electron Paramagnetic Resonance* (2011) y por Kunz & Mesasuring (2012). Las cervezas previamente desgasificadas se sometieron a condiciones de envejecimiento acelerado (60 °C) y, mediante la reacción con el reactivo  $\alpha$ -(4-Piridil-1-oxi)-N-tert-butilnitrona (POBN), se provocó la formación de radicales, cuya intensidad de señal fue medida por el equipo EPR. Los valores de T400 y EAP se calcularon a partir de la curva ajustada a los datos obtenidos (según la ecuación de Boltzmann). Inicialmente, la formación de radicales es retrasada durante un tiempo por la actividad antioxidante endógena de la cerveza, lo que definió el valor de EAP. Cuando se consumen los antioxidantes, la señal EPR aumenta con la formación de radicales, cuya intensidad después de 400 min definió el valor de T400. Los resultados de T400 se expresaron en unidades de intensidad (U.I.) y los resultados de EAP, en minutos.

### 3.4.8. Anhídrido sulfuroso

El anhídrido sulfuroso de las cervezas se determinó por colorimetría con p-rosanilina mediante un analizador de flujo segmentado Skalar (Skalar Analytical B.V., Breda, The Netherlands), según descrito en *ASBC Methods of Analysis. Beer 21.Total Sulfur Dioxide* (2011). La cerveza previamente desgasificada se acidificó con ácido sulfúrico y se calentó a 9C, liberándose anhídrido sulfuroso que reacciona con p-rosanilina, para formar un complejo de color rojo, que se midió a una longitud de onda de 560 nm.

### 3.4.9. Determinación de la percepción sensorial

La percepción sensorial de cada compuesto previamente cuantificado (perfil volátil e indicadores de envejecimiento) se determinó mediante la Ecuación 3.1, según descrito por Meilgaard (1975) y Saison *et al.* (2009).

$$PS_x = C_x / US_x \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

Donde:  $PS_x$  = Percepción sensorial del compuesto x  
(unidades de sabor, FU, de sus siglas en inglés)  
 $C_x$  = Concentración del compuesto x (mg/L)

$US_x$  = Umbral sensorial del compuesto x (mg/L)

Para la comparación de los valores de percepción sensorial de dos cervezas diferentes, se siguió el criterio reportado por Meilgaard (1975) y Saison *et al.* (2009): una diferencia  $\Delta PS$  de 0,2 FU empieza a ser de interés, a partir de una diferencia  $\Delta PS$  de 0,5 FU la variación empieza a afectar el sabor de la cerveza, pero el degustador difícilmente identifica el compuesto o compuestos responsables, a partir de una diferencia  $\Delta PS$  de 1,0 FU el degustador puede identificar el compuesto responsable, y a partir de 2 FU el sabor de la cerveza se ve bastante alterado.

Cabe tener en cuenta que este parámetro se utilizó para predecir la contribución de cada compuesto sobre el sabor global de la cerveza, pero que los valores obtenidos son solamente indicadores, pues la sensibilidad de cada degustador para percibir un cierto compuesto puede variar considerablemente. Asimismo, la interacción entre los diferentes compuestos también puede alterar considerablemente sus umbrales sensoriales correspondientes.

#### **3.4.10. Degustaciones sensoriales**

Se realizaron pruebas de degustación triangular para determinar si existían diferencias significativas entre dos cervezas y pruebas de perfil descriptivo para identificar qué atributos contribuyeron significativamente a las diferencias detectadas, según descrito en *EBC Analytica, 13.3. Sensory analysis: (Guideline for) choice of method (IM)* (2012). Todas las degustaciones tuvieron lugar en un sala de degustaciones especialmente diseñadas para ello, libre de olores, a una temperatura ambiente controlada y con cabinas individuales para cada degustador, según descrito en *EBC Analytica, 13.2. Sensory analysis: tasting area, equipment, conduct of test* (2010). Los paneles sensoriales estuvieron compuestos por degustadores expertos entrenados que participan regularmente en análisis sensoriales de cerveza y cuya agudeza sensorial es periódicamente evaluada, según descrito en *EBC Analytica, 13.4. Sensory analysis: selection and training of assessors (IM) (AM)* (1997).

### **3. Pruebas de degustación triangular**

Las pruebas de degustación triangular de elección forzada se realizaron según descrito en la norma ISO4120 y *EBC Analytica, 13.7. Sensory analysis: triangle test* (2007). Consistieron en presentar 3 cervezas ordenadas y codificadas al azar con un número de 3 dígitos a cada degustador, dos de las cuales fueron iguales y una diferente. El evaluador tuvo que escoger qué cerveza era la diferente según su criterio. Las cervezas se presentaron en vasos rojos de manera que el evaluador no pudiese percibir diferencias de color, turbidez y espuma entre ellas. Las sesiones de degustación se realizaron con un mínimo de 18 degustadores.

#### **4. Pruebas de degustación de perfil descriptivo**

Las pruebas de degustación de perfil descriptivo se realizaron según descrito en la norma ISO13299 y *EBC Analytica, 13.10. Sensory analysis: description analysis (IM)* (1997). Ambas cervezas se presentaron individualmente. Los degustadores tuvieron que evaluar las cervezas de forma orthonasal y retronasal, puntuando del 1 al 9 la intensidad de un total de 14 atributos de olor y 19 atributos de gusto. Se evaluaron atributos descriptivos generales y típicos de cerveza (afrutado, lúpulo, DMS, cereal, malta, acetaldehído, dulzor, amargor, astringencia, cuerpo, persistencia) así como atributos descriptivos específicos comúnmente relacionados con el envejecimiento de las cervezas (caramelo, quemado, azufrados, vino/acético, rancio, metálico, papel, agrio). Las sesiones de degustación se realizaron con un mínimo de 10 degustadores.

#### **3.5. Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos en los *Capítulos 4, 5, 6 y 7* se trataron mediante análisis multifactoriales de varianza (ANOVA), utilizando el software estadístico Statgraphics Centurion XV (Statgraphics Inc., Chicago, IL, U.S.A.). Se aplicó la prueba de rangos múltiples (MRT, de sus siglas en inglés) utilizando el método de mínima diferencia significativa de Fisher (LSD, de sus siglas en inglés) para determinar diferencias significativas entre niveles de cada factor. Las evaluaciones se establecieron bajo un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los análisis de componentes principales (ACP) también se realizaron con el software estadístico Statgraphics Centurion XV (Statgraphics Inc., Chicago, IL, U.S.A.). Para el *Capítulo 6*, se realizó un ACP estandarizado. Para el *Capítulo 6* se realizó un ACP no estandarizado.

**Capítulo 4.** Inactivación microbiana de la homogenización a  
ultra altas presiones aplicada a cerveza





temperatura de entrada y de la presión de homogenización ( $r^2 = 97,2 \%$ ), tal y como se representa en Figura 4.1.

**Tabla 4.1.** Parámetros monitorizados durante los tratamientos UHPH: presión (P), temperatura de entrada ( $T_E$ ), temperatura de salida de la válvula ( $T_V$ ) y temperatura de salida de la cerveza ( $T_S$ ). Unidades de pasteurización térmica (UP) calculadas.

P (MPa) <sup>1</sup>	$T_E$ (°C) <sup>1</sup>	$T_V$ (°C) <sup>1</sup>	$T_S$ (°C) <sup>1</sup>	UP calculado <sup>2</sup>
± 7	16 ± 1	52 ± 1	10 ± 1	0,00
± 16	15 ± 1	63 ± 2	10 ± 1	0,01
± 11	15 ± 0	72 ± 2	8 ± 1	0,18
± 9	26 ± 1	62 ± 1	12 ± 4	0,01
± 13	25 ± 1	72 ± 1	13 ± 4	0,15
± 17	26 ± 1	82 ± 1	14 ± 4	4,90
± 14	52 ± 1	80 ± 1	12 ± 1	2,52
± 16	52 ± 1	89 ± 3	13 ± 2	49,83
± 13	53 ± 1	97 ± 1	12 ± 3	706,43

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4).

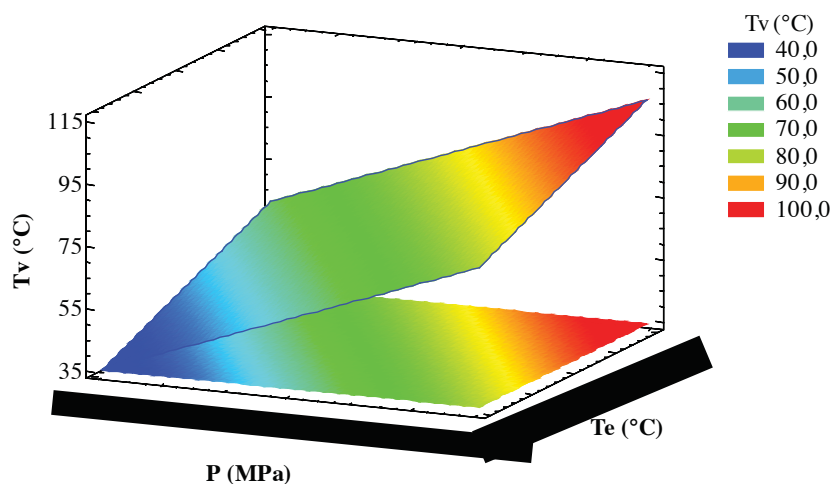
<sup>2</sup> UP calculada a partir de la Ecuación 3.1 ( $\Delta t = 0,2$  segundos).

$$T_V = 25,1608 + 0,185071 * P + 0,680724 * T_E \quad \text{(Ecuación 4.1)}$$

Donde:  $T_V$  = Temperatura a la salida de la válvula (°C)

$T_E$  = Temperatura de entrada (°C)

P = Presión (MPa)



**Figura 4.1.** Superficie de respuesta de la regresión lineal del incremento de la temperatura de la cerveza a la salida de la válvula ( $T_V$ ) en función de la temperatura de entrada ( $T_E$ ) y de la presión de homogenización (P).

Según esta regresión lineal, la temperatura en la válvula incrementó a una velocidad estimada de 18,5 °C/100 MPa, para una temperatura de entrada constante. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores que utilizaron el mismo equipo UHPH que en este estudio, es decir, con el mismo diseño de válvula de homogenización, para el tratamiento de cerveza y otras bebidas. En cerveza, Franchi *et al.* (2013) observaron un mayor incremento, de 21,7 °C/100 MPa, el cual puede atribuirse al mayor contenido de CO<sub>2</sub> de la cerveza utilizada en su estudio, que incrementa la turbulencia y calentamiento adiabático en la válvula de homogenización. Otros estudios han descrito incrementos de 16,6 – 24,2 °C/ 100 MPa durante el tratamiento de leches, licuados de soja, horchata y zumos (Amador-Espejo *et al.*, 2014; Codina-Torrella *et al.*, 2018; Hayes & Kelly, 2003; J. Liu *et al.*, 2018; Pereda *et al.*, 2007; Polisel-scopel *et al.*, 2012; Suárez-Jacobo *et al.*, 2010; Thiebaud *et al.*, 2003).

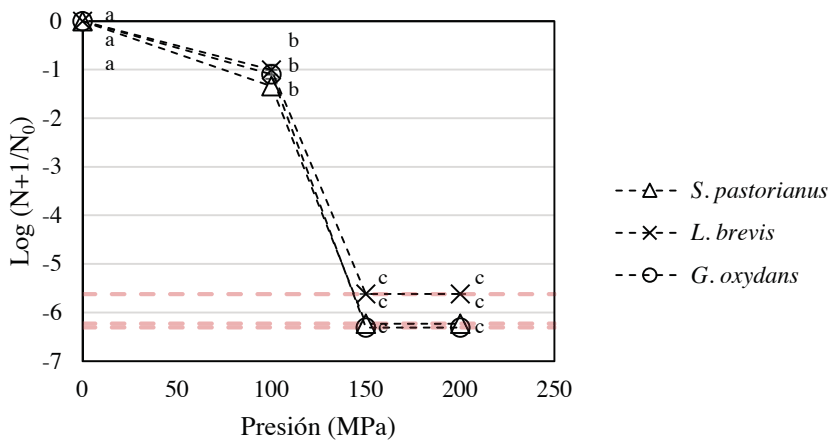
Después de pasar por la válvula de homogenización, la cerveza fue enfriada muy rápidamente (T<sub>s</sub>) mediante un intercambiador térmico, asegurando que estuviera a temperatura elevada durante un período de tiempo extremadamente corto (0,2 segundos) en comparación con los tiempos de tratamiento de la pasteurización térmica, minimizando así el efecto de la carga térmica aplicada. Teniendo en cuenta las temperaturas alcanzadas y un tiempo de tratamiento de 0,2 segundos, se calculó la equivalencia de la carga térmica aplicada durante los tratamientos equivalentes a unidades de pasteurización térmica (UP), según descrito por Vecchio *et al.* (1951). Estos valores demostraron que el efecto térmico de los tratamientos a temperatura de entrada de [REDACTED] y [REDACTED] fue insignificante (UP < 0,2), el de los tratamientos a temperatura de entrada [REDACTED] y [REDACTED] fue bajo (UP < 5 UP), mientras que el de los tratamientos a temperatura de entrada de [REDACTED] fue elevado (UP > 49 UP) en comparación con los tratamientos de pasteurización térmica convencionales, en los que se aplica ≥ 15 UP, según el tipo de cerveza (*EBC Analytica, 2.1.4. Pasteurisation*, 2011).

#### **4.1.1.2. Inactivación microbiana de la cerveza**

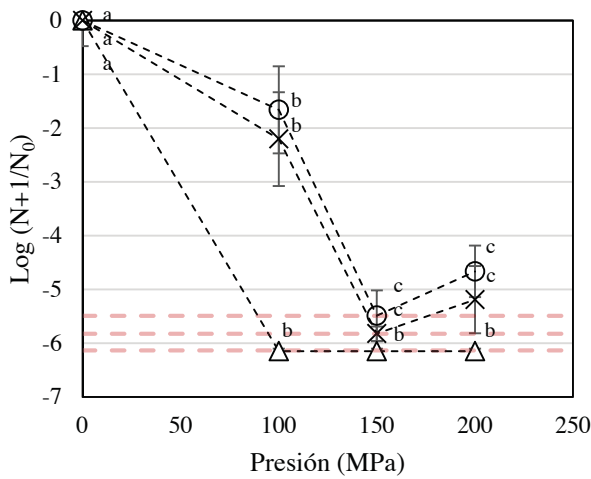
Las cervezas filtradas y pasteurizadas fueron parcialmente descarbonatadas (CO<sub>2</sub> = 0,8 – 1,4 g/L) e inoculadas con microorganismos aislados de una cervecería industrial, *S. pastorianus*, *L. brevis* y *G. oxydans*, a concentraciones del orden de 6 log (UFC/mL) para ser seguidamente tratadas con UHPH. Se realizaron tratamientos UHPH a diferentes temperaturas de entrada del producto (15, 25 y 50 °C) y a diferentes presiones de homogenización ([REDACTED]). La Figura 4.2 muestra los niveles de inactivación alcanzados con las diferentes condiciones ensayadas. Como se observa, el incremento de la presión de homogenización y de la temperatura de entrada del producto aumentó los niveles de inactivación microbiana, y las bacterias *L. brevis* y *G. oxydans* presentaron una mayor resistencia que la levadura *S. pastorianus*.



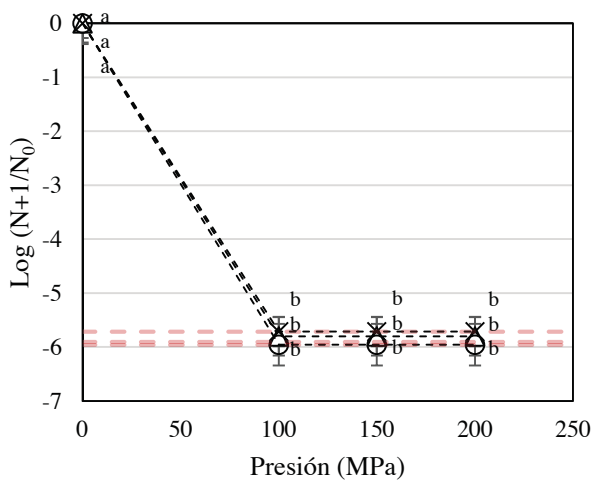
a)



b)



c)



**Figura 4.2.** Inactivación (media  $\pm$  desviación estándar, n = 4) de *Saccharomyces pastorianus*, *Lactobacillus brevis* y *Gluconobacter oxydans* en cerveza tratada con UHPH a diferentes presiones ( ) y a diferentes temperaturas de entrada de a) 15 °C, b) 25 °C y c) 50 °C.

a-c: Para cada microorganismo, diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos realizados a presiones de homogenización diferentes ( $p < 0,05$ ). La línea discontinua roja muestra el límite de inactivación, definido por la concentración inicial de cada microorganismo inoculado y por el límite de detección (0,5 UFC/ mL).

En concreto, a una temperatura de entrada de la cerveza de 15 °C se requirieron presiones de homogenización de [REDACTED] para alcanzar el nivel máximo de inactivación de todos los microorganismos (ca. 6 log UFC/ml), mientras que presiones de [REDACTED] MPa inactivaron solamente ca. 1 log UFC/mL, sin observarse diferencias significativas entre microorganismos (Figura 4.2a). Al aumentar la temperatura de entrada de la [REDACTED] C, presiones de [REDACTED] también inactivaron todos los microorganismos y, además, los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa alcanzaron la inactivación máxima de *S. pastorianus* ( $6,15 \pm 0,04$  log UFC/mL), mientras que las bacterias *L. brevis* y *G. oxydans* mostraron una resistencia significativamente mayor, pues cuya concentración disminuyó  $2,21 \pm 0,87$  y  $1,66 \pm 0,81$  log UFC/mL, respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre ellas (Figura 4.2b). Estudios previos de tratamientos de homogenización de leches vegetales, zumos y mostos de vino han descrito que las bacterias son más resistentes que las levaduras, pero no se debe generalizar, pues es muy dependiente del microorganismo y de las condiciones del ensayo (Loira *et al.*, 2018; Zamora & Guamis, 2014). Los tratamientos UHPH de cerveza reportados por Franchi *et al.* (2013) demostraron que aquellos microorganismos previamente aislados de cerveceras (*Lactobacillus delbrueckii*, *Pediococcus sp.* y *Saccharomyces ludwigii*) resultaron estar mejor adaptados y fueron más resistentes que los obtenidos de colecciones de cultivos de laboratorio (*Lactobacillus brevis*, *Acetobacter aceti* y *Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus*). El presente estudio, que utilizó solamente microorganismos aislados de una cervecera, demostró que las bacterias *L. brevis* y *G. oxydans* son más resistentes que la levadura *S. pastorianus*.

A elevadas temperaturas de entrada de 50 °C se alcanzó la inactivación máxima de todos los microorganismos ensayados (ca. 6 log CFU/ml), sin observarse diferencias significativas entre ellos e independientemente de la presión aplicada, [REDACTED] (Figura 4.2c). Cabe destacar que los tratamientos UHPH a  $T_E = 50$  °C generaron una carga térmica equivalente a 2,52 UP ([REDACTED] MPa), 49,83 UP ([REDACTED]) y 706,43 UP ([REDACTED]), por lo cual el efecto de la presión y demás fenómenos de inactivación microbiana (fuerzas de impacto, cizalla, turbulencia y cavitación) no pudo ser desvinculado del efecto térmico, causado por el incremento de temperatura en la válvula de homogenización. Los tratamientos de pasteurización térmica convencional han demostrado inactivar los microorganismos de la cerveza a 1 – 6 UP (Vecchio *et al.*, 1951; Zufall *et al.*, 2000), e incluso en un estudio más reciente, Rachon *et al.* (2018) reportaron que 1 UP es suficiente para alcanzar 6 reducciones logarítmicas de *L. brevis* (cepa aislada de cervecera), el microorganismo identificado como el más termo-resistente entre todos los ensayados (*Gluconobacter oxydans*, *Gluconacetobacter saccharivorans*, *Acetobacter pasteurianus*, *Kocuria kristinae*, *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter kobei*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus cerevisiae*,

*Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus damnosus*). En este sentido, el efecto térmico de los tratamientos UHPH a [REDACTED] pudo haber sido suficiente para alcanzar la inactivación microbiana de la cerveza. De hecho, las cervezas tratadas a [REDACTED] serían equivalentes a productos considerados sobre-pasteurizados térmicamente (> 45 UP), pues la *European Brewery Convention* (EBC) recomienda un máximo 25 UP para cervezas *lager* y *pilsner* (EBC Analytica, 2.1.4. Pasteurisation, 2011).

En el presente estudio se alcanzaron los niveles máximos de inactivación tanto a temperaturas de entrada bajas ([REDACTED]) y presiones de homogenización altas ([REDACTED]) como a una temperatura de entrada elevada ([REDACTED]) y a una presión menor ([REDACTED]). De manera similar, Franchi *et al.* (2013) también demostraron poder reducir la presión de homogenización de [REDACTED] MPa a [REDACTED] – [REDACTED] MPa aumentando la temperatura de entrada de la cerveza a [REDACTED] °C. No obstante, con el objetivo de reducir más de 10 veces la carga térmica aplicada durante los tratamientos UHPH, se sugiere trabajar a una temperatura de entrada de [REDACTED] °C y presión de 150 – 250 MPa, equivalente a una carga térmica de 0,01 – 0,18 UP, en vez de a una temperatura de entrada de 50 °C y presión de [REDACTED] MPa, equivalente a 2,52 UP. A estas condiciones ([REDACTED]), los tratamientos UHPH presentarían ventajas frente a la pasteurización térmica convencional, ya que minimizan el daño térmico causado sobre el producto (< 0,2 UP).

Por otro lado, los tratamientos UHPH también presentaron ventajas en comparación con la tecnología HHP. Varios estudios han reportado el efecto de la tecnología HHP sobre cerveza sintética (Fischer *et al.*, 2006; Gänzle *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 2000, 2002), cervezas *lager* (Buzrul *et al.*, 2005b), *pale ale*, *mild ale* (Castellari *et al.*, 2000) y de trigo (Yin *et al.*, 2016). En todos los casos, los tratamientos HHP requirieron presiones más elevadas (350 – 600 MPa) y tiempos de homogenización mayores (3 – 15 min) para reducir el número de células vegetativas de levaduras salvajes, bacteria lácticas, acéticas y aeróbicas (Tabla 2.5, Capítulo 2) que los tratamientos UHPH, según los resultados del presente estudio, así como los descrito por Franchi *et al.* (2013). Probablemente debido al efecto de las fuerzas de homogeneización (cizalla, turbulencia y cavitación) generados por la tecnología UHPH, además de las altas presiones. Cabe destacar que la tecnología UHPH no solamente permite reducir los tiempos de tratamiento y la presión de homogenización, sino que también permite operar en continuo, factor que favorecen su implantación en procesos industriales.

#### 4.1.2. Aplicación de la tecnología UHPH a escala piloto

Con el objetivo de evaluar la tecnología UHPH a mayor escalado, se realizaron tratamientos de cerveza a escala piloto, a un caudal de 150 L/h (Ypsicon Advanced Technologies S.L.). En esta ocasión, se partió de cerveza filtrada sin pasteurizar y, debido a los resultados obtenidos a escala laboratorio, se priorizó trabajar a temperaturas de entrada bajas ( $T_E = 6\text{ °C}$ ) y a un rango de presiones que alcanzara presiones elevadas (150 – 300 MPa), condiciones que no pudieron ser previamente ensayadas a escala laboratorio. Además, la cerveza fue tratada con sus niveles de carbonatación originales (*ca.* 5 g/L CO<sub>2</sub>), incluso a presiones elevadas, sin requerir una descarbonatación previa, hecho que no había sido demostrado técnicamente viable con anterioridad según la revisión bibliográfica.

##### 4.1.2.1. Incremento de temperatura de la cerveza en la válvula de homogenización

La Tabla 4.2 presenta el seguimiento de la temperatura de entrada de la cerveza antes de la válvula de homogenización ( $T_E$ ), la temperatura después de haber pasado por la válvula de homogenización ( $T_V$ ), la temperatura a la salida del equipo ( $T_S$ ), así como la carga térmica aplicada calculada en unidades de pasteurización (UP), para las diferentes presiones ensayadas a escala piloto. Como se observa, el equipo piloto permitió operar a presiones más precisas que a escala laboratorio, ya que se obtuvieron desviaciones estándar ( $\leq 1$ ) menores que a escala laboratorio ( $\leq 17$ ).

**Tabla 4.2.** Parámetros monitorizados durante los tratamientos UHPH a escala piloto: presión (P), temperatura de entrada ( $T_E$ ), temperatura de salida de la válvula ( $T_V$ ) y temperatura de salida de la cerveza ( $T_S$ ). Unidades de pasteurización térmica (UP) calculadas.

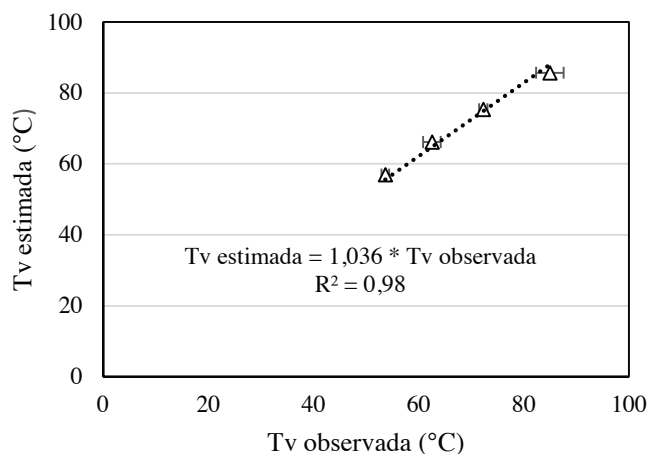
P (MPa) <sup>1</sup>	$T_E$ (°C) <sup>1</sup>	$T_V$ (°C) <sup>1</sup>	$T_S$ (°C) <sup>1</sup>	UP calculado <sup>2</sup>
302 ± 1	7 ± 1	85 ± 2	16 ± 1	12,85
251 ± 1	6 ± 1	72 ± 1	16 ± 1	0,19
201 ± 1	6 ± 1	63 ± 2	16 ± 1	0,01
154 ± 1	5 ± 1	54 ± 1	15 ± 1	0,00

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4).

<sup>2</sup> UP calculada a partir de la Ecuación 3.1 ( $\Delta t = 0,2$  segundos).

Durante los diferentes tratamientos UHPH, la temperatura de la cerveza en la válvula ( $T_V$ ) incrementó acorde con lo esperado. La Figura 4.3 muestra la temperatura de la válvula observada durante los tratamientos a escala piloto en comparación con la temperatura de la válvula estimada según el modelo descrito previamente a escala laboratorio (Ecuación 4.1). A pesar de que a escala piloto la cerveza se trató a condiciones fuera del rango evaluado a escala laboratorio, se obtuvo

una desviación muy baja (3,6 %) y una correlación  $r^2 = 0,98$ . Esta ligera desviación se podría atribuir tanto a las características de los equipos, que difieren entre ellos en el diseño (geometría y materiales) de la válvula de homogenización, como a las de la cerveza tratada, ya que a escala laboratorio tuvo que ser previamente descarbonatada.



**Figura 4.3.** Correlación entre la temperatura de la válvula ( $T_v$ ) observada en los tratamientos UHPH (150, 200, 250 y 300 MPa) a escala piloto ( $n = 2$ ) y la estimada con el modelo descrito a escala laboratorio (Ecuación 4.1). Las barras representan la desviación estándar de las  $T_v$  observadas.

#### 4.1.2.2. Inactivación microbiana

En la industria cervecera, la cerveza filtrada sin pasteurizar puede llegar a presentar niveles de microorganismos no deseados considerablemente bajos, ya sean células de levadura residuales procedentes de la fermentación o bien microorganismos contaminantes. Típicamente, las especificaciones de cerveza filtrada antes de la pasteurización se establecen en  $2 \log$  UFC/100 mL, es decir, 2 log UFC/100 mL (Fricker, 1984). No obstante, actualmente acostumbran a presentar niveles incluso no detectables, debido al intenso proceso de ebullición empleado durante la fabricación del mosto y a las estrictas buenas prácticas de limpieza empleadas durante todas las etapas del proceso de fabricación de la cerveza. Con el objetivo de asegurar un mínimo de microorganismos presentes a concentraciones potencialmente reales, *S. pastorianus*, *L. brevis* y *G. oxydans* fueron previamente inoculados a concentraciones de  $2,82 \pm 0,43$ ,  $3,32 \pm 0,09$  y  $2,17 \pm 0,14$  log UFC/100 mL, respectivamente. La Tabla 4.3 muestra las concentraciones de microorganismos finales presentes en las cervezas tratadas a  $300$  MPa, determinadas mediante siembras por filtración (UFC/100 mL).

**Tabla 4.3.** Población microbiana (log UFC/100 mL) de cervezas tratadas con UHPH a presiones diferentes ( ) y a una temperatura de entrada de 6 °C.

Tratamiento	Microorganismos (log UFC/100 mL) <sup>1</sup>		
	<i>S. pastorianus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>G. oxydans</i>
	2,82 ± 0,43 <sup>a</sup>	3,32 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,14 <sup>a</sup>
	1,37 ± 1,13 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,40 <sup>b</sup>
	0,19 ± 0,24 <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>
	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	ND <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4)

**ND:** No detectada (< 0,18 log UFC/100 mL)

**a-c:** Valores en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En las cervezas tratadas a , se observó crecimiento de todos los microorganismos (*S. pastorianus*, *L. brevis* y *G. oxydan*), aunque a concentraciones similares o inferiores a <100 UFC/100 mL. En las cervezas tratadas a , se observó crecimiento de *S. pastorianus* (< 1 UFC/100 mL), mientras que *L. brevis* y *G. oxydans* no fueron detectados. A escala de laboratorio, los tratamientos a 150 – 200 MPa habían alcanzado niveles máximos de reducción (ca. 6 log UFC/mL), independientemente de la temperatura de entrada de la cerveza ( ). Se desconoce si la detección de crecimiento microbiano a escala piloto fue debida a la disminución del límite de detección, de 0,5 UFC/mL a 0,5 UFC/100 mL, mediante el uso de siembras por filtración o porque el efecto de los tratamientos UHPH fue significativamente menor al disminuir la temperatura de entrada, de 15 a 6 °C, y consecuentemente, la temperatura en la válvula, de 63 a 54 (150 MPa) y de 72 a 63 (200 MPa). Aunque cabe destacar que las diferencias de carga térmica aplicada entre los tratamientos a temperaturas de entrada de 6 °C y a 15 °C (0,00 y 0,01 UP, respectivamente, a ; 0,01 y 0,18 UP, respectivamente, ) pueden ser consideradas insignificantes. Por otro lado, en las cervezas tratadas a 300 MPa no se detectó crecimiento de ningún tipo de microorganismo (< 0,5 UFC/100 mL). No obstante, a parte del efecto causado por la presión y demás fenómenos de inactivación generados en los tratamientos UHPH, la letalidad observada no pudo desvincularse del factor temperatura. Los tratamientos a causaron el incremento de la temperatura de la cerveza hasta los 85°C, acumulando una carga térmica de 12,85 UP, a pesar de haber partido de una temperatura de 6 °C.

Estos resultados demostraron que los tratamientos UHPH ( ) permitieron obtener cervezas con niveles microbiológicos < 1 UFC/mL. La selección de la presión de homogenización más adecuada ( ) dependerá de las exigencias de las normas de calidad establecidas por cada empresa fabricante de cerveza, tanto a nivel microbiológico (< 1 UFC/100 mL o < 0,5 UFC/100 mL, respectivamente) como respecto a la carga térmica aplicada

(0,01 o 12,85 UP, respectivamente). Una carga térmica excesiva puede favorecer el desarrollo de reacciones no deseadas que afecten negativamente a las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la cerveza. En este sentido, la selección del tratamiento más adecuado supone siempre un compromiso entre extender la vida útil de la cerveza y la calidad de ésta, la cual se evaluará y discutirá en los capítulos siguientes.

## 4.2. Conclusiones

Los resultados obtenidos a escala de laboratorio demostraron que la eficacia de los tratamientos UHPH para la inactivación microbiana dependió de la presión de homogenización, de la temperatura de entrada del producto y del tipo de microorganismo. El incremento de la presión de homogenización y de la temperatura de entrada del producto aumentó los niveles de inactivación microbiana. La bacteria aerobia *G. oxydans* y la bacteria láctica *L. brevis* presentaron una mayor resistencia que la levadura *S. pastorianus*.

Se logró alcanzar reducciones microbianas de *ca.* 6 log UFC/mL e inactivar todos los microorganismos evaluados a presiones de homogenización  $\geq$  [REDACTED] a, para un rango de temperaturas de [REDACTED], y a presiones  $\geq$  [REDACTED] MPa al incrementar la temperatura de entrada a [REDACTED]. A estas condiciones de operación se demostró que los tratamientos UHPH a menor temperatura de entrada ([REDACTED]) permiten reducir más de 10 veces la carga térmica aplicada ( $< 0,2$  UP) en comparación con los tratamientos UHPH a una temperatura de entrada de [REDACTED] ( $> 2,5$  UP).

Los tratamientos a escala piloto demostraron la viabilidad de la tecnología UHPH para el tratamiento de cerveza carbonatada. Se demostró que los tratamientos UHPH a 150 MPa ( $T_E$  [REDACTED] °C) no fueron suficientes para inactivar todos los microorganismos. En cambio, se validó la eficacia de los tratamientos UHPH [REDACTED], que inactivaron la población microbiana hasta niveles de  $< 1$  UFC/100 mL, y de los tratamientos UHPH [REDACTED], que permitieron obtener cerezas sin microorganismos ( $< 0,5$  UFC/100 mL).

**Capítulo 5.** Efecto de la homogenización a ultra alta presión sobre la estabilidad fisicoquímica y oxidativa de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica convencional





## 5.1. Resultados y discusión

### 5.1.1. Estabilidad de las propiedades fisicoquímicas de las cervezas tratadas

En el presente estudio se comparó el efecto de la homogenización a ultra alta presión (UHPH) a varias presiones de operación ( ) con el efecto de la pasteurización térmica (15 UP) sobre las propiedades fisicoquímicas de la cerveza. Para ello, se evaluaron los parámetros de color, compuestos amargos, capacidad de retención de espuma y turbidez coloidal (turbidez a 90° y 25°) inmediatamente después de la aplicación de cada tratamiento ( $t_0$ ). Además, también se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la estabilidad de estos parámetros durante el envejecimiento acelerado a 35°C de las cervezas, establecido en 3 meses, realizando las determinaciones analíticas mensualmente ( $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ). Así, el efecto de ambos factores, tipo de tratamiento y tiempo de envejecimiento acelerado, sobre todos los parámetros fisicoquímicos pudo ser determinado estadísticamente mediante un análisis ANOVA multifactorial. Como se muestra en la Tabla 5.1, tanto el tipo de tratamiento como el tiempo de envejecimiento presentaron efecto significativo sobre todos los parámetros estudiados ( $p < 0,01$ ), lo cual se discutirá en los apartados siguientes.

**Tabla 5.1.** Efecto del tipo de tratamiento (pasteurización térmica a 15UP, homogenización a ultra alta presión a ) y tiempo de envejecimiento acelerado (3 meses a 35°C) sobre los parámetros físicoquímicos de las cervezas obtenidas, según el ANOVA multifactorial.

Parámetros fisicoquímicos	Efecto de los factores (valor p)		
	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento*Tiempo
Compuestos amargos	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***
Capacidad de retención de espuma	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***
Turbidez a 90°	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***
Turbidez a 25°	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***
Color	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***

\*\* valor  $p < 0,05$

\*\*\* valor  $p < 0,01$

#### 5.1.1.1. Compuestos amargos

Los principales compuestos amargos presentes en cerveza son los iso- $\alpha$ -ácidos, procedentes de la isomerización de los  $\alpha$ -ácidos del lúpulo durante la fase de ebullición del mosto cervecero. El

amargor de la cerveza se mide en unidades de amargor internacional (IBU, de sus siglas en inglés) y representa la concentración de iso- $\alpha$ -ácidos disueltos en la cerveza en mg/L.

Los resultados de las determinaciones de amargor (en IBU, equivalente a mg/L de iso- $\alpha$ -ácidos) de las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] y pasteurizadas térmicamente se muestran en la Tabla 5.2. Como se observa, inicialmente, las cervezas recién tratadas ( $t_0$ ) con la tecnología UHPH a [REDACTED] presentaron los mismos niveles de amargor que las cervezas pasteurizadas térmicamente, sin apreciarse diferencias significativas entre ellas. En cambio, se observaron niveles de amargor significativamente menores en cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] ( $p < 0,05$ ). El efecto de la tecnología UHPH sobre el perfil amargo de la cerveza no ha sido descrito previamente en otros estudios, pero sí que existen referencias sobre el efecto de la tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP). Buzrul *et al.* (2005a) demostraron que la cerveza pasteurizada térmicamente (60°C/ 15 min, 15 UP) presentaba niveles de amargor mayores que la cerveza tratada con HHP (200, 250 y 300 MPa/ 3 y 5 min). En cambio, en el estudio de Castellari *et al.* (2000), el amargor de cervezas tratadas mediante HHP (600 MPa/ 5 min) no se vio afectado en comparación con la pasteurización térmica (60°C, 10 min., 10 UP). Las diferencias observadas entre ambos estudios podrían ser dependientes del equipo utilizado, las condiciones de operación y el tipo de cerveza.

**Tabla 5.2.** Estabilidad de los compuestos amargos de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH [REDACTED], UHPH a [REDACTED] y UHPH a [REDACTED] durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C).

Compuestos amargos de las cervezas tratadas (IBU) <sup>1</sup>				
Tratamiento	Tiempo de envejecimiento acelerado a 35 °C (meses)			
	$t_0$	$t_1$	$t_2$	$t_3$
[REDACTED]	28 ± 0 <sup>a, A</sup>	27 ± 1 <sup>a, B</sup>	24 ± 0 <sup>a, B</sup>	23 ± 0 <sup>a, D</sup>
[REDACTED]	28 ± 1 <sup>a, A</sup>	24 ± 0 <sup>b, B</sup>	21 ± 0 <sup>b, C</sup>	20 ± 0 <sup>b, D</sup>
[REDACTED]	28 ± 0 <sup>a, A</sup>	24 ± 1 <sup>b, B</sup>	23 ± 0 <sup>c, C</sup>	20 ± 1 <sup>b, D</sup>
[REDACTED]	27 ± 1 <sup>b, A</sup>	24 ± 1 <sup>b, B</sup>	22 ± 1 <sup>c, C</sup>	20 ± 1 <sup>b, D</sup>

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4)

**a-b:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna ( $p < 0,05$ )

**A-C:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila ( $p < 0,05$ )

### *Estabilidad de los compuestos amargos durante el envejecimiento de las cervezas*

Inicialmente, solamente los tratamientos UHPH [REDACTED] afectaron a los niveles de amargor de las cervezas. No obstante, durante los tres meses de envejecimiento acelerado, también se obtuvieron valores significativamente inferiores en cervezas tratadas mediante UHPH a [REDACTED] MPa (Tabla 5.2), evidenciando que todos los tratamientos UHPH ([REDACTED]) comprometieron la estabilidad del perfil amargo, favoreciendo la disminución de los compuestos amargos de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica.

Los resultados observados fueron similares a los descritos por otros autores con la tecnología HHP, que demostraron que la pasteurización térmica provocaba una menor pérdida de compuestos amargos que los tratamientos HHP en cervezas *lager* (Buzrul *et al.*, 2005b), *pale ale* y *mild ale* (Castellari *et al.*, 2000). Además, Buzrul *et al.* (2005b) observó que las cervezas tratadas con HHP presentaban un perfil amargo más estable al aumentar la intensidad del tratamiento aplicado. Las cervezas tratadas con HHP durante un tiempo de presurización de 3 min. perdieron más compuestos amargos (3,1 IBU) que las tratadas con HHP a 5 min. (2,12 IBU), mientras que en cervezas pasteurizadas térmicamente (60°C, 15 min.) disminuyeron 1,4 IBU, durante su envejecimiento (56 días a 20°C durante).

La pérdida de compuestos amargos durante el envejecimiento de las cervezas ha sido ampliamente descrita por otros autores que demostraron que los iso- $\alpha$ -ácidos son sensibles a la degradación durante el envejecimiento de las cervezas, resultando en una disminución del amargor sensorial (Vanderhaegen *et al.*, 2006b). Las principales causas de la degradación de los iso- $\alpha$ -ácidos son la fotodegradación causada por la luz y la oxidación favorecida por la presencia de radicales libres; ambos mecanismos son acelerados a mayores temperaturas de almacenamiento. En este sentido, a mayor temperatura de tratamiento se esperaría mayor degradación. Resulta complejo interpretar las reacciones que ocurren durante la degradación de compuestos amargos debido a los diferentes tipos de compuestos y reacciones implicadas. Los iso- $\alpha$ -ácidos pueden ser de diferentes tipos (*cis*-isocohumulonas, *trans*-isocohumulonas, *cis*-isohumulonas, *trans*-isohumulonas, *cis*-isoadhumulonas y *trans*-isoadhumulonas.) y cada tipo de molécula se degrada a una velocidad diferente. En general, se ha demostrado que los isómeros *trans* sufren una degradación más severa que los isómeros en configuración *cis*, que son más estables durante el envejecimiento de la cerveza. Además, no todos los compuestos amargos están presentes en la misma concentración en la cerveza y tampoco aportan el mismo grado de amargor sensorial; las *cis/trans*-isohumulonas y *cis/trans*-isocohumulonas son en general las más abundantes en cervezas y, entre estos compuestos, los isómeros *cis* están considerados más amargos que los *trans* y las isohumulonas más que las isocohumulonas (Blanco *et al.*, 2014; Caballero *et al.*, 2012;

De Cooman et al., 2000; Kappler et al., 2010; Malfliet et al., 2008). Blanco *et al.* (2014) evaluaron la degradación de los compuestos amargos de 28 cervezas *pale lager* comerciales (pasteurizadas) y concluyeron que se degradaba un 50% de la *cis*-isocohumulona, el compuesto amargo más estable, en 42 días y un 50% de la *cis*-isohumulona, el compuesto amargo más abundante, en 33 días cuando se almacena la cerveza a 40 °C. Malfliet *et al.* (2008) determinaron en 9 cervezas *lager* que se perdía el 7 – 13% del amargor inicial (1,2 – 3,2 IBU) en 2 meses a 30 °C. De manera similar, Karabín *et al.* (2014) reportaron una pérdida del 9% del amargor inicial (2,8 IBU) en 1 mes, el 11% (3,2 IBU) en 2 meses y el 12 % (3,4 IBU), en 3 meses en cerveza almacenada a 30 °C. En este contexto, en el presente estudio se consideró que incluso las cervezas que presentaron el amargor menos estable, es decir, las tratadas con UHPH, perdieron cantidades de amargor considerablemente comunes, un 14,3% del amargor inicial (4 IBU) en 1 mes y el 28,6% del amargor inicial (8 IBU) en 3 meses a 35 °C, pues estos valores se encuentran entre los niveles reportados por otros estudios en cervezas evaluadas durante evoluciones bajo condiciones de temperatura similares (30 - 40 °C). Destacar que las diferencias de amargor observadas entre tratamientos UHPH y pasteurización térmica, que varían de 1 a 3 IBU, podrían no ser percibidas por los degustadores, como se evaluó en el *Capítulo 7*.

#### **5.1.1.2. Capacidad de retención de espuma**

La calidad de la espuma de las cervezas es comúnmente evaluada mediante la determinación de su capacidad de retenerse, es decir, capacidad de no colapsar. La capacidad de retención de la espuma se determinó mediante la medida del tiempo requerido para colapsar 30 mm de espuma (unidades Nibem30), por lo cual los valores más elevados correspondieron a cervezas con espumas más estables.

En la Tabla 5.3 se muestra la capacidad de retención de espuma de las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] y de las cervezas pasteurizadas térmicamente. Como se observa, inicialmente, en cerveza recién tratada ( $t_0$ ), las cervezas obtenidas con UHPH a [REDACTED] MPa presentaban la misma capacidad de retención de espuma que las cervezas pasteurizadas térmicamente. En cambio, las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] mostraron valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ). Además, entre las cervezas tratadas con UHPH, se observa una tendencia a perder capacidad de retención de espuma con el aumento de la presión aplicada.

El tiempo de retención de espuma de las cervezas depende de sus propiedades físicas y químicas. A nivel químico, depende de la presencia de moléculas de superficie activa, que contribuyen a la formación de una matriz más resistente al colapso. Las principales moléculas de superficie activa son polipéptidos (provenientes de los granos de malta) y ácidos amargos (provenientes

principalmente del lúpulo), debido a su carácter hidrofóbico. Entre los polipéptidos hidrofóbicos, los más abundantes y conocidos en cerveza son la proteína transportadora de lípidos 1 (LTP1) y la Proteína Z. Las propiedades espumantes de la proteína LTP1 se deben principalmente a su desnaturalización, que tiene lugar durante la ebullición del mosto y que favorece la exposición de sus grupos hidrofóbicos interiores. En el caso de los ácidos amargos, los iso-ácidos reducidos (tetra y hexa) contribuyen a espumas más estables, aunque ásperas en boca. Por último, los productos de las reacciones de Maillard y los iones metales divalentes (p.ej. zinc) también contribuyen positivamente a la retención de la espuma (Bamforth, 2011; D. E. Evans *et al.*, 1999; D. Evan Evans & Bamforth, 2009; D. Evan Evans & Sheehan, 2002; Niu *et al.*, 2018). En este sentido, los tratamientos UHPH a 300 MPa podrían haber tenido efecto sobre los polipéptidos hidrofóbicos y/o ácidos amargos, comprometiendo así a la estabilidad de la espuma.

El efecto de la tecnología UHPH sobre la estabilidad de la espuma de la cerveza no ha sido abordado anteriormente por otros investigadores, pero sí que existen estudios con la tecnología HHP. Los tratamientos HHP (300 MPa/ 5 min, 500 MPa/ 5 min y 700 MPa/ 5 min) no afectaron a la capacidad de retención de la espuma de cervezas *lager* en comparación con tratamientos térmicos poco intensos (60 °C/ 2 min, equivalente a 2 UP). Otros autores demostraron que la tecnología HHP tenía un efecto positivo sobre la estabilidad de la espuma. Según Santos *et al.* (2017), trataron cervezas estilo *lager* y *ale* mediante HHP (300 MPa/ 20 min, 400 MPa/ 20 min, 500 MPa/ 20 min y 600 MPa/ 20 min) y observaron mejoras en los niveles de estabilidad de la espuma en comparación con cerveza no tratada. De forma similar, Yin *et al.* (2016) reportó estabilidades de espuma mayores en cervezas de trigo tratadas con HHP (500 MPa/ 10 min) que en cervezas no tratadas, pero no observó mejoras significativas con otros tratamientos HHP (400 MPa/ 15min, 600 MPa/ 5 min). No obstante, todos los tratamientos HHP mencionados (400 MPa/ 15min, 500 MPa/ 10 min y 600 MPa/ 5 min) resultaron en cervezas con espumas significativamente más estables que los tratamientos térmicos (60°C/ 15min, equivalente a 15 UP), los cuales favorecieron la pérdida de estabilidad de la espuma. Así pues, los resultados reportados por otros investigadores sugieren que los tratamientos HHP no tienen efecto e incluso pueden mejorar la estabilidad de la espuma – dependiendo de la presión aplicada y tiempo de tratamiento – en comparación con cervezas no tratadas o cervezas sometidas a tratamientos térmicos muy suaves (2 UP). No obstante, cuando se comparan con tratamientos térmicos convencionales (15 UP), las cervezas tratadas mediante HHP mantienen espumas con mayor estabilidad. Los tratamientos HHP causarían la desnaturalización proteica parcial, aumentando el carácter hidrofóbico de las proteínas, aunque no se observó en el presente estudio.

**Tabla 5.3.** Estabilidad de la capacidad de retención de espuma de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH [REDACTED] a, UHPH [REDACTED] MPa y UHPH a [REDACTED] durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)

Tratamiento	Capacidad de retención de espuma de las cervezas tratadas (Nibem 30) <sup>1</sup>							
	Tiempo de envejecimiento acelerado a 35 °C (meses)							
	0	1	2	3	0	1	2	3
[REDACTED]	282 ± 13	251 ± 6	240 ± 15	229 ± 14	a, A	a, B	a, BC	a, C
[REDACTED]	277 ± 14	245 ± 14	229 ± 8	226 ± 10	a, A	ab, B	ab, C	ab, C
[REDACTED]	269 ± 7	236 ± 6	219 ± 8	213 ± 2	ab, A	bc, B	b, C	bc, C
[REDACTED]	262 ± 5	224 ± 2	217 ± 14	204 ± 5	b, A	c, B	b, BC	c, C

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4)

**a-b:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna ( $p < 0,05$ )

**A-C:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila ( $p < 0,05$ )

### *Estabilidad de la capacidad de retención de espuma durante el envejecimiento de las cervezas*

Durante el seguimiento del envejecimiento acelerado se observó que los tratamientos UHPH a altas presiones ([REDACTED]) afectaron negativamente a la capacidad de retención de espuma de las cervezas en comparación con la pasteurización térmica convencional (Tabla 5.3). A pesar de que inicialmente ( $t_0$ ) solamente las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] mostraron diferencias significativas en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente, durante el envejecimiento acelerado ( $t_1$ - $t_3$ ) se demostró que los tratamientos UHPH a [REDACTED] también causaban una pérdida significativa de la capacidad de retención de espuma de las cervezas. En cambio, las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] no presentaron diferencias significativas en los niveles de capacidad de retención de espuma en comparación con la pasteurización térmica convencional durante los 3 meses de envejecimiento acelerado ( $p < 0,05$ ), aunque tendió a dar valores de estabilidad de espuma inferiores. Así pues, a estas condiciones de menor presión (200 MPa), la intensidad del tratamiento UHPH no fue suficiente para causar la pérdida de espuma, sino que se requiere presiones superiores a [REDACTED] para ello.

La espuma pierde estabilidad a medida que la cerveza envejece, independientemente del tratamiento aplicado (Tabla 5.3). Para todos los tratamientos, las cervezas experimentaron la mayor pérdida de la capacidad de retención de espuma (31 – 38 Nibem 30; 11 – 15 %) durante el primer mes de envejecimiento acelerado a 35°C, la cual sigue disminuyendo significativamente

durante los 3 meses, con una pérdida de la capacidad de retención de espuma de 51 – 61 Nibem 30 (18 – 23 %) en el tercer mes.

Los estudios reportados hasta la fecha atribuyen la degradación de la estabilidad de la espuma a la presencia de la enzima proteolítica proteinasa A (PrA), que actúa degradando los polipéptidos hidrofóbicos (LTP1, Proteína Z) que contribuyen a evitar el colapso de la espuma. La enzima PrA es excretada por la levadura durante la fermentación y, en menor grado, liberada durante la autólisis celular (Bamforth, 2011; D. Evan Evans & Bamforth, 2009; Stewart *et al.*, 2006). Stewart *et al.* (2006) demostró que la pasteurización térmica inactiva la enzima proteolítica PrA en cerveza y resulta en una espuma más estable, ya que previene su deterioro durante el envejecimiento de la cerveza. En concreto, detectaron actividad de PrA en cerveza no pasteurizada mientras que en cerveza pasteurizada (15 UP), la PrA se encontraba inactivada. Consecuentemente, observaron que la estabilidad de la espuma y los niveles de polipéptidos hidrofóbicos de la cerveza pasteurizada se mantenían prácticamente constantes (disminución de 6 unidades Nibem y 2 mg/l de polipéptidos hidrofóbicos) durante 3 meses a temperatura ambiente y, en cambio, decrecían en cerveza no pasteurizada (disminución de 42 unidades Nibem y 12 mg/l de polipéptidos hidrofóbicos). He *et al.* (2006) también demostró que la pasteurización térmica (30 min a 70 °C) inactivó PrA y previno su efecto negativo sobre la estabilidad de la espuma durante su envejecimiento en comparación con cerveza no pasteurizada. No obstante, en este caso no se evitó por completo que la espuma de las cervezas pasteurizadas se degradase, sino que se ralentizó, ya que decreció 48 unidades Nibem (de 246 a 198 unidades Nibem 30) durante el almacenamiento de la cerveza (3 meses a 35 °C), por la posible influencia de otros mecanismos no enzimáticos, pues PrA no presentaba actividad. En cambio, en cerveza no pasteurizada se detectó actividad de PrA y la estabilidad de la espuma se degradó 4 veces más, un total de 201 unidades Nibem (de 246 a 45 unidades Nibem). He *et al.* (2006) y Hoff *et al.* (2013) detectaron que LTP1 se seguía degradando en cerveza pasteurizada, aunque en menor medida que en cerveza no pasteurizada. Los resultados del presente estudio coincidieron con los reportados por He *et al.* (2006), pues a pesar de que el tratamiento térmico inactiva PrA (no analizada en este estudio), la estabilidad de la espuma decreció 53 unidades Nibem, también durante un período 90 días a 35°C. En este sentido, no se han encontrado diferencias significativas entre el efecto de pasteurización térmica y UHPH sobre la estabilidad de la espuma durante su envejecimiento, y se sugiere que ambas tecnologías tienen el mismo efecto sobre la enzima PrA.

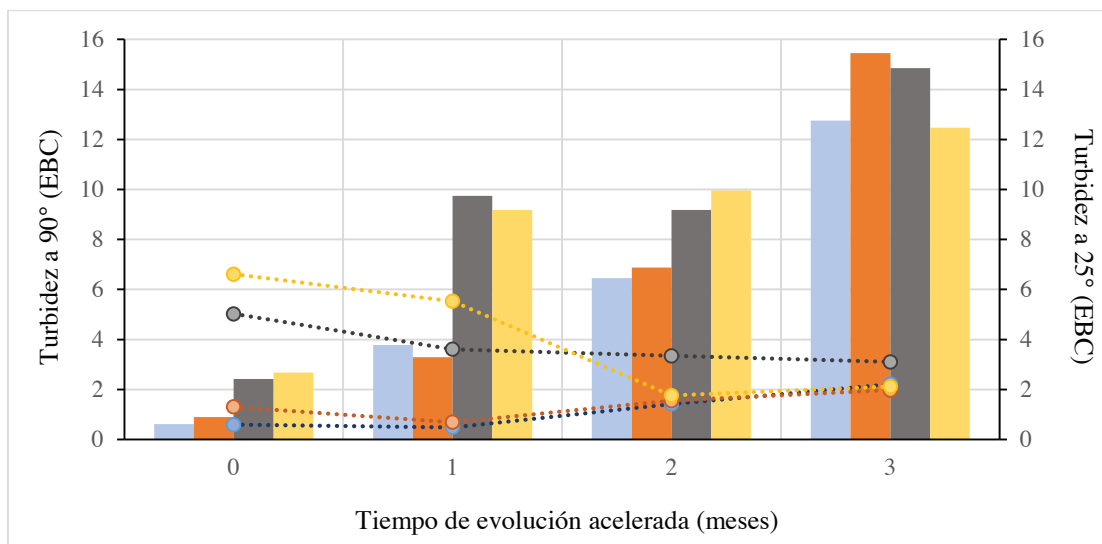
### **5.1.1.3. Turbidez coloidal**

La turbidez coloidal de las cervezas, definida como la falta de transparencia debido a la presencia de partículas coloidales, fue evaluada mediante la determinación de la intensidad de luz reflejada

tanto a un ángulo de 90° como a un ángulo de 25° de la luz incidente. Este método es comúnmente utilizado en la industria cervecera para detectar a 90° especialmente la presencia de partículas disueltas pequeñas ( $<1 \mu\text{m}$ ), causantes principales de la turbidez invisible (no percibido por el ojo humano) (*EBC Analytica, 9.29 Haze in beer: calibration of haze meters, 2015*), mientras que a 25° se determina la presencia de partículas de mayor tamaño, responsables de la turbidez visible.

En la en la Figura 5.1 se muestran los valores de turbidez a un ángulo incidente de 90° y 25°, respectivamente, para los distintos tipos de cervezas, las tratadas con la tecnología UHPH (██████████) y las pasteurizadas térmicamente (15 UP). Inicialmente ( $t_0$ ), las cervezas tratadas con UHPH ██████████ MPa y las cervezas pasteurizadas térmicamente presentaron los mismos niveles de turbidez (a un ángulo incidente de 90° y 25°), sin observarse diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), a pesar de las diferencias en temperaturas aplicadas. Por el contrario, la turbidez (a 90° y a 25°) de las cervezas tratadas con UHPH ██████████ fue mayor y, además, el aumento fue proporcional a la presión aplicada. Destacar que este aumento de turbidez fue significativo para las determinaciones de turbidez a 90°, mientras que en las determinaciones de turbidez a 25° solamente se observó una tendencia a aumentar. Así pues, los tratamientos UHPH afectaron a la turbidez de la cerveza cuando se aplicaron presiones ██████████. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Franchi *et al.* (2011) al tratar cerveza *lager* con la tecnología UHPH, ya que observaron que la turbidez de la cerveza aumentó con la aplicación de presiones superiores ██████████ y, además, que el incremento de la turbidez es proporcional a la presión aplicada. En cambio, otros parámetros como la temperatura inicial del producto ██████████ no presentaron un efecto significativo a pesar de que, a estas condiciones de operación, estimaron que la cerveza alcanzó una temperatura de 60 – 80 °C en la válvula de homogenización, pero durante un tiempo de tratamiento muy corto (0,7 s).





**Figura 5.1.** Estabilidad de la turbidez medida a un ángulo de 25° (columnas) y a 90° (líneas discontinuas) en cervezas pasteurizadas térmicamente (azul), tratadas con UHPH a 100 MPa (naranja), UHPH a 150 MPa (gris) y UHPH a 200 MPa (amarillo) durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C).

La naturaleza de la turbidez de la cerveza ha sido ampliamente revisada y descrita previamente por otros autores. En general, la turbidez no biológica más común es la generada por complejos de polipéptidos unidos a polifenoles, formando suspensiones coloidales que reflejan la luz y hacen que el producto pierda claridad. No obstante, no todos los polipéptidos ni los polifenoles de la cerveza están involucrados en la formación de turbidez. Los principales polipéptidos turbioactivos son hordeínas, proteínas mayoritarias del gluten de la cebada, que contienen cantidades significativamente altas de los aminoácidos prolina, ácido glutámico, arginina y glicina.; mientras que los polifenoles más relacionados con la formación de turbidez son las proantocianidinas (dímeros de catequinas y epicatequinas), de la familia de los taninos, procedentes de la cebada y del lúpulo (Bamforth, 2011; Mastanjević et al., 2018; Siebert et al., 1996; Steiner et al., 2010).

Durante los tratamientos UHPH de cerveza, el estrés mecánico generado en la válvula de homogenización altera el estado de estos complejos polipéptidos-polifenoles. En concreto, podría modificar y desplegar la estructura conformacional de las proteínas (desnaturalización), exponiendo sus grupos hidrofóbicos anteriormente escondidos en el interior de la estructura proteica, que permite que se creen nuevos enlaces covalentes, más fuertes, como puentes de hidrogeno y puentes disulfuro. En este sentido, la tecnología UHPH induce instantáneamente el crecimiento de tamaño de los complejos proteína-polifenol, de forma similar a la evolución de turbidez fría a turbidez permanente que tiene lugar espontáneamente y de manera habitual durante el envejecimiento de la cerveza. De hecho, son numerosos los estudios que proponen aplicar tratamientos UHPH con el objetivo de alterar la estructura conformacional y, consecuentemente,

las propiedades tecno-funcionales de las proteínas en varios alimentos (Zamora & Guamis, 2014), como se ha demostrado en proteínas de leche, yogur y bebidas vegetales (Serra *et al.*, 2008, 2009; Zamora & Guamis, 2014). Por ejemplo, Serra *et al.* (2009) reportó niveles de péptidos hidrofóbicos mayores en yogures producidos a partir de leche tratada mediante UHPH a ■■■ MPa, que a partir de leche tratada térmicamente. De forma similar a los resultados obtenidos en el presente estudio, Cruz *et al.* (2007) observaron mediante análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC, de sus siglas en inglés) que los tratamientos UHPH ■■■ MPa desnaturalizaron parcialmente las proteínas de bebida de soja, mientras que ■■■ MPa se observó un mayor grado de desnaturalización, evidenciando la diferencias en eficiencia en función de la presión aplicada, como se ha descrito también en el presente estudio.

Otros investigadores han descrito el mismo efecto con la tecnología HHP y para varios tipos de cerveza. A pesar de que la composición de la turbidez y compuestos implicados pueden diferir en función del estilo de cerveza (si contiene levadura, trigo, etc.) y del proceso de fabricación (tipo de filtración, uso de estabilizantes, etc.), en general, los tratamientos HHP de mayor intensidad, es decir, mayor presión y/o tiempos de presurización largos generaron más turbidez que la determinada en cerveza pasteurizada térmicamente, mientras que tratamientos poco intensos, a presiones bajas y/o durante tiempos de presurización cortos, no causaron mayor turbidez que la pasteurización térmica. (Buzrul *et al.*, 2005a, 2005b; Castellari *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2016). En cerveza *lager*, el tratamiento HHP a 350 MPa/5 min favoreció la aparición de mayor turbidez que los tratamientos de pasteurización térmica de 15 UP (60 °C/ 15 min, equivalente a 15 UP), mientras que otros tratamientos HHP menos intensos (200, 250 y 300 MPa/ 3 y 5 min) no presentaron el mismo efecto. Ambos tipos de tratamientos, HHP y PT (60°C/15 min) causaron el incremento de la turbidez en comparación con cerveza no tratada (Buzrul *et al.*, 2005a). Fischer *et al.*, (2002) también obtuvieron que cervezas *lager* y *Pilsen* tratadas con HHP (300, 500, 700 MPa/ 5 min) eran más turbias que las pasteurizadas térmicamente (60 °C/ 2 min, equivalente a 2 UP), independientemente de la intensidad del tratamiento HHP aplicado, pero probablemente porque los tratamientos térmicos control fueron muy suaves. En cervezas *pale ale* y *mild ale* tratadas con HHP a 600 MPa/5min, se encontraron niveles de turbidez elevados en comparación con cerveza del mismo lote pasteurizada térmicamente a 10 UP (60°C/10 min, equivalente a 10 UP) (Castellari *et al.*, 2000). En cervezas de trigo turbias, la tecnología HHP (400 MPa/ 15 min, 500 MPa/ 10 min, 600 MPa/ 6 min) también aumentó su turbidez en comparación con pasteurización térmica (60°C, 15 min, equivalente a 15 UP) (Yin *et al.*, 2016). En todos los estudios, la turbidez generada por la tecnología HHP también fue atribuida a la desnaturalización de las proteínas turbio-activas y consecuente exposición de grupos hidrofóbicos, en línea con lo observado en otros alimentos. Los tratamientos HHP alteran el estado conformacional de otras matrices alimentarias ricas en proteínas análogas a las presentes

en la turbidez de cerveza. En geles de gluten de trigo – que contienen un 75-85% de proteínas de gluten, con un contenido alto de glutamina y prolina (Wieser, 2007) – los tratamientos HHP mejoran sus propiedades funcionales al aumentar el contenido de grupos tiol (-SH) libres y su hidrofobicidad superficial (Wang *et al.*, 2019).

Así pues, en contexto con los estudios publicados por otros investigadores, los resultados del presente estudio sugieren que la tecnología UHPH y HHP causan un efecto similar sobre la turbidez de la cerveza a pesar de presentar mecanismos de acción diferentes. Ambas tecnologías, en condiciones de tratamiento de elevada intensidad, provocan una formación de turbidez en cerveza mayor que la pasteurización térmica convencional.

### ***Estabilidad de la turbidez coloidal durante el envejecimiento de las cervezas***

Como se representa en la Figura 5.1, no se observaron diferencias significativas en los valores de turbidez a 90° y a 25° entre cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa y cervezas pasteurizadas térmicamente a lo largo de todo el envejecimiento acelerado. En ambos casos se observó que tanto la turbidez a 90° aumentaba con el tiempo de envejecimiento acelerado, probablemente debido a la formación de nuevos complejos polipéptidos-polifenoles a partir de proteínas y polifenoles solubles, así como la turbidez a 25°, que también aumentó debido a la posible aglomeración y aumento de tamaño de los complejos proteína-polifenoles. Por otro lado, se observó que la turbidez a 90° de las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] y a [REDACTED] MPa, que inicialmente era significativamente mayor que la de las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa y pasteurizadas térmicamente, disminuyó durante el envejecimiento de las cervezas, probablemente debido a que no se formaron nuevos complejos proteína-polifenoles de menor tamaño sino que fueron disminuyendo para dar lugar a la formación de aglomeraciones de mayor tamaño, pues los valores de turbidez a 25° mostraron un incremento con el tiempo de envejecimiento acelerado. A los 3 meses de envejecimiento ( $t_3$ ), tanto las cervezas tratadas con UHPH como la pasteurizada térmicamente tendieron a presentar valores elevados y similares de turbidez a 90° y a 25°, debido a su estado avanzado de envejecimiento y demostrando que probablemente alcanzaron el equilibrio coloidal entre las fracciones de turbidez de menor y mayor tamaño de partícula.

Comparar los resultados obtenidos con los comportamientos descritos en estudios previos es complicado y complejo, debido a las diferencias en tipos de cervezas y, mayormente, en métodos analíticos utilizados por los diferentes investigadores. Franchi *et al.* (2011) observó que la turbidez de cerveza *lager* tratada con UHPH (250 MPa, 6°C) incrementó hasta alcanzar un nivel estable. En concreto, se mantiene constante durante los primeros días de almacenamiento (7 días, a 25°C), posteriormente aumentó hasta 4-5 veces (30 días, a 25°C), a partir del cual se mantuvo

relativamente constante en el tiempo (100 días, a 25°C). En cerveza tratada con HHP, se encontraron discrepancias en el comportamiento de la turbidez de las cervezas obtenidas. Por un lado, algunos autores han descrito cómo los niveles de turbidez de cerveza *lager* tratada con HHP (350 MPa/5 min) incrementan con el tiempo (56 días, almacenamiento a 20°C), alcanzando niveles mayores que la pasteurización térmica (Buzrul *et al.*, 2005b). Por otro lado, otros estudios reportan que la turbidez de cervezas *pale ale* y *mild ale* tratadas con HHP (600 MPa/5 min) disminuye con el tiempo (49 días, almacenado a 20°C), mostrando mayor estabilidad que la pasteurización térmica, pues los niveles decrecen más rápidamente (Castellari *et al.*, 2000). Asimismo, la turbidez de cervezas de trigo tratada con HHP (500 MPa/10 min) también disminuyó con el tiempo (84 días, almacenadas a 20°C), aunque presentando una mayor estabilidad coloidal que la pasteurización térmica (Yin *et al.*, 2016).

#### 5.1.1.4. Color

El color es un atributo de percepción visual que depende de una fuente de luz visual (región del espectro electromagnético de longitud de onda aprox. de 350 a 750 nm) pero que también se ve influida por las propiedades físicas y químicas de la matriz alimentaria. En cerveza, el color se define en unidades EBC, las cuales se basan en la medición espectrofotométrica de una muestra de cerveza sin turbidez a una longitud de onda de 430 nm. En la Tabla 5.4 se muestra las determinaciones de color de cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa. En cervezas recién tratadas ( $t_0$ ), no se observaron diferencias significativas entre los niveles de color después de los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa y los tratamientos de pasteurización térmica. Los resultados sugieren que la temperatura no presentó efecto sobre el color de las cervezas, a pesar de la diferencia de carga térmica aplicadas en cada tratamiento. En la pasteurización térmica se aplica una temperatura de 60 °C durante 15 min (equivalente 15 UP) mientras que en el tratamiento UHPH a [REDACTED] MPa la cerveza alcanza una temperatura de 63 °C durante solamente 0,2 segundos. El efecto de la temperatura no produjo una alteración inmediata del color de las cervezas durante la pasteurización térmica, como también ha sido demostrado en estudios anteriores con cervezas *Pilsen* filtradas, *Pilsen* no filtradas y cervezas de trigo (Feilner & Jacob, 2015; Feilner & Oehmichen, 2016; Hoff *et al.*, 2013), pero sí durante su envejecimiento, como se discutirá más adelante. Por otro lado, los tratamientos UHPH a presiones superiores, a [REDACTED] MPa, favorecieron el incremento de color de las cervezas durante el tratamiento, probablemente debido a la presión y a las fuerzas de cizalla, turbulencia y cavitación implicadas en el mecanismo de acción del equipo UHPH. Se descartó el factor temperatura pues, aunque se alcancen diferentes temperaturas en la válvula de homogenización entre los tratamientos UHPH

a [redacted]), los tratamientos UHPH [redacted]) y los tratamientos UHPH a [redacted]), los tiempos de presurización son muy cortos (0,2 segundos).

Estos resultados no coinciden con otros estudios que reportaron que los tratamientos UHPH a presiones de [redacted]) no afectaron al color de la cerveza en comparación con cerveza sin tratar (M. A. Franchi et al., 2011a). Las diferencias entre los resultados de los diferentes estudios podrían atribuirse a diferencias en el tipo de cerveza tratada, las condiciones de tratamiento y principalmente al diseño de los equipos utilizados. De forma similar, los resultados reportados por diferentes investigadores con la tecnología HHP también presentan discrepancias entre sí. Los estudios revisados describen comportamientos del color de las cervezas tratadas diferentes, probablemente también debido a las diferencias en tipo de cerveza, condiciones de tratamiento y equipos utilizados. Según Fischer *et al.* (1998), los tratamientos HHP no presentan efecto significativo sobre el color de la cerveza; Castellari *et al.* (2000) no observa diferencias entre la claridad de cervezas *pale ale* tratadas con HHP (600 MPa/ 5 min) y cervezas sometidas a tratamientos térmicos (60 °C/ 10 min), mientras que otros índices de color fueron mayores para las cervezas tratadas térmicamente; y Yin *et al.* (2016) no encuentran diferencias significativas en los niveles de color entre cervezas de trigo tratadas HHP (400 MPa/15 min, 500 MPa/10 min, 600 MPa/5 min) y pasteurizadas térmicamente (60°C/15 min). En cambio, Buzrul *et al.* (2005a) describió que el color de las cervezas tratadas con HHP incrementa con la presión y tiempo de presurización aplicados (200 – 350 MPa/ 3 -5 min), alcanzando niveles de color mayores en cervezas tratadas con HHP a  $P \geq 300$  MPa en comparación con cervezas tratadas térmicamente (60 °C/ 15 min). Cabe destacar que las diferencias observadas entre tratamientos son inferiores a 1 EBC muy difícilmente perceptible al ojo humano.

**Tabla 5.4.** Estabilidad del color de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a [redacted], a UHPH [redacted] y UHPH a 300 MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)

Tratamiento	Color de las cervezas tratadas (EBC) <sup>1</sup>							
	Tiempo de envejecimiento acelerado a 35 °C (meses)							
	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
[redacted]	10,2 ± 0,2	a, A	10,8 ± 0,1	a, B	12,1 ± 0,2	a, C	11,1 ± 0,0	a, B
[redacted]	10,4 ± 0,1	a, A	10,9 ± 0,1	a, B	12,2 ± 0,5	a, C	10,5 ± 0,5	a, AB
[redacted]	11,7 ± 0,6	b, A	11,9 ± 0,2	b, B	12,7 ± 0,5	b, B	10,1 ± 0,5	b, C
[redacted]	11,0 ± 0,1	c, A	11,9 ± 0,1	b, B	11,5 ± 0,3	c, B	11,9 ± 0,2	c, B

<sup>1</sup> Media ± Desviación estándar (n = 4)

**a-b:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna ( $p < 0,05$ )

**A-C:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila ( $p < 0,05$ )

### ***Estabilidad del color durante el envejecimiento de las cervezas***

Como se observa en la Tabla 5.4, las cervezas pasteurizadas térmicamente y las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa no solamente presentaron los mismos niveles de color recién tratadas ( $t_0$ ), sino que además siguieron el mismo comportamiento durante los tres meses de envejecimiento acelerada ( $t_1$ - $t_3$ ), sin observarse diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). El color de las cervezas aumentó durante los dos primeros meses de envejecimiento y disminuyó en el tercer mes. Las diferencias en mecanismo de acción entre ambas tecnologías y, en particular, las diferencias en las cargas térmicas aplicadas (15 min a 60 °C vs 0,2 segundos a 63 °C) no afectaron al color de las cervezas, en contra de lo esperado ya que, según estudios anteriores, el incremento de las unidades de pasteurización aplicadas acelera el aumento del color de la cerveza durante su envejecimiento (Cao *et al.*, 2011). En el caso de las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa, su color siguió el mismo comportamiento que en las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa y las cervezas pasteurizadas térmicamente, pero mostrando más variabilidad y una menor estabilidad: el color aumentó durante los dos primeros meses de envejecimiento acelerado ( $t_2$ ), alcanzando niveles significativamente mayores que en los demás tratamientos, y disminuyó en el tercer mes de envejecimiento acelerado ( $t_3$ ), hasta niveles más bajos que en cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa y pasteurizadas térmicamente. En cambio, el color de las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa también aumentó durante el primer mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ) pero posteriormente presentó un comportamiento más estable, ya que no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el primer y el tercer mes de envejecimiento acelerado ( $t_1 - t_3$ ). Debido a esta estabilidad, a los dos meses de envejecimiento acelerado ( $t_2$ ), los niveles de color fueran significativamente inferiores que los niveles de las demás cervezas tratadas, los cuales aumentaron durante este mismo tiempo de envejecimiento.

Por un lado, el aumento de color de las cervezas observado en el presente estudio coincide con los reportados por otros investigadores, principalmente en estudios que también evaluaron las cervezas en ensayos de envejecimiento bajo condiciones aceleradas (a temperaturas elevadas) o bien bajo condiciones reales (a temperatura ambiente) pero durante períodos de envejecimiento suficientemente largos ( $\geq 6$  meses), ya que los estudios de envejecimiento bajo condiciones reales durante periodos cortos (2 – 3 meses) no permitirían apreciar un aumento significativo del color de las cervezas. Franchi *et al.* (2011) describió que el color de cerveza tratada con UHPH (250 MPa,  $T_E = 6$  °C) se mantuvo estable a lo largo de 100 días a una temperatura de 25 °C. De forma similar, otros estudios demostraron el mismo comportamiento en cervezas tratadas con la tecnología HHP (350 MPa; 3 – 5 min.), pues su color no varió durante 56 días a 20 °C y no

presentó diferencias significativas en comparación con la evolución del color de cerveza pasteurizada térmicamente (60 °C, 15 min) (Buzrul *et al.*, 2005b). En ambos estudios se simularon envejecimientos reales de cervezas *lager*, a temperatura ambiente (20-25°C) pero durante tiempos de seguimiento relativamente cortos (2 – 3 meses) en comparación con la vida útil de las cervezas comerciales (4 – 12 meses (Briggs *et al.*, 2004)), de manera que no permiten evaluar el comportamiento de las cervezas tratadas en un estado de envejecimiento más avanzado y, concretamente, si el color se sigue manteniendo constante durante toda la vida útil del producto. En cambio, otros investigadores evaluaron cervezas *lager* pasteurizadas térmicamente almacenada durante tiempos de envejecimiento más largos y a temperatura ambiente (20 – 25 °C) y observaron que, aunque no se apreciara aumento significativo de color durante los primeros meses, se incrementaba aprox. 1 EBC – 2 EBC en 6 – 12 meses respectivamente (Cao *et al.*, 2011; Lorencová *et al.*, 2019; Vanderhaegen *et al.*, 2007). Como alternativa a las evoluciones reales a temperatura ambiente, las evoluciones a temperaturas más elevadas (35 - 40 °C), como la del presente estudio, permiten acelerar el envejecimiento de las cervezas con el objetivo de simular y estudiar el mismo efecto en menos tiempo (Lehnhardt *et al.*, 2020). Vanderhaegen *et al.* (2003) observó un ligero aumento del color de la cerveza durante 6 meses de envejecimiento a 20 °C (aprox. 1 EBC) mientras que, en cambio, los niveles de color aumentaron 4 veces más durante el mismo tiempo de envejecimiento a 40 °C (aprox. 4 EBC). Hoff *et al.* (2013) evaluaron el envejecimiento de cervezas no filtradas pasteurizadas térmicamente a 20 UP (70 °C, 30 min) durante 41 días de envejecimiento también a 40 °C y, aunque inicialmente la pasteurización térmica no presentó efecto sobre el color de la cerveza, las cervezas pasteurizadas térmicamente tendieron a oscurecerse con el tiempo de envejecimiento, pues las altas temperaturas de almacenamiento aceleran el avance de las reacciones de Maillard.

El color de la cerveza depende principalmente de las materias primas utilizadas y del proceso de fabricación de la cerveza; se origina en gran parte durante el malteado de los granos, puede continuar durante la etapa de ebullición del mosto y, en menor grado, durante la pasteurización. En estas etapas, los azúcares reductores (principalmente maltosa) reaccionan con aminoácidos libres o grupos amino de polipéptidos mediante reacciones de Maillard, que acaban resultando en la formación de melanoidinas, los principales compuestos responsables de definir el color final de las cervezas. A parte del pH, las reacciones de Maillard son dependientes de la temperatura, por lo cual la exposición prolongada de cervezas a temperaturas suficientemente elevadas favorece la formación de color. En el rango de 60 – 100 °C, el incremento de 1 °C de temperatura puede incrementar más de un 10% la velocidad de las reacciones de Maillard (Shellhammer, 2009). En segundo lugar, los mecanismos de oxidación causan la polimerización de polifenoles, principalmente flavonoides, y también contribuyen a la formación de color en cerveza (color

rojizo y marrón). En este sentido, la presencia de oxígeno, compuestos prooxidantes (p. ej. iones metálicos) y la temperatura son factores que favorecen la degradación oxidativa de polifenoles y la consecuente formación de color durante el envejecimiento de la cerveza, fenómeno observado más comúnmente en cervezas del estilo *pale lager* (Aron & Shellhammer, 2010; Callemien & Collin, 2007; Cao *et al.*, 2011; Vanderhaegen *et al.*, 2003). De hecho, se ha demostrado que a mayores unidades de pasteurización aplicadas en cerveza, mayor es el grado de degradación de los polifenoles (Cao *et al.*, 2011). Por último, en algunos casos, el aumento de color también puede ser causado por reacciones de caramelización y pirolisis, relacionadas con la aparición de sabores y aromas a quemado, pero en matrices ácidas como la cerveza suceden a velocidades lentas y además se desarrollan a temperaturas >120 °C (sobre todo predominan a >200 °C), de manera que tendrían un efecto prácticamente nulo durante los tratamientos de pasteurización y UHPH aplicados a las cervezas en este estudio. Así pues, el aumento de color durante los tratamientos se atribuye a la presencia de compuestos derivados principalmente de las reacciones de Maillard y/o a la oxidación de polifenoles, ambos mecanismos favorecidos por la aplicación de temperatura.

Por otro lado, la disminución de color observada en el tercer mes de envejecimiento acelerado ( $t_3$ ) de las cervezas pasteurizadas térmicamente y tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa no pudo ser comparada con estudios anteriores, pues no se ha encontrado bibliografía en la que se describa este comportamiento, posiblemente porque no es habitual reportar evoluciones aceleradas de hasta 3 meses de duración debido al avanzado estado de envejecimiento en el que se encuentran las cervezas. Probablemente por esta razón, se observó una disminución de color no esperada, en concordancia con la desfavorable estabilidad coloidal de las cervezas, mencionada anteriormente. Destacar, sin embargo, que el color de las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa siguió manteniéndose constante, indicativo de su buena estabilidad en vida útil.

### **5.1.2. Estabilidad oxidativa de las cervezas**

El efecto de la tecnología UHPH ([REDACTED] MPa) y de la pasteurización térmica (15 UP) sobre la estabilidad oxidativa de la cerveza se evaluó mediante las determinaciones de potencial oxidativo (T400) y potencial antioxidante endógeno (EAP), así como contenido de anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) en cerveza recién tratada y a lo largo de los tres meses de envejecimiento acelerado.

El efecto de ambos factores, tipo de tratamiento y tiempo de envejecimiento, sobre todos los parámetros evaluados fue determinado estadísticamente mediante un análisis ANOVA multifactorial. Como se muestra en la Tabla 5.5, tanto el tipo de tratamiento como el tiempo de



envejecimiento presentaron efecto significativo sobre el potencial oxidativo (T400) y el SO<sub>2</sub> de las cervezas ( $p < 0,01$ ). En cambio, otros parámetros como el potencial antioxidante endógeno (EAP) no se vio afectado por el tratamiento.

**Tabla 5.5.** Efecto del tipo de tratamiento (pasteurización térmica a 15UP, homogenización a ultra alta presión a [REDACTED] MPa) y tiempo de envejecimiento acelerado (3 meses a 35°C) sobre los parámetros de estabilidad oxidativa de las cervezas obtenidas, según el ANOVA multifactorial.

Parámetro	Efecto de los factores (valor p)		
	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento*Tiempo
Log(T400)	0,003 ***	0,000 ***	0,632
EAP	0,200	0,000 ***	0,356
SO <sub>2</sub>	0,002 ***	0,000 ***	0,001 ***

\*\* valor  $p < 0,05$

\*\*\* valor  $p < 0,01$

### 5.1.2.1. Potencial de formación de radicales (T400)

La estabilidad oxidativa de las cervezas se evaluó mediante la determinación de su potencial de formación de radicales (T400) por espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (EPR, de sus siglas en inglés). En este ensayo se incubaron las cervezas bajo condiciones oxidativas inducidas a 60 °C y se midió la intensidad de señal EPR (radicales formados) cuando se acaba la fase de latencia y después de 400 min de tiempo de reacción, de manera que permitió cuantificar la formación de radicales en las cervezas una vez agotada su actividad antioxidante, es decir, permitió evaluar el efecto oxidativo total. Así pues, cuanto mayor sea el valor T400, mayor será la capacidad de la cerveza para formar radicales y peor su estabilidad oxidativa.

En la Tabla 5.6 se muestran los valores logarítmicos de T400 obtenidos para todas las cervezas en función del tratamiento aplicado. Inicialmente ( $t_0$ ), las cervezas pasteurizadas térmicamente presentaron los mismos niveles de radicales libres generados que las obtenidas con los tratamientos UHPH a menores presiones ([REDACTED] MPa), ya que no se observaron diferencias significativas entre los valores de log (T400) ( $p < 0,05$ ). Así pues, las diferentes cervezas obtenidas con cada uno de estos tres tratamientos presentaron la misma estabilidad oxidativa, a pesar de las diferencias en el mecanismo de acción de las tecnologías y diferencias en temperatura aplicada. Estos resultados coinciden con los reportados por Hoff *et al.* (2013) y Lund *et al.* (2012),

que demostraron que la aplicación de temperatura no presentó efecto sobre la velocidad de generación de radicales libres en cervezas filtradas y cervezas no filtradas ambas recién pasteurizadas térmicamente (20 UP) en comparación con cervezas no pasteurizadas. Por el contrario, existen otros estudios que sí detectaron un aumento en la formación de radicales libres de las cervezas durante la pasteurización térmica. Yin *et al.* (2017) observaron velocidades de formación de radicales libres mayores en cerveza de trigo recién pasteurizada (15, 35 y 100 UP) que en cerveza no pasteurizada. En cambio, Kaneda *et al.* (1994) obtuvieron niveles de formación de radicales menores en cervezas pasteurizadas que en cervezas sin pasteurizar mediante análisis de espectrometría EPR, aunque mediante análisis de quimioluminiscencia sí que demostraron que durante la pasteurización térmica se inicia la generación de radicales libres a partir del oxígeno molecular disuelto y, además, se ve acelerada con el aumento de las unidades de pasteurización aplicadas en el proceso (10 – 30 UP). Así pues, existen discrepancias entre los estudios reportados por otros investigadores sobre el efecto de la pasteurización térmica en cerveza recién pasteurizada, probablemente debido a las diferencias entre el tipo de cerveza y la metodología analítica utilizada. En cambio, todos los estudios evidenciaron el efecto positivo de la pasteurización térmica sobre la estabilidad oxidativa de las cervezas durante su envejecimiento, como se comentará más adelante.

En el caso de las cervezas obtenidas con el tratamiento UHPH [REDACTED] MPa, presentaron valores de log(T400) inferiores que las demás cervezas, con significancia estadística en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente y las cervezas tratadas con UHH [REDACTED] MPa (Tabla 5.6), indicativo de una mayor estabilidad oxidativa en vida útil.

**Tabla 5.6.** Estabilidad del potencial de formación de radicales (T400) de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH [REDACTED] MPa, a UHPH [REDACTED] MPa y UHPH [REDACTED] MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)

Tratamiento	Log (T400) de las cervezas tratadas (U.I.) <sup>1</sup>							
	Tiempo de envejecimiento acelerado a 35 °C (meses)							
	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
[REDACTED]	6,39 ± 0,02	a, A	6,62 ± 0,01	a, B	5,79 ± 0,01	a, C	5,81 ± 0,00	a, C
[REDACTED]	6,39 ± 0,01	a, A	6,62 ± 0,02	a, B	5,78 ± 0,04	a, C	5,76 ± 0,06	a, C
[REDACTED]	6,37 ± 0,02	ab, A	6,63 ± 0,01	a, B	5,76 ± 0,07	a, C	5,75 ± 0,10	a, C
[REDACTED]	6,33 ± 0,04	b, A	6,55 ± 0,03	b, B	5,74 ± 0,02	a, C	5,76 ± 0,05	a, C

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4)

**a-b:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna ( $p < 0,05$ )

**A-C:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila ( $p < 0,05$ )

### ***Estabilidad del potencial oxidativo durante el envejecimiento de las cervezas***

En la Tabla 5.6 también se muestra las determinaciones de formación de radicales (T400) en valor logarítmico de todas las cervezas durante el envejecimiento acelerado a 35 °C. Como se observa, los valores T400 de todas las cervezas siguió el mismo comportamiento durante el envejecimiento acelerado, independientemente del tratamiento aplicado.

En primer lugar, la formación de radicales libres incrementó durante el primer mes de envejecimiento acelerado (t<sub>1</sub>). El mismo comportamiento ha sido descrito por otros investigadores también durante evoluciones aceleradas (41 días a 40 °C), en las que observaron que la formación de radicales libres generados en cervezas sin filtrar (pasteurizadas y sin pasteurizar) aumentaban con el envejecimiento (Hoff *et al.*, 2013). En cuanto a la comparación de las diferentes tecnologías utilizadas, no se observó diferencias significativas en los niveles de formación de radicales entre las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa y las cervezas pasteurizadas térmicamente después del primer mes de envejecimiento acelerado (t<sub>1</sub>). Así pues, estos tratamientos UHPH aplicados mejoraron la estabilidad oxidativa de las cervezas, como mínimo, en el mismo grado que la pasteurización térmica. En estudios anteriores, otros investigadores demostraron que la pasteurización térmica tiene un efecto positivo sobre la estabilidad oxidativa de cervezas filtradas (20 UP) (Lund *et al.*, 2012), cervezas sin filtrar (20 UP) (Hoff *et al.*, 2013) y cervezas de trigo (15, 37 y 100 UP) (Yin *et al.*, 2017), ya que durante su envejecimiento presentaban formaciones de radicales menores que las cervezas sin pasteurizar. En el caso de las cervezas tratadas mediante

UHPH a ■■■ MPa, como se había observado inicialmente en cerveza recién tratada ( $t_0$ ), siguieron presentando un valor  $\log(t_{400})$  significativamente inferior que las demás cervezas después de un mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ) y se confirmó que los tratamientos UHPH a ■■■ MPa mejoran la estabilidad oxidativa de las cervezas en comparación con los demás tratamientos UHPH y a la pasteurización térmica.

En segundo lugar, se observó que, independientemente del tratamiento aplicado, el potencial oxidativo de todas las cervezas decreció durante el segundo mes de envejecimiento ( $t_2$ ) hasta niveles inferiores a los iniciales y alcanzando un estado estable, ya que no se detectó diferencias significativas en comparación con las determinaciones del tercer mes de envejecimiento ( $t_3$ ) ( $p < 0,05$ ). Este comportamiento es considerablemente similar al descrito por Franchi *et al.* (2011) en cerveza lager tratada mediante UHPH (a 250 MPa,  $T_E = 6$  °C), aunque en menor tiempo ya que no almacenaron las cervezas bajo condiciones aceleradas, sino que a una temperatura ambiente de 25 °C. En concreto, Franchi *et al.* (2011) observaron que el potencial de oxidación-reducción incrementó pocos días después del tratamiento, se estabilizó a los 30 días en niveles más elevados y a partir de los 80 días de almacenamiento disminuyó rápidamente hasta alcanzar niveles inferiores a los iniciales a los 100 días. Los autores sugirieron que la caída en el potencial de oxidación-reducción se debió a la formación de productos estables que incorporan los radicales y el  $H_2O_2$ , y que probablemente estén correlacionados con propiedades fisicoquímicas y organolépticas no deseadas, típicas de cervezas envejecidas. En este sentido, se sugiere que en el presente estudio todas las cervezas se encontraron en un estado avanzado de envejecimiento después de 2 y 3 meses de envejecimiento acelerado ( $t_2$  y  $t_3$ ) debido a la disminución y estabilización de T400, sin apreciarse diferencias significativas entre la tecnología UHPH y la pasteurización térmica aplicadas.

#### **5.1.2.2. Potencial antioxidante endógeno (EAP)**

El potencial antioxidante endógeno (EAP, de sus siglas en inglés) también se determinó mediante espectrometría de resonancia paramagnética electrónica (EPR, de sus siglas en inglés). En el mismo ensayo en el que se midió T400 mediante la inducción del deterioro oxidativo de las cervezas, el tiempo transcurrido antes de que se inicie la formación acelerada de radicales es indicativo de la resistencia de las cervezas a la oxidación de radicales y se define como EAP, indicada en minutos. Las cervezas con valores EAP mayores presentan una mayor capacidad antioxidante y, consecuentemente, una mejor estabilidad oxidativa en vida útil.

En la Tabla 5.7 se muestran los valores de EAP de las cervezas obtenidas después de los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa y de las cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP). Inicialmente, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cervezas recién tratadas ( $t_0$ ), independientemente del tratamiento aplicado. La capacidad antioxidante de la cerveza final es en gran parte definida durante todo el proceso de fabricación, desde la maceración del mosto hasta la obtención de la cerveza final, y en este caso se partió de cerveza del mismo lote de fabricación justo hasta antes de realizar los tratamientos correspondientes, lo cual explica que se obtuvieran valores EAP similares para todas las cervezas. Los resultados coinciden con estudios previos que demuestran que el proceso de pasteurización térmica no afectó inicialmente ( $t_0$ ) a la capacidad antioxidante de la cerveza en comparación con cerveza no pasteurizada, como se demostró en cervezas lager filtradas pasteurizadas a 20 UP (Lund *et al.*, 2012) y en cervezas de trigo pasteurizadas a 15, 37 y 100 UP (Yin *et al.*, 2017), también mediante análisis de espectrometría EPR.

A pesar de que no se obtuvo significancia estadística, cabe mencionar que se observó que las cervezas pasteurizadas térmicamente tendieron a presentar valores de EAP menores que las obtenidas con los tratamientos UHPH, indicativo de una menor capacidad antioxidante. Kaneda *et al.* (1994) demostró mediante análisis de quimioluminiscencia que durante la pasteurización térmica se inicia la generación de radicales libres, a partir de oxígeno molecular disuelto. Este proceso se ve acelerado con el aumento de las unidades de pasteurización aplicadas (10 – 30 UP), por lo cual se podría esperar que la capacidad antioxidante de las cervezas pasteurizadas térmicamente hubiese empezado a consumirse, aunque no en cantidades significativas. Asimismo, entre las cervezas tratadas con UHPH ([REDACTED] MPa) también se observó que los valores de EAP tendieron a disminuir con el aumento de la presión aplicada en el tratamiento. Como observado previamente, los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa tienen impacto sobre el estado conformacional de diversos compuestos y moléculas de la cerveza, acelerando reacciones y cambios fisicoquímicos destacados (aumento de turbidez, color, pérdida espuma, etc.) que en general, implicarían una mayor formación de radicales libres, desencadenando reacciones de reducción-oxidación y favoreciendo la pérdida de capacidad antioxidante.

**Tabla 5.7.** Estabilidad del potencial antioxidante endógeno (EAP) de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a ■■■ MPa, a UHPH a ■■■ MPa y UHPH ■■■ MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)

Tratamiento	EAP de las cervezas tratadas (min.) <sup>1</sup>									
	Tiempo de envejecimiento acelerado a 35 °C (meses)									
	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>						
■■■	98 ± 12	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
■■■	106 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
■■■	105 ± 6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
■■■	100 ± 19	9 ± 18	9 ± 18	9 ± 18	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	15 ± 17	15 ± 17	15 ± 17

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4)

**a-b:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna ( $p < 0,05$ )

**A-C:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila ( $p < 0,05$ )

### *Estabilidad del potencial antioxidante endógeno durante el envejecimiento de las cervezas*

El seguimiento de las evoluciones aceleradas mostró que todas las cervezas pierden gran parte de su capacidad antioxidante, ya que disminuyó el 90 - 100 % del EAP, durante el primer mes de envejecimiento acelerado a 35 °C (t<sub>1</sub>), independientemente del tratamiento aplicado (Tabla 5.7). Durante este primer mes se agotó completamente la actividad antioxidante de las cervezas obtenidas a partir de los tratamientos con UHPH ■■■ MPa, UHPH ■■■ MPa y con la pasteurización térmica, pues no se detectó EAP. Lund *et al.* (2012) y Yin *et al.* (2017) demostraron que la pasteurización térmica mejora la estabilidad oxidativa de cervezas filtradas y cervezas de trigo ya que su capacidad antioxidante se consumió a menor velocidad que la de cervezas sin pasteurizar durante su vida útil (20-22 °C), a pesar de que inicialmente, a día 0, el tratamiento térmico no presentó ningún efecto. En este sentido, en el presente estudio se propone que los tratamientos UHPH a presiones de ■■■ MPa tienen el mismo efecto positivo sobre la capacidad antioxidante de las cervezas que el descrito por otros autores para la pasteurización térmica convencional.

Por otro lado, el EAP de las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa no se consumió por completo, sino que las cervezas presentaron actividad antioxidante residual que se conservó a largo de todo el envejecimiento. Cabe mencionar que, a nivel estadístico, estos valores EAP residuales son significativamente diferentes al resto de tratamientos solamente en el tercer mes de envejecimiento acelerado (t<sub>3</sub>), pero se sugiere que las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa

presentaron mejor capacidad antioxidante que las cervezas tratadas a [REDACTED] MPa y que las cervezas pasteurizadas térmicamente a largo plazo. Estos resultados corroboran los valores de T400 obtenidos anteriormente, lo cuales eran fueron menores en cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa que en las demás cervezas hasta el primer mes de envejecimiento acelerado ( $t_0$  y  $t_1$ ) y predecían una mejor estabilidad oxidativa. El EAP de las cervezas disminuye a medida que los compuestos antioxidantes reaccionan con la presencia de moléculas prooxidantes, evitando el avance de otras reacciones oxidativas no deseadas, típicamente implicadas en el envejecimiento de las cervezas (Bamforth & Lentini, 2009). Los principales compuestos prooxidantes son iones metálicos (p. ej. Fe o Cu) y radicales libres (p.ej. peróxido), mientras que el SO<sub>2</sub>, los polifenoles, melanoidinas presentan capacidad antioxidante (De Schutter *et al.*, 2008). Recientemente, Karabín *et al.* (2014) demostraron que una de las razones por las que el EAP cae durante la vida útil de la cerveza es por la pérdida significativa del contenido de SO<sub>2</sub>, como se verá en el apartado siguiente.

### 5.1.2.3. Anhidro sulfuroso

El anhidro sulfuroso (SO<sub>2</sub>), compuesto excretado de manera natural por la levadura durante la fermentación, ha sido descrito comúnmente como el antioxidante más eficaz en cerveza, en comparación con otros compuestos como el ácido ascórbico, tioles y compuestos fenólicos y, por lo tanto, es considerado un buen indicador de la capacidad antioxidante endógena total de la cerveza (Andersen *et al.*, 2000; Martínez-Periñan *et al.*, 2011).

El contenido de SO<sub>2</sub> se determinó en todas las cervezas después de los correspondientes tratamientos y a lo largo del envejecimiento acelerado a 35 °C. Como se muestra en la Tabla 5.8, en cerveza recién tratadas ( $t_0$ ) no se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de SO<sub>2</sub> entre las cervezas tratadas mediante UHPH (a [REDACTED] MPa) y las cervezas pasteurizadas térmicamente ( $p < 0,05$ ). Los resultados coinciden con las determinaciones del contenido endógeno de antioxidantes EAP, para los cuales tampoco se había observado diferencias significativas entre tratamientos. En este sentido se sugiere que, inicialmente ( $t_0$ ), la temperatura del tratamiento no tuvo efecto sobre los niveles de SO<sub>2</sub>, ya que todas las cervezas provienen del mismo lote de fabricación y contenían los mismos niveles de SO<sub>2</sub> antes de los tratamientos. Los resultados coinciden con los descritos en otros estudios, Lund *et al.* (2012) también observó que la pasteurización térmica no afectaba al contenido de SO<sub>2</sub> en cervezas recién tratadas en comparación con cerveza sin pasteurizar.

A pesar de que los resultados de las cervezas tratadas con UHPH (██████ MPa) no presentaran diferencias significativas entre sí, se observó una tendencia del contenido de SO<sub>2</sub> a disminuir a medida que aumentó la presión aplicada durante el tratamiento. Esta disminución coincidió con la tendencia que presentaron las cervezas tratadas con UHPH a perder capacidad antioxidante (EAP) también con el aumento de presión, como mencionado previamente. En concreto, destacar que las cervezas tratadas mediante UHPH ██████ MPa presentaron niveles de SO<sub>2</sub> menores en comparación con los demás tratamientos, lo cual podría ser indicativo de una peor estabilidad oxidativa, pero las determinaciones de T400 demostraron lo contrario, así como la evolución del contenido de SO<sub>2</sub> durante el envejecimiento de las cervezas como se describe a continuación.

**Tabla 5.8.** Estabilidad del contenido de anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) de las cervezas pasteurizadas térmicamente (PT) a 15 UP, tratadas con UHPH a ██████ MPa, a UHPH ██████ MPa y UHPH ██████ MPa durante su envejecimiento acelerado (3 meses a 35 °C)

SO <sub>2</sub> de las cervezas tratadas (µg/L) <sup>1</sup>									
Tiempo de envejecimiento acelerado a 35 °C (meses)									
Tratamiento	t <sub>0</sub>		t <sub>1</sub>		t <sub>2</sub>		t <sub>3</sub>		
PT (15 UP)	3,5 ± 0,2	ab, A	1,2 ± 0,0	a, B	0,0 ± 0,0	a, C	0,0 ± 0,0	a, C	
UHPH (200 MPa)	3,7 ± 0,1	a, A	1,3 ± 0,1	a, B	0,6 ± 0,6	ab, C	0,0 ± 0,0	a, D	
UHPH (250 MPa)	3,6 ± 0,1	ab, A	1,3 ± 0,0	a, B	0,5 ± 0,6	ab, C	0,0 ± 0,0	a, D	
UHPH (300 MPa)	3,2 ± 0,2	b, A	1,4 ± 0,2	a, B	1,5 ± 0,4	b, B	0,6 ± 0,7	b, C	

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar (n = 4)

**a-b:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna ( $p < 0,05$ )

**A-C:** La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila ( $p < 0,05$ )

### *Estabilidad del anhídrido sulfuroso durante el envejecimiento de las cervezas*

Los resultados obtenidos durante el seguimiento de las cervezas en el envejecimiento acelerado describieron cómo el contenido de SO<sub>2</sub> decrece a medida que las cervezas envejecen. En la Tabla 5.8 se muestra que, después de 1 mes de envejecimiento acelerado (t<sub>1</sub>), todas las cervezas presentaron los mismos niveles de SO<sub>2</sub>, independientemente del tratamiento aplicado. No obstante, cabe tener en cuenta que las cervezas tratadas con UHPH ██████ MPa habían partido de un contenido de SO<sub>2</sub> menor (t<sub>0</sub>), de manera que perdieron menos SO<sub>2</sub> que las demás cervezas durante el mismo periodo de tiempo (t<sub>1</sub>), e incluso no llegó a agotarse durante todo el envejecimiento (t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>). Así pues, estos resultados confirmaron que los tratamientos UHPH ██████



MPa presentan efecto positivo sobre la estabilidad del contenido de SO<sub>2</sub> de las cervezas tratadas, a pesar de haberse observado niveles más bajos al inicio del envejecimiento (t<sub>0</sub>).

Por el contrario, en el caso de las cervezas obtenidas a partir de los demás tratamientos, UHPH a [REDACTED] MPa y pasteurización térmica, perdieron la misma cantidad de SO<sub>2</sub> durante el primer mes de envejecimiento (t<sub>1</sub>) y, por lo tanto, el SO<sub>2</sub> se consumió a la misma velocidad. Mencionar que, aunque sin significancia estadística, con el avance del tiempo de envejecimiento (a t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>) se observó que las cervezas tratadas con UHPH tendieron a perder SO<sub>2</sub> a menor velocidad que las cervezas pasteurizadas térmicamente. En las cervezas pasteurizadas térmicamente el contenido de SO<sub>2</sub> se agotó completamente después de 2 meses de envejecimiento acelerado (t<sub>2</sub>) mientras que en las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa, a los 3 meses (t<sub>3</sub>). En este sentido, se sugiere que los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa también tendrían un efecto positivo sobre la estabilidad de SO<sub>2</sub> de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica.

En general, las determinaciones de SO<sub>2</sub> mostraron relación con correlación con los valores EAP obtenidos, como se ha expuesto en estudios anteriores. Otros autores han demostrado previamente que, por un lado, ambos parámetros cambiaban paralelamente a lo largo del envejecimiento de las cervezas (Andersen *et al.*, 2000; Karabín *et al.*, 2014; Kunz *et al.*, 2013; Lund *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012) y que, por el otro lado, no se observaba EAP (o fases de latencia) en cervezas sin contenido de SO<sub>2</sub> (Hoff *et al.*, 2013; Kaneda *et al.*, 1994), debido a que el SO<sub>2</sub> es el antioxidante endógeno más eficiente presente en cerveza (Andersen *et al.*, 2000). Además, en el presente estudio la velocidad de consumo de SO<sub>2</sub> y EAP coincidió con los resultados observados en las determinaciones de T400. Inicialmente (t<sub>0</sub>), las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa presentaron valores T400 significativamente menores que las demás cervezas, indicativo de una mayor estabilidad oxidativa en vida útil. Este resultado se pudo confirmar durante el seguimiento del envejecimiento acelerado, pues las cervezas tratadas con [REDACTED] MPa consumieron SO<sub>2</sub> y EAP más lentamente que las demás. Cabe destacar que las diferencias obtenidas entre los valores de T400 fueron significativas mientras que las diferencias observadas para los valores de EAP y SO<sub>2</sub> fueron tendencias, probablemente debido al efecto de la elevada temperatura del envejecimiento acelerado. En este sentido, se propone que las diferencias podrían haber resultado significativas si se hubiese ralentizado el envejecimiento de las cervezas mediante evoluciones a temperatura ambiente, más adecuadas para el seguimiento de estos parámetros y así evitar el abrupto consumo de EAP y SO<sub>2</sub> observado en solamente un mes de envejecimiento acelerado a 35 °C. En cervezas envejecidas (t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>), donde se observó niveles de EAP completamente consumidos, ya no se observaron diferencias significativas en los valores de T400 entre cervezas tratadas con tecnologías diferentes.

Así pues, la tecnología UHPH presentó un efecto positivo sobre sus niveles de SO<sub>2</sub>, principal compuesto antioxidante en cerveza, que disminuyó más lentamente en cervezas tratadas con UHPH que en las cervezas pasteurizadas térmicamente y, probablemente, que en cervezas no pasteurizadas, las cuales pierden su contenido de SO<sub>2</sub> durante su envejecimiento más rápidamente que las cervezas pasteurizadas térmicamente (Lund *et al.*, 2012). El contenido de SO<sub>2</sub> disminuye a medida que la cerveza envejece siguiendo dos mecanismos distintos. Por un lado, reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibiendo el avance en cadena de las reacciones de reducción-oxidación de radicales libres (reacciones de Fenton), contribuyendo así a la estabilidad de la calidad de la cerveza. Por otro lado, interactúa con compuestos aldehídos, responsables de notas de envejecimiento no deseadas en cerveza, para producir aductos de sulfito que enmascaran su sabor, ya que son aductos ionizados y, por lo tanto, no volátiles (Bamforth, 2011; Barker *et al.*, 1983; Lund *et al.*, 2015; Zhao, 2014). Así pues, se esperaría que las cervezas tratadas con UHPH, principalmente las tratadas [REDACTED] MPa, presentasen una calidad más estable, a nivel fisicoquímico y organoléptico.

## 5.2. Conclusiones

Los tratamientos UHPH a presiones bajas (200 MPa) no afectaron las propiedades fisicoquímicas y oxidativas de las cervezas en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP). Se obtuvieron cervezas con los mismos niveles de compuestos amargos, capacidad de retención de espuma, turbidez coloidal, color, T400, EAP y SO<sub>2</sub> después de ambos tratamientos.

Además, ambas cervezas también mantuvieron los mismos niveles de capacidad de retención de espuma, turbidez coloidal, color, T400, EAP y SO<sub>2</sub> durante todo su envejecimiento; y solamente se vieron afectados los compuestos amargos, que disminuyeron más rápidamente en cerveza tratada con UHPH a [REDACTED] MPa que en cerveza pasteurizada térmicamente. No obstante, se sugiere que estas diferencias podrían no ser percibidas a nivel sensorial por los degustadores. En este sentido, a nivel fisicoquímico y oxidativo, los tratamientos UHPH [REDACTED] MPa podrían ser una alternativa a la pasteurización térmica en el proceso de elaboración de cerveza.

Por otro lado, en el presente estudio se observó que los tratamientos UHPH a presiones mayores ([REDACTED] MPa) disminuyeron la capacidad de retención de espuma y los compuestos amargos e incrementaron la turbidez coloidal y el color de las cervezas obtenidas en comparación con la pasteurización térmica convencional (15 UP). Dicho efecto observado tendió a incrementar con el aumento de presión aplicada en el tratamiento UHPH, excepto en el caso del color donde no se encontró esta relación.

Durante el envejecimiento acelerado, todas las cervezas perdieron capacidad de retención de espuma a la misma velocidad, indicativo de que fueron igual de estables independientemente del tratamiento aplicado. En cambio, se observó que las cervezas tratadas con UHPH ([REDACTED] MPa) perdieron compuestos amargos a mayor velocidad que las pasteurizadas térmicamente y, además, siguieron presentando una turbidez coloidal mayor, aunque al cabo de los 3 meses a 35 °C alcanzaron los mismos niveles que las cervezas pasteurizadas térmicamente. Por otro lado, los tratamientos UHPH [REDACTED] MPa presentaron niveles de color más elevados, pero más estables, durante el envejecimiento que las demás cervezas.

Por último, respecto a la estabilidad oxidativa de las cervezas, se observó que las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa presentaron una mejor estabilidad oxidativa que las demás cervezas, pues se obtuvieron niveles de potencial oxidativo (T400) inferiores en cerveza recién tratada, así como durante el primer mes de envejecimiento y, consecuentemente, consumieron capacidad antioxidante endógena (EAP) y anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) más lentamente a lo largo del envejecimiento acelerado.

**Capítulo 6.** Efecto de la homogenización a ultra alta presión sobre los compuestos volátiles de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica convencional



## 6.1. Resultados y discusión

En este estudio, se evaluó el efecto de los tratamientos de homogenización a ultra alta presión (UHPH) [REDACTED] MPa sobre el perfil volátil de las cervezas, en comparación con la pasteurización térmica convencional (15 UP), tanto en cerveza recién tratada, como durante su envejecimiento. Durante la vida útil de la cerveza ocurren reacciones químicas que, en general, provocan el deterioro de compuestos volátiles deseados y valorados positivamente en la cerveza, principalmente ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído; así como la formación de otros compuestos no deseados, indicadores de envejecimiento, que influyen negativamente en el perfil sensorial de la cerveza. El seguimiento de ambos tipos de compuestos, indicadores de envejecimiento y compuestos del perfil volátil, se realizó mensualmente durante los 3 meses de envejecimiento acelerado de las cervezas tratadas con UHPH y de las cervezas pasteurizadas térmicamente. Estos resultados se presentan detalladamente en los siguientes apartados. El efecto de ambos factores, tipo de tratamiento y tiempo de envejecimiento, sobre todos los compuestos cuantificados se realizó mediante un análisis de variancia (ANOVA) multifactorial. En esta comparación múltiple, se aplicó el método de mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher para determinar tanto diferencias significativas entre tratamientos para un tiempo determinado como diferencias significativas entre tiempos de envejecimiento para un tratamiento determinado.

### 6.1.1. Formación de compuestos indicadores de envejecimiento

La estabilidad organoléptica de la cerveza puede verse comprometida por la aplicación de calor y la absorción de oxígeno, factores que catalizan la formación de compuestos no deseados y que deben ser cuidadosamente controlados durante todo el proceso de fabricación, envasado y almacenamiento de la cerveza. El análisis de compuestos indicadores de envejecimiento es comúnmente utilizado para monitorizar y evaluar el efecto de estos factores sobre la cerveza y, así, poder asegurar la estabilidad organoléptica deseada durante su envejecimiento (Feilner & Oehmichen, 2016; Herrmann et al., 2010; Vanderhaegen et al., 2006b). En el presente estudio se analizaron los compuestos indicadores de envejecimiento en cervezas recién tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa, y en cervezas recién pasteurizadas térmicamente (mes 0) así como durante los 3 meses de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ). La Tabla 6.1 muestra los compuestos indicadores de envejecimiento analizados y se clasifican según el tipo de compuesto, la causa de formación (temperatura, oxígeno u otros factores de envejecimiento) y los mecanismos y reacciones principales por los cuales se forman. En el presente estudio se incluyeron estos indicadores por ser los más comúnmente utilizados y representativos de los diferentes mecanismos de envejecimiento conocidos en cerveza.

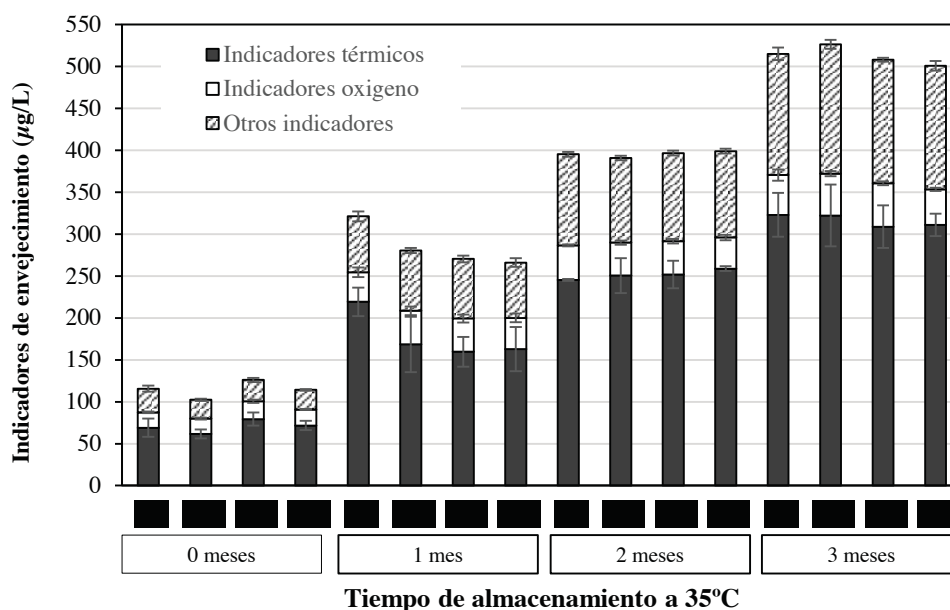
**Tabla 6.1.** Compuestos indicadores de envejecimiento analizados en las diferentes cervezas, clasificados según la categoría de indicador, tipo de compuesto y reacción de formación (De Schutter et al., 2008; Feilner & Oehmichen, 2016; Herrmann et al., 2010; Vanderhaegen et al., 2006b).

Compuestos indicadores	Categoría de indicador <sup>1</sup>	Tipo de compuesto	Reacción de envejecimiento
Furfural	E, T	Compuesto heterocíclico	Reacción de Maillard
$\gamma$ -nonalactona	E, T	Éster cíclico (lactona)	Formación de lactona
2-metilbutanal	E, O	Aldehído	Degradación de Strecker
3-metilbutanal	E, O	Aldehído	Degradación de Strecker
Benzaldehído	E, O	Aldehído	Degradación de Strecker
Fenilacetaldehído	E, O	Aldehído	Degradación de Strecker
(E)-2-nonenal	E	Aldehído	Liberación vía oxidación de lípidos, vía aductos, y condensación de aldol
5-metilfurfural	E	Compuesto heterocíclico	Reacción de Maillard
2-acetilfurano	E	Compuesto heterocíclico	Reacción de Maillard
2-propionilfurano	E	Compuesto heterocíclico	Reacción de Maillard
Nicotinato de etilo	E	Éster	Formación de éster de etilo
Succinato de dietilo	E	Éster	Formación de éster de etilo
Etilfenilacetato	E	Éster	Formación de éster de etilo

<sup>1</sup> E: compuesto indicador de envejecimiento; T: compuesto indicador de daño térmico; O: compuesto indicador de oxígeno

En la Figura 6.1 se muestra los compuestos indicadores de daño térmico totales, los compuestos indicadores de oxígeno totales y la suma de los demás compuestos indicadores de envejecimiento cuantificados en todas las cervezas tratadas, que aumentaron a medida que las cervezas envejecieron durante los 3 meses de envejecimiento acelerado. Asimismo, en la Tabla 6.2 se detallan las concentraciones individuales de cada uno de los compuestos indicadores de envejecimiento analizados. Como se observa, inicialmente el tipo de tratamiento no afectó al contenido de ninguno de los compuestos indicadores de envejecimiento, ya que no se observaron diferencias significativas entre las cervezas recién tratadas (mes 0). En este sentido, los tratamientos UHPH no provocaron un efecto negativo inicial que favoreciera el deterioro de las cervezas. A medida que envejecieron las cervezas, los compuestos indicadores aumentaron en

todas las cervezas y solamente se obtuvieron diferencias significativas entre ellas al primer mes de envejecimiento acelerado, tal y como se describe en detalle a continuación.



**Figura 6.1.** Concentración de compuestos indicadores de envejecimiento en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH (██████████) a lo largo del envejecimiento acelerado.

Al primer mes de envejecimiento acelerado, las cervezas tratadas con UHPH presentaron un menor contenido de compuestos indicadores de envejecimiento y, en particular, de compuestos indicadores térmicos (furfural y  $\gamma$ -nonalactona) en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente (Tabla 6.2, Figura 6.1). Los compuestos furfural y  $\gamma$ -nonalactona son descritos como indicadores de daño térmico ya que su formación en cerveza es catalizada con el aumento de la temperatura (Herrmann et al., 2010; Madigan et al., 1998; Vanderhaegen et al., 2006b) y, consecuentemente, la mayor formación de estos compuestos durante el proceso de pasteurización térmica evidenciaron las diferencias en impacto térmico entre ambas tecnologías. Durante la pasteurización térmica se aplicaron 15 UP (15 min a 60 °C) mientras que los tratamientos UHPH (██████████ MPa) alcanzaron mayores temperaturas (63 – 85 °C) pero durante tiempos muy cortos (0,2 segundos), equivalente a 0,01 – 12,85 UP (Capítulo 4). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos UHPH realizados a presiones diferentes (██████████ y ██████████ MPa). Cabe destacar la abundancia de estos compuestos indicadores térmicos en relación con los demás compuestos analizados, pues el furfural fue el más abundante en todas las cervezas, representando el 43 – 52 % del total de la suma de todos los compuestos de envejecimiento analizados, coincidiendo con los resultados de otros autores (Li et al., 2016; Malfliet et al., 2008; Saison et al., 2009). El furfural es un compuesto heterocíclico (aldehído) formado como producto

**Tabla 6.2.** Concentración<sup>1</sup> (ppb) de compuestos indicadores de envejecimiento en cervezas pasteurizadas térmicamente, cervezas tratadas mediante UHPH durante los 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C.

Compuesto	[Redacted]				[Redacted]			
	t0 mes	t1 mes	t2 mes	t3 mes	t0 mes	t1 mes	t2 mes	t3 mes
Furfural	23,5 ± 2,7 <sup>a,A</sup>	157,4 ± 10,4 <sup>a,B</sup>	186,2 ± 0,7 <sup>a,C</sup>	263,2 ± 25,7 <sup>a,D</sup>	23,0 ± 2,4 <sup>a,A</sup>	129,7 ± 25,3 <sup>ab,B</sup>	193,7 ± 20,6 <sup>a,C</sup>	257,5 ± 36,5 <sup>a,D</sup>
γ-nonalactona	45,6 ± 10,6 <sup>a,A</sup>	61,9 ± 13,5 <sup>a,B</sup>	59,2 ± 0,9 <sup>a,B</sup>	59,8 ± 5,3 <sup>a,B</sup>	38,7 ± 4,9 <sup>a,A</sup>	38,8 ± 21,4 <sup>b,A</sup>	56,9 ± 2,0 <sup>a,BC</sup>	64,8 ± 3,6 <sup>a,C</sup>
2-metilbutanal	2,1 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	6,0 ± 0,6 <sup>a,B</sup>	9,0 ± 0,4 <sup>a,C</sup>	13,3 ± 0,4 <sup>a,D</sup>	2,2 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	7,3 ± 1,5 <sup>b,B</sup>	8,7 ± 0,6 <sup>a,C</sup>	12,4 ± 0,6 <sup>ab,D</sup>
3-metilbutanal	8,5 ± 0,6 <sup>a,A</sup>	16,1 ± 5,5 <sup>a,B</sup>	19,4 ± 0,9 <sup>a,B</sup>	21,0 ± 6,5 <sup>a,B</sup>	8,4 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	18,9 ± 3,8 <sup>b,B</sup>	19,0 ± 2,1 <sup>a,B</sup>	24,9 ± 2,9 <sup>b,C</sup>
Benzaldehído	1,2 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>a,B</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>ab,AB</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>a,AB</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,4 ± 0,4 <sup>ab,B</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>a,AB</sup>
Fenilacetaldéhid	6,5 ± 0,7 <sup>a,A</sup>	11,0 ± 1,3 <sup>a,B</sup>	11,2 ± 0,6 <sup>a,B</sup>	11,6 ± 1,6 <sup>a,B</sup>	6,6 ± 1,0 <sup>a,A</sup>	12,3 ± 3,1 <sup>a,B</sup>	10,0 ± 1,2 <sup>a,B</sup>	11,3 ± 0,8 <sup>a,B</sup>
(E)-2-nonenal	ND <sup>a,A</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>a,B</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,C</sup>	ND <sup>a,A</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>ab,B</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,C</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a,C</sup>
5-metilfurfural	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-acetilfurano	17,0 ± 1,7 <sup>a,A</sup>	24,1 ± 4,9 <sup>a,B</sup>	33,5 ± 1,0 <sup>a,C</sup>	45,8 ± 4,1 <sup>a,D</sup>	15,2 ± 1,3 <sup>a,A</sup>	26,7 ± 0,6 <sup>a,B</sup>	32,2 ± 1,1 <sup>a,C</sup>	46,7 ± 2,0 <sup>a,D</sup>
2-propionilfurano	6,8 ± 1,1 <sup>a,AB</sup>	6,0 ± 1,4 <sup>a,A</sup>	7,7 ± 0,2 <sup>a,B</sup>	6,1 ± 0,1 <sup>a,AB</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	7,5 ± 1,4 <sup>b,B</sup>	7,7 ± 0,2 <sup>a,B</sup>	7,1 ± 0,5 <sup>a,AB</sup>
Nicotinato de etilo	2,6 ± 3,0 <sup>a,A</sup>	31,7 ± 3,2 <sup>ab,B</sup>	63,0 ± 2,8 <sup>a,C</sup>	87,6 ± 6,1 <sup>a,D</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a,A</sup>	34,1 ± 2,6 <sup>a,B</sup>	56,7 ± 2,4 <sup>bc,C</sup>	95,1 ± 5,1 <sup>b,D</sup>
Succinato dietilo	1,7 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>b,B</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a,C</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>a,C</sup>
Etilfenilacetato	0,3 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>a,C</sup>	4,0 ± 0,2 <sup>ab,D</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a,A</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>a,C</sup>	4,2 ± 0,1 <sup>b,D</sup>

(continuación)



Tabla 6.2 Continuación.

												Efecto <sup>2</sup> (valor p)		
t0 meses	t1 mes	t2 meses	t3 meses	t0 meses	t1 mes	t2 meses	t3 meses	T	t	T*t				
23,9 ± 3,0 <sup>a,A</sup>	115,4 ± 10,8 <sup>b,B</sup>	190,0 ± 16,1 <sup>a,C</sup>	249,2 ± 25,4 <sup>a,D</sup>	18,5 ± 2,4 <sup>a,A</sup>	114,7 ± 25,8 <sup>b,B</sup>	197,7 ± 2,0 <sup>a,C</sup>	250,9 ± 12,7 <sup>a,D</sup>	0,265	0,000***	0,475				
55,4 ± 7,2 <sup>a,A</sup>	44,2 ± 13,9 <sup>b,A</sup>	61,9 ± 2,5 <sup>a,B</sup>	59,8 ± 1,1 <sup>a,AB</sup>	53,3 ± 4,8 <sup>a,A</sup>	48,2 ± 5,6 <sup>b,A</sup>	61,2 ± 2,0 <sup>a,B</sup>	60,2 ± 3,7 <sup>a,B</sup>	0,002***	0,000***	0,048**				
2,6 ± 0,6 <sup>a,A</sup>	7,3 ± 1,1 <sup>b,B</sup>	8,7 ± 0,4 <sup>a,C</sup>	11,0 ± 0,7 <sup>b,D</sup>	2,5 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	6,9 ± 1,6 <sup>ab,B</sup>	8,6 ± 0,9 <sup>a,C</sup>	11,4 ± 0,9 <sup>b,D</sup>	0,678	0,000***	0,009***				
9,9 ± 1,7 <sup>a,A</sup>	18,9 ± 2,6 <sup>b,B</sup>	18,0 ± 2,0 <sup>a,B</sup>	20,3 ± 2,0 <sup>ab,B</sup>	9,5 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	17,9 ± 3,9 <sup>b,B</sup>	16,2 ± 3,1 <sup>a,B</sup>	15,9 ± 1,8 <sup>c,B</sup>	0,061	0,000***	0,108				
1,1 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>ab,B</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>ab,AB</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>b,B</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>b,B</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>b,AB</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>ab,B</sup>	0,011**	0,000***	0,083				
7,7 ± 0,7 <sup>a,A</sup>	11,7 ± 3,6 <sup>a,B</sup>	11,4 ± 1,7 <sup>a,B</sup>	18,5 ± 1,1 <sup>b,C</sup>	6,3 ± 0,4 <sup>a,A</sup>	10,8 ± 3,0 <sup>a,B</sup>	11,0 ± 0,7 <sup>a,BC</sup>	13,4 ± 0,3 <sup>a,C</sup>	0,002***	0,000***	0,004***				
ND <sup>a,A</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>b,B</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	ND <sup>a,A</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>b,B</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	0,076	0,000***	0,089				
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
15,3 ± 1,0 <sup>a,A</sup>	26,7 ± 1,0 <sup>a,B</sup>	32,8 ± 1,3 <sup>a,C</sup>	40,4 ± 1,2 <sup>b,D</sup>	15,6 ± 0,8 <sup>a,A</sup>	26,6 ± 0,3 <sup>a,B</sup>	35,7 ± 1,0 <sup>a,C</sup>	47,7 ± 3,8 <sup>a,D</sup>	0,015**	0,000***	0,006***				
6,4 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	7,9 ± 1,7 <sup>b,B</sup>	7,6 ± 0,3 <sup>a,AB</sup>	6,9 ± 0,6 <sup>a,AB</sup>	6,2 ± 0,4 <sup>a,A</sup>	7,8 ± 1,7 <sup>b,B</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a,B</sup>	6,7 ± 0,2 <sup>a,AB</sup>	0,484	0,002***	0,262				
1,7 ± 2,0 <sup>a,A</sup>	33,3 ± 3,4 <sup>a,B</sup>	60,8 ± 2,6 <sup>ab,C</sup>	95,0 ± 1,8 <sup>b,D</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a,A</sup>	28,8 ± 5,0 <sup>b,B</sup>	55,7 ± 2,6 <sup>a,C</sup>	88,0 ± 4,3 <sup>a,D</sup>	0,002***	0,000***	0,048**				
1,7 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>a,AB</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>a,B</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	1,4 ± 0,0 <sup>a,A</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	0,000***	0,000***	0,000***				
0,3 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>a,C</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>ac,D</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a,A</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>b,B</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>b,C</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>c,D</sup>	0,000***	0,000***	0,011**				

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar. <sup>2</sup> T: tratamiento; t: tiempo de evolución; T\*t: tratamiento\*tiempo. **ND**: compuesto no detectado. **a-c**: La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna según prueba LSD ( $p < 0,05$ ). **A-D**: La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila según prueba LSD ( $p < 0,05$ ). \*\* Efecto significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*\* Efecto significativo ( $p < 0,01$ ).

intermediario en el desencadenamiento de las reacciones de Maillard, que puede seguir reaccionando produciendo melanoidinas, pigmentos de coloración marrón de alto peso molecular. (Vanderhaegen et al., 2006b). En cambio, la  $\gamma$ -nonalactona se forma a través de la oxidación de lípidos.

En cuanto a los demás compuestos indicadores de envejecimiento (no térmicos), también se vieron afectados por el tipo de tratamiento al primer mes de envejecimiento acelerado, aunque principalmente dependiendo de su naturaleza química. La pasteurización térmica favoreció una mayor formación de ésteres de etilo, (E)-2-nonenal y de algunos aldehídos de Strecker que los tratamientos UHPH, mientras que los demás aldehídos de Strecker y los compuestos heterocíclicos se detectaron en mayores concentraciones en cervezas tratadas con UHPH que en cervezas pasteurizadas térmicamente.

Los ésteres nicotinato de etilo, succinato de dietilo y etilfenilacetato se detectaron a concentraciones menores en cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa que en cervezas pasteurizadas térmicamente. Estos ésteres de etilo son comúnmente descritos como compuestos indicadores de envejecimiento ya que aumentan en cerveza con el paso del tiempo y están relacionados con la aparición de sabores no deseados, aportando notas medicinales, a disolvente, dulces e incluso florales (Anexo: Tabla A.1). En el caso del succinato de dietilo, se detectó a concentraciones inferiores en todas las cervezas tratadas con UHPH (1,4 – 1,6 ppb) en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente (3,1 ppb), sugiriendo que la temperatura de la pasteurización térmica también pudo haber favorecido la formación de este compuesto. En cambio, en el caso del etilfenilacetato y el nicotinato de etilo, también se obtuvieron concentraciones significativamente inferiores en cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa (1,5 y 28,8 ppb, respectivamente) mientras que no se observaron diferencias significativas entre las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa y las pasteurizadas térmicamente (nicotinato de etilo: 31,7 – 34,1 ppb; etilfenilacetato: 1,8 – 1,9 ppb), indicando que presentaron una peor estabilidad que las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos previamente, en los que se demostró que las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] Pa presentaba una mejor estabilidad oxidativa, según su potencial de formación de radicales (T400), que las demás cervezas (*Capítulo 5*).

Respecto al aldehído (E)-2-nonenal, también se detectaron niveles menores en cervezas tratadas con UHPH (0,2 – 0,3 ppb) que en cervezas pasteurizadas térmicamente (0,4 ppb). El (E)-2-nonenal se produce a partir de la oxidación de lípidos durante la ebullición del mosto y es liberado de su unión a aductos mediante procesos no oxidativos durante el envejecimiento de la cerveza (Lermusieau et al., 1999; Vanderhaegen et al., 2006b). Previamente a todos los tratamientos realizados, las cervezas procedían del mismo lote de fabricación (es decir, del mismo mosto

común) por lo cual contenían los mismos niveles de precursores que potencialmente podrían liberar (E)-2-nonenal después de los tratamientos, durante su envejecimiento. La pasteurización térmica favoreció su liberación.

En el caso de los aldehídos de Strecker, los resultados dependieron de cada compuesto individual. Las cervezas tratadas con UHPH (██████) MPa mostraron un contenido de benzaldehído y fenilacetaldehído menor (1,3 ppb y 10,8 ppb, respectivamente) que las cervezas pasteurizadas térmicamente (1,8 ppb y 11,0 ppb, respectivamente), aunque las diferencias fueron significativas solamente para el benzaldehído. Por el contrario, los niveles de los compuestos 2-metilbutanal y 3-metilbutanal fueron significativamente mayores en cervezas tratadas con UHPH (6,9 – 7,3 ppb y 17,9 – 18,9, respectivamente, en función de la presión aplicada) que en cervezas pasteurizadas térmicamente (6,0 ppb y 16,1 ppb, respectivamente). La principal reacción de formación de aldehídos es la degradación de Strecker de aminoácidos, reacción de transaminación entre un aminoácido y un compuesto  $\alpha$ -dicarbonil, estos últimos generados durante reacciones de Maillard. No obstante, también pueden ser formados por otros mecanismos como, por ejemplo, a partir de alcoholes superiores, isohumulonas, polifenoles e incluso liberados a partir de aductos de imina o bisulfito previamente formados durante el proceso cervecero. De hecho, se ha reportado que un 15% del total de aldehídos de degradación de Strecker presentes en cerveza envejecida pueden formarse durante el envejecimiento de la cerveza mientras que aproximadamente el 85% puede ser liberados de aductos previamente formados durante la fabricación del mosto, aunque varió considerablemente dependiendo de cada aldehído individual (Baert et al., 2012; Gibson et al., 2018; Vanderhaegen et al., 2006b). Así pues, la complejidad en mecanismos de formación y en el comportamiento de los diferentes aldehídos de Strecker explicaría que los tratamientos presentasen efectos diferentes para cada compuesto individual.

En cuanto a los compuestos heterocíclicos propionilfurano y 2-acetilfurano, se detectaron a concentraciones mayores en cervezas tratadas con UHPH (██████████) que en cervezas pasteurizadas térmicamente, aunque la diferencia fue significativa solamente para el propionilfurano. A diferencia del furfural, también compuesto heterocíclico, la temperatura de la pasteurización térmica no favoreció su formación, coincidiendo con la bibliografía, pues no han sido descritos como indicadores de daño térmico (De Schutter *et al.*, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2006).

Por último, a medida que las cervezas envejecieron con el tiempo ( $t_2$  y  $t_3$ ) no se siguieron observando diferencias entre los niveles de compuestos indicativos de envejecimiento de cervezas pasteurizadas térmicamente y las tratadas con UHPH. De hecho, se observó cómo algunos compuestos alcanzaron su máxima concentración después del primer mes sin aumentar durante los 3 meses de evolución (benzaldehído, (E)-2-nonenal, succinato de dietilo, 2-propionilacetato).

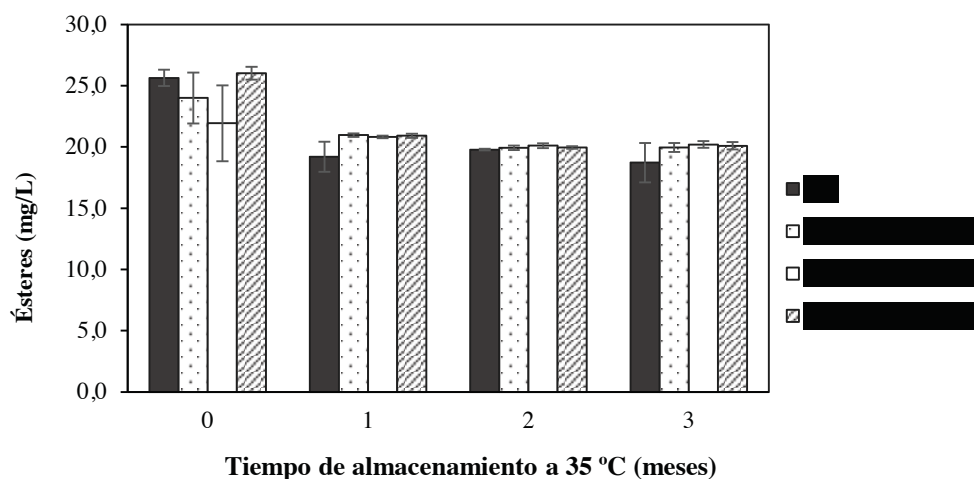
Los almacenamientos a 35 °C aceleraron el envejecimiento de las cervezas a una velocidad que dificultó observar diferencias en las cinéticas de formación de estos compuestos. Almacenamientos a temperaturas menores, por ejemplo, a temperatura ambiente (22 °C), habrían permitido observar más claramente las diferencias de velocidad de formación de estos compuestos entre ambas cervezas, aunque requiriendo el seguimiento de las cervezas durante más meses. Asimismo, para los compuestos que aumentaron después de 2 y 3 meses de almacenamiento (furfural, 2-metilbutanal, 2-acetilfurano, etilfenilacetato, nicotinato de etilo), no se observaron diferencias entre tratamientos, probablemente, debido al avanzado estado de envejecimiento de las cervezas, coincidiendo con los resultados de estabilidad oxidativa (EAP, T400 y SO<sub>2</sub>) (*Capítulo 5*).

### **6.1.2. Evolución de compuestos volátiles durante el envejecimiento de las cervezas**

#### **6.1.2.1. Ésteres**

Los ésteres son compuestos volátiles producidos por la levadura durante la fermentación que aportan notas afrutadas, reconocidas como agradables y deseadas en cervezas frescas. Desafortunadamente, estos compuestos se pierden durante el envejecimiento de las cervezas, mediante reacciones de hidrólisis química y enzimática (De Schutter *et al.*, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2006). En la Figura 6.2 se muestra la suma de los ésteres analizados en todas las cervezas durante los 3 meses de envejecimiento acelerado. Como se observa, inicialmente no se obtuvieron diferencias significativas entre cervezas tratadas con UHPH y cervezas pasteurizadas térmicamente. En cambio, durante el primer mes de envejecimiento acelerado, las cervezas pasteurizadas térmicamente presentaron un contenido de ésteres significativamente inferior a las cervezas tratadas con UHPH, periodo durante el cual se observó en todas las cervezas la mayor pérdida de ésteres de toda la evolución. Después de 2 y 3 meses de evolución no se observaron diferencias significativas entre las cervezas, aunque las pasteurizadas térmicamente tendieron a seguir presentando una concentración de ésteres menor que las tratadas con UHPH.

En la Tabla 6.4 se detallan las concentraciones individuales de cada uno de los ésteres analizados y se observa que el acetato de etilo fue el éster más abundante en todas las cervezas, presente a concentraciones de 16,20 – 20,88 ppm y representando entre el 80 - 90 % del total de ésteres. Estos resultados coinciden con los descritos anteriormente en otros estudios, que cuantifican el acetato de etilo a niveles de 8 – 20 ppm en cerveza (Briggs *et al.*, 2004; Malfliet *et al.*, 2008). La Tabla 6.4 también muestra los resultados del ANOVA, así como si existieron diferencias significativas entre las diferentes cervezas según el tratamiento aplicado y/o el tiempo de envejecimiento acelerado.



**Figura 6.2.** Concentración de ésteres totales en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con [redacted] a lo largo del envejecimiento acelerado.

Por un lado, el ANOVA evidenció que el factor tiempo presentó efecto sobre todos los ésteres individuales ( $p < 0,05$ ), ya que decrecieron durante la evolución de las cervezas, a excepción del caproato de etilo que se mantuvo constante. La estabilidad del caproato de etilo no se ha podido relacionar con estudios reportados previamente, en los cuales este compuesto también decrece durante el envejecimiento de la cerveza (Cao *et al.*, 2011; Hiralal *et al.*, 2013; Malfliet *et al.*, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2003, 2007). En cerveza, la mayoría de ésteres son hidrolizados químicamente, catalizados por la presencia de ácidos orgánicos, y enzimáticamente, mediante la actividad de esterasas liberadas por la lisis celular de la levadura durante la fermentación y maduración de la cerveza (De Schutter *et al.*, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2006b). Por otro lado, el ANOVA mostró que el tipo de tratamiento presentó efecto sobre los ésteres acetato isobutilo, acetato de isoamilo, caprilato etilo, caprato etilo y acetato de  $\beta$ -feniletanol, mientras que el tratamiento\*tiempo afectó al éster acetato de etilo ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.4).

En concreto, las cervezas recién tratadas ( $t_0$ ) con UHPH a [redacted] presentaron concentraciones de caprilato de etilo y caprato de etilo significativamente inferiores que las demás cervezas ( $p < 0,05$ ). Esta diferencia se siguió observando durante el envejecimiento solamente para el caprilato de etilo, mientras que en el caso del caprato de etilo no se volvieron a detectar. En cambio, en cuanto a los demás ésteres analizados, las cervezas recién tratadas con UHPH a [redacted] MPa no presentaron diferencias significativas en comparación con las cervezas recién pasteurizadas térmicamente, pero ambas cervezas contenían concentraciones de ésteres mayores que las recién tratadas con UHPH a [redacted] MPa. Las cervezas tratadas con UHPH [redacted] MPa presentaron concentraciones de ésteres inferiores a todas las demás cervezas, estas diferencias

**Tabla 6.3.** Concentración<sup>1</sup> (ppm) de compuestos volátiles (acetaldehído, ésteres y alcoholes superiores) en cervezas pasteurizadas térmicamente, cervezas tratadas mediante UHPH [REDACTED] durante los 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C.

Compuesto	[REDACTED]							
	t0 meses	t1 mes	t2 meses	t3 meses	t0 meses	t1 mes	t2 meses	t3 meses
<i>Ésteres</i>								
Acetato etilo	20,40 ± 0,65 <sup>a,A</sup>	16,58 ± 1,19 <sup>a,B</sup>	17,15 ± 0,07 <sup>a,B</sup>	16,20 ± 1,61 <sup>a,B</sup>	19,75 ± 1,76 <sup>ab,A</sup>	18,38 ± 0,13 <sup>a,AB</sup>	17,53 ± 0,17 <sup>a,B</sup>	17,70 ± 0,37 <sup>a,AB</sup>
Acetato isobutilo	0,12 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a,BC</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>ab,B</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>a,C</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>ab,A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a,BC</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a,C</sup>
Acetato de isoamilo	1,97 ± 0,06 <sup>a,A</sup>	1,54 ± 0,27 <sup>ab,B</sup>	1,54 ± 0,00 <sup>a,B</sup>	1,46 ± 0,04 <sup>a,B</sup>	1,95 ± 0,08 <sup>a,A</sup>	1,53 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	1,34 ± 0,01 <sup>b,C</sup>	1,23 ± 0,03 <sup>b,C</sup>
Ac. de β-feniletanol	0,75 ± 0,06 <sup>a,A</sup>	0,57 ± 0,15 <sup>a,B</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a,B</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a,B</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a,A</sup>	0,55 ± 0,06 <sup>a,B</sup>	0,55 ± 0,06 <sup>a,B</sup>	0,50 ± 0,00 <sup>b,B</sup>
Propionato etilo	0,15 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>a,B</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a,AB</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>ab,A</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a,A</sup>
Butirato etilo	1,99 ± 0,10 <sup>a,A</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a,B</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	1,05 ± 1,11 <sup>b,A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>a,B</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,B</sup>
Caproato etilo	0,09 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>ab,A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>b,A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>a,A</sup>
Caprilato etilo	0,13 ± 0,03 <sup>a,A</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a,B</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a,C</sup>	0,08 ± 0,03 <sup>ab,AB</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b,A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>b,B</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b,C</sup>
Caprato de etilo	0,03 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>b,A</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a,B</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a,B</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a,B</sup>
<i>Alcoholes superiores</i>								
Isobutanol	23,3 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	23,5 ± 0,3 <sup>ab,A</sup>	23,4 ± 0,1 <sup>ab,A</sup>	24,1 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	23,5 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	23,7 ± 0,2 <sup>b,A</sup>	23,6 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	23,9 ± 0,3 <sup>a,A</sup>
Isoamilico	92,35 ± 2,07 <sup>a,A</sup>	95,03 ± 2,92 <sup>a,BC</sup>	93,40 ± 0,71 <sup>ab,AB</sup>	96,77 ± 1,31 <sup>a,C</sup>	93,80 ± 0,92 <sup>a,A</sup>	94,63 ± 0,90 <sup>ab,A</sup>	94,70 ± 0,51 <sup>b,B</sup>	96,23 ± 1,37 <sup>a,B</sup>
β-Feniletanol	39,5 ± 3,3 <sup>a,A</sup>	25,6 ± 7,2 <sup>a,B</sup>	22,4 ± 0,4 <sup>a,B</sup>	21,4 ± 7,9 <sup>a,B</sup>	26,9 ± 8,3 <sup>b,A</sup>	20,2 ± 1,2 <sup>a,A</sup>	21,5 ± 0,7 <sup>a,A</sup>	20,2 ± 1,2 <sup>a,AB</sup>
<i>Acetaldehído</i>								
Acetaldehído	6,08 ± 0,17 <sup>ac,A</sup>	5,78 ± 0,39 <sup>a,A</sup>	6,20 ± 0,00 <sup>a,A</sup>	5,87 ± 0,42 <sup>ac,A</sup>	6,67 ± 0,98 <sup>b,A</sup>	6,28 ± 0,19 <sup>b,AB</sup>	6,03 ± 0,21 <sup>a,B</sup>	6,68 ± 0,26 <sup>b,A</sup>

(continuación)

Tabla 6.3 Continuación.

t0 meses					t0 meses	t1 mes	t2 meses	t3 meses	Efecto <sup>2</sup> (valor p)		
	t1 mes	t2 meses	t3 meses	T					t	T*t	
18,10 ± 2,90 <sup>b, A</sup>	18,05 ± 0,10 <sup>a, A</sup>	17,45 ± 0,17 <sup>a, A</sup>	17,48 ± 0,26 <sup>a, A</sup>	20,88 ± 0,50 <sup>a, A</sup>	18,15 ± 0,17 <sup>a, B</sup>	17,28 ± 0,10 <sup>a, B</sup>	17,38 ± 0,30 <sup>a, B</sup>	0,085	0,000***	0,025**	
0,11 ± 0,02 <sup>b, A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>ab, A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>b, A</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b, B</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>b, B</sup>	0,002***	0,000***	0,021**	
1,77 ± 0,27 <sup>b, A</sup>	1,68 ± 0,03 <sup>bc, AB</sup>	1,59 ± 0,03 <sup>a, B</sup>	1,57 ± 0,06 <sup>a, B</sup>	1,98 ± 0,05 <sup>a, A</sup>	1,72 ± 0,04 <sup>c, B</sup>	1,61 ± 0,02 <sup>a, B</sup>	1,59 ± 0,06 <sup>a, B</sup>	0,000***	0,000***	0,002***	
0,65 ± 0,06 <sup>a, A</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,55 ± 0,06 <sup>a, A</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>a, A</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,68 ± 0,05 <sup>a, AB</sup>	0,003***	0,000***	0,108	
0,13 ± 0,04 <sup>b, A</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>a, AB</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>a, AB</sup>	0,919	0,015**	0,223	
0,99 ± 1,06 <sup>b, A</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>a, B</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>a, B</sup>	2,00 ± 0,12 <sup>a, A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>a, B</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,151	0,000***	0,070	
0,08 ± 0,02 <sup>b, A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>b, A</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>ab, A</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>ab, A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>a, A</sup>	0,175	0,203	0,144	
0,10 ± 0,02 <sup>c, AB</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>ab, AB</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>c, B</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>d, A</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>b, B</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>c, B</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>d, AB</sup>	0,000***	0,000***	0,000***	
0,03 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a, B</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a, B</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>c, A</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>a, A</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a, A</sup>	0,000***	0,000***	0,004***	
23,5 ± 0,1 <sup>a, AB</sup>	23,7 ± 0,1 <sup>b, A</sup>	23,2 ± 0,4 <sup>ab, B</sup>	23,9 ± 0,2 <sup>a, A</sup>	23,5 ± 0,4 <sup>a, AB</sup>	23,2 ± 0,3 <sup>a, BC</sup>	23,1 ± 0,3 <sup>b, C</sup>	23,8 ± 0,1 <sup>a, A</sup>	0,131	0,000***	0,207	
93,05 ± 0,64 <sup>a, AB</sup>	95,00 ± 0,73 <sup>a, AB</sup>	92,35 ± 2,71 <sup>a, B</sup>	95,58 ± 0,79 <sup>a, A</sup>	93,78 ± 2,03 <sup>a, AB</sup>	92,63 ± 1,94 <sup>b, A</sup>	91,53 ± 1,51 <sup>a, A</sup>	95,68 ± 0,39 <sup>a, B</sup>	0,093	0,000***	0,261	
28,4 ± 16,9 <sup>b, A</sup>	16,4 ± 3,1 <sup>a, B</sup>	28,5 ± 12,4 <sup>a, A</sup>	21,9 ± 1,2 <sup>a, AB</sup>	34,6 ± 4,6 <sup>ab, A</sup>	20,7 ± 4,9 <sup>a, B</sup>	30,6 ± 0,9 <sup>a, A</sup>	20,4 ± 2,2 <sup>a, B</sup>	0,117	0,000***	0,299	
6,28 ± 0,39 <sup>ab, A</sup>	5,93 ± 0,21 <sup>ab, A</sup>	6,05 ± 0,24 <sup>a, A</sup>	6,35 ± 0,24 <sup>ab, A</sup>	5,75 ± 0,31 <sup>c, A</sup>	5,73 ± 0,22 <sup>a, A</sup>	5,80 ± 0,12 <sup>a, A</sup>	5,70 ± 0,08 <sup>c, A</sup>	0,000***	0,111	0,291	

<sup>1</sup> Media ± desviación estándar. <sup>2</sup> T: tratamiento; t: tiempo de evolución; T\*t: tratamiento\*tiempo. **ND**: compuesto no detectado. **a-c**: La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma columna según prueba LSD ( $p < 0,05$ ). **A-D**: La misma letra indica que no hay diferencias significativas entre valores de la misma fila según prueba LSD ( $p < 0,05$ ). \*\* Efecto significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*\* Efecto significativo ( $p < 0,01$ ).

fueron significativas para algunos compuestos mientras que para otros solamente se observó una tendencia.

No obstante, a medida que las cervezas perdieron ésteres durante el envejecimiento acelerado ( $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ), estas diferencias no se mantuvieron y, en cambio, sí que se evidenciaron diferencias entre cervezas tratadas con UHPH y cervezas pasteurizadas térmicamente. En concreto, las cervezas tratadas con UHPH, sobre todo las tratadas a mayor presión, tendieron a conservar mayores concentraciones de ésteres de acetato que las cervezas pasteurizadas térmicamente. El acetato de isoamilo se detectó a mayores concentraciones en cervezas tratadas con UHPH [redacted] MPa [redacted] MPa que en cervezas tratadas con UHPH [redacted] MPa y que en cervezas pasteurizadas térmicamente, aunque estas diferencias fueron significativas solamente después del primer mes de evolución ( $t_1$ ). Asimismo, la concentración de acetato de isobutilo también fue superior en cervezas tratadas con UHPH [redacted] MPa [redacted] MPa que en las demás cervezas, aunque esta diferencia fue significativa solamente después del segundo y tercer mes de evolución ( $t_2$  y  $t_3$ ). En cuanto al acetato de etilo, también se detectó en cervezas tratadas con UHPH ([redacted] MPa) a concentraciones mayores que en cervezas pasteurizadas térmicamente durante toda la evolución (sin significancia estadística). Estudios previos han demostrado que la pasteurización térmica inhibe la actividad de las esterasas y, consecuentemente, minimiza la hidrólisis enzimática de ésteres durante el envejecimiento de cervezas pasteurizada (De Schutter et al., 2008; Vanderhaegen et al., 2006b). En este sentido, se sugiere que los tratamientos UHPH habrían presentado, como mínimo, el mismo efecto inhibitorio sobre las esterasas que la pasteurización térmica convencional. Dicho efecto tendió a incrementar de forma proporcional con el aumento de la presión aplicada en el tratamiento UHPH, siendo mayor a [redacted] MPa que a [redacted] MPa y [redacted] MPa.

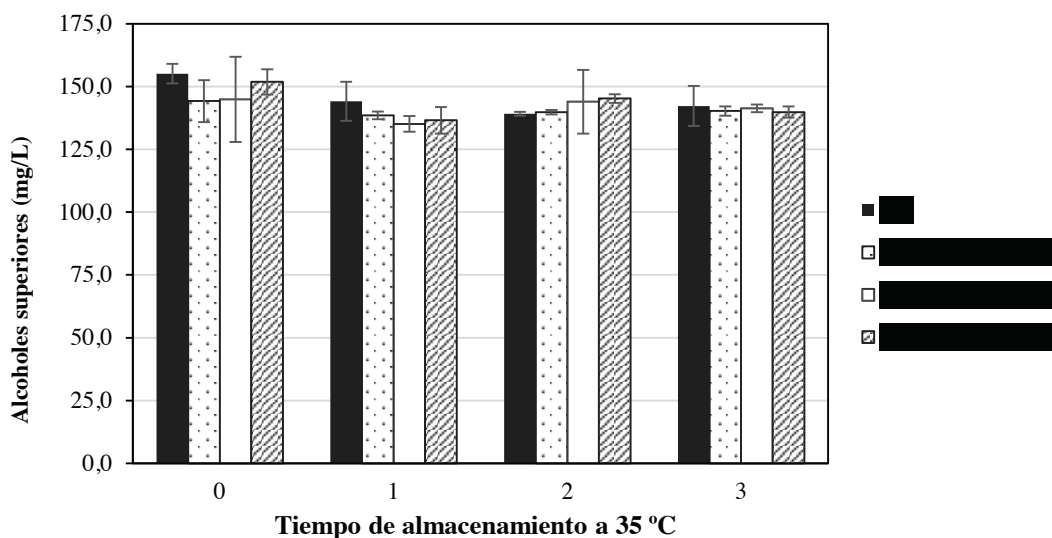
#### **6.1.2.2. Alcoholes superiores**

A parte del etanol, durante la fermentación también se forman alcoholes superiores que contribuyen al perfil volátil de la cerveza. Los alcoholes superiores aportan notas alcohólicas, maltosas, dulces y afrutadas que resultan agradables en cervezas frescas, pero también se ven comprometidos durante el envejecimiento de la cerveza (Briggs et al., 2004; Vanderhaegen et al., 2006b).

En la Figura 6.3 se muestra la suma de los alcoholes superiores analizados en todas las cervezas durante los 3 meses de envejecimiento acelerado. Como se observa, inicialmente, en cervezas recién tratadas se obtuvieron concentraciones de alcoholes superiores mayores que después de 1, 2 y 3 meses de evolución ( $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ), aunque estas diferencias no fueron significativas en todas las



cervezas. Los alcoholes superiores se degradan mediante la oxidación de melanoidinas como intermediarias para formar aldehídos (Briggs et al., 2004; Vanderhaegen et al., 2006b). Asimismo, la Figura 6.3 también muestra que inicialmente y durante todo el envejecimiento acelerado no se obtuvieron diferencias significativas entre cervezas tratadas con UHPH y cervezas pasteurizadas térmicamente, a excepción de después de 2 meses de envejecimiento, que las tratadas con UHPH a ██████████ conservaron concentraciones de alcoholes superiores significativamente mayores que las cervezas pasteurizadas térmicamente y que las tratadas con UHPH a ██████ MPa.



**Figura 6.3.** Concentración de alcoholes superiores totales en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH a ██████████ a lo largo del envejecimiento acelerado.

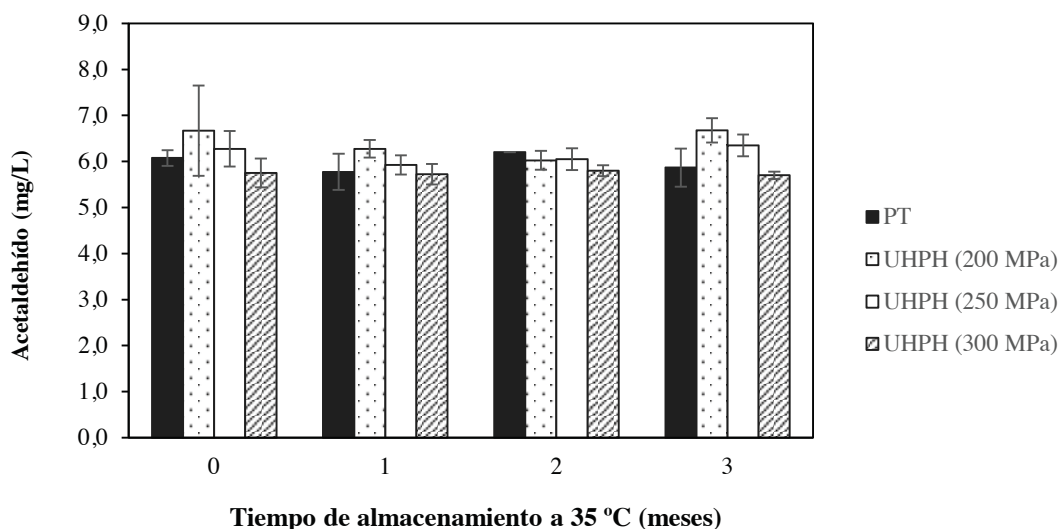
En la Tabla 6.3 se muestra las concentraciones individuales de cada uno de los alcoholes superiores analizados en las cervezas durante toda la evolución. Como se observa, el alcohol isoamílico fue el alcohol más abundante en todas las cervezas, presentes en un rango de 91,53 – 96,77 ppm y representando el 60 – 70 % del total de alcoholes superiores analizados. Estos resultados coinciden con los descrito en estudios anteriores que lo cuantifican en un rango de 32 – 169 ppm en cerveza (Briggs *et al.*, 2004; Malfliet *et al.*, 2008). El ANOVA mostró que el tipo de tratamiento no afectó a la concentración de alcoholes, sino que solamente se vio influenciada por el factor tiempo de evolución ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.3). Asimismo, el análisis LSD demuestra que no se encontraron diferencias significativas consistentes en las concentraciones de alcoholes entre cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas tratadas con UHPH, ni se puede concluir que el isobutanol, el isoamílico y el  $\beta$ -feniletanol presentaron el mismo comportamiento, incrementando o decreciendo, durante toda la evolución (Tabla 6.3). En general, los alcoholes superiores decrecen ligeramente durante el envejecimiento de la cerveza, probablemente debido

a que estos alcoholes generan los aldehídos correspondientes mediante la oxidación de melanoidinas como intermediario (Bamforth & Lentini, 2009; Vanderhaegen *et al.*, 2006a). A pesar de ello, los resultados del presente estudio corresponden más con los obtenidos por Cao *et al.* (2011) y Malfliet *et al.* (2008), que no observaron pérdida de alcoholes superiores. Cao *et al.*, (2011) reportaron que el contenido de isobutanol y alcohol isoamílico aumentó o disminuyó ligeramente durante el envejecimiento de la cerveza (6 meses a temperatura ambiente) dependiendo de las UPs aplicadas durante la pasteurización térmica (2, 8 o 14 UPs), pero sin mostrar una correlación lógica con la cantidad de UPs aplicadas. Malfliet *et al.* (2008) concluyó que los alcoholes superiores no variaron durante el envejecimiento de las cervezas analizadas (9 meses a 22 °C, 2 meses a 30 °C), ya que en algún caso aumentaron ligeramente mientras que en otros disminuyeron ligeramente.

### 6.1.2.3. Acetaldehído

El acetaldehído es el aldehído más común en cerveza, excretado por la levadura durante los primeros días de fermentación y reducido posteriormente durante la maduración de la cerveza, ampliamente conocido por aportar notas de sabor a manzana verde. En la Figura 6.4 se muestra la concentración de acetaldehído obtenida en todas las cervezas durante los 3 meses de envejecimiento acelerado. Se obtuvieron concentraciones en un rango de 5,70 – 6,67 ppm, valores que se encuentran dentro de lo esperado en cervezas *lager*, que contienen típicamente niveles de 0 a 13 ppm de acetaldehído (Briggs *et al.*, 2004).

En general, tanto inicialmente como durante el envejecimiento acelerado de las cervezas, no se observaron diferencias significativas entre cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas tratadas con UHPH. En las cervezas tratadas con UHPH (██████████ MPa) existió una relación directa entre la concentración de acetaldehído y la presión aplicada en los tratamientos, pues se observó una tendencia a presentar niveles de acetaldehído menores al aumentar la presión de tratamiento de ██████████ MPa (Figura 6.4). Estos resultados se corroboraron con el ANOVA pues indicó que el tipo de tratamiento presentó efecto sobre la concentración de acetaldehído ( $p < 0,05$ ), mientras que el tiempo de evolución no influyó (Tabla 6.3). En contra de los resultados obtenidos, estudios previos han demostrado que los niveles de acetaldehído aumentan durante el envejecimiento de la cerveza (C. Liu *et al.*, 2018; Saison *et al.*, 2009), ya que son generados mediante la oxidación de alcoholes superiores en presencia de melanoidinas. No obstante, en este estudio tampoco se observó que los alcoholes superiores disminuyeran durante el envejecimiento acelerado, por lo cual estaría en concordancia con el comportamiento observado de los niveles de acetaldehído.



**Figura 6.4.** Concentración de acetaldehído en cervezas pasteurizadas térmicamente (PT), tratadas con UHPH a [redacted] MPa a lo largo del envejecimiento acelerado.

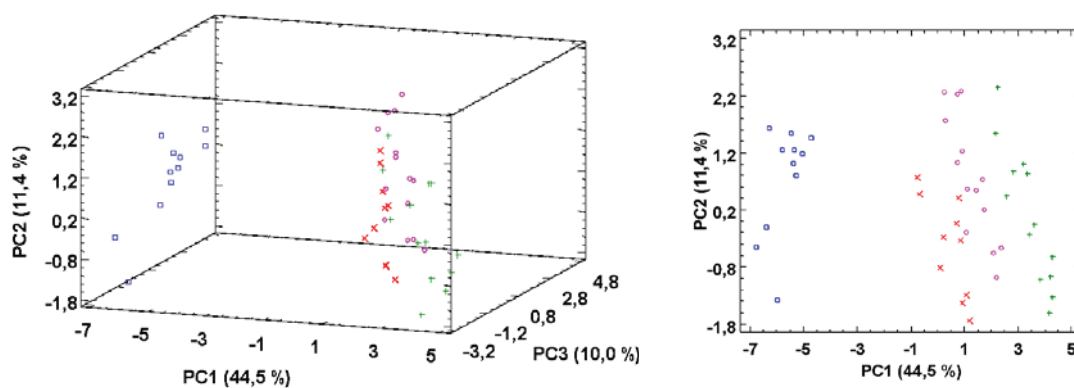
### 6.1.3. Análisis de componentes principales del perfil volátil de las cervezas tratadas

En el apartado anterior se evaluaron un total de 26 compuestos indicadores de envejecimiento y compuestos volátiles (ésteres y alcoholes superiores, acetaldehído). En este apartado, el análisis de componentes principales (ACP) permitió reducir el número de variables (compuestos analizados) en tres componentes principales, así como ordenarlas por importancia con el objetivo de evaluar qué compuestos presentaron un mayor impacto y describieron gran parte de la variabilidad observada entre las cervezas obtenidas con tratamientos diferentes. El análisis ACP se realizó con las concentraciones obtenidas de todos los compuestos analizados en cervezas recién tratadas – con UHPH a [redacted] MPa y pasteurización térmica – y durante los 3 meses de envejecimiento acelerado ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ). A continuación, se discuten los resultados obtenidos en función del tipo de tratamiento y en función del tiempo de envejecimiento acelerado.

#### 6.1.3.1. Efecto del tiempo de envejecimiento acelerado

La Figura 6.5 muestra la distribución de las cervezas obtenidas respecto a los tres primeros componentes principales, en función del tiempo que han estado en condiciones de envejecimiento acelerado. Se observa que los tres primeros componentes principales (PC1, PC2 y PC3) definieron el 65,9 % de la variabilidad existente entre las cervezas y, en concreto, el componente principal PC1 (44,5 % de la variabilidad) permitió distinguir las cervezas en grupos diferentes en función del tiempo que habían sido sometidas a envejecimiento acelerado ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ). En concreto, las cervezas se representaron ordenadamente, de menor a mayor tiempo de envejecimiento acelerado,

a lo largo del eje PC1 y las cervezas evolucionadas después de 1, 2 y 3 meses de evolución se representan más próximas entre si que las cervezas frescas ( $t_0$ ). Así pues, el tiempo de evolución presentó efecto sobre la variabilidad del perfil aromático de las cervezas, siendo las cervezas frescas más diferentes en composición que las cervezas evolucionadas.

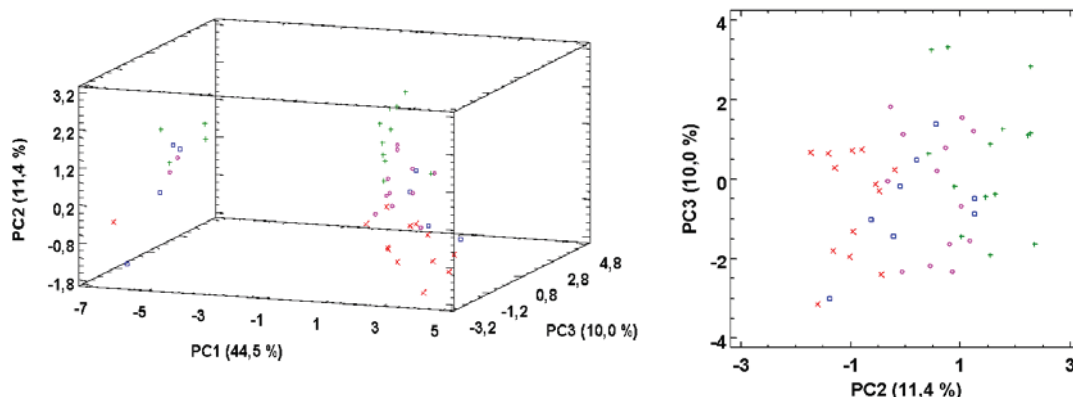


**Figura 6.5.** Representación de las cervezas obtenidas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tiempo de envejecimiento acelerado a 35°C: 0 meses ( $\square$ ), 1 mes ( $\times$ ), 2 meses ( $\circ$ ) o 3 meses ( $+$ ).

En la Tabla 6.4 se muestra el peso de cada compuesto sobre los tres componentes principales, que permitió identificar los compuestos que presentaron un mayor peso y, consecuentemente, deducir qué mecanismos y reacciones se vieron favorecidas o minimizadas con el paso del tiempo de envejecimiento acelerado. Los compuestos que presentaron mayor peso ( $\geq 0,2$  en valor absoluto) en el componente principal PC1 fueron compuestos indicadores de envejecimiento (furfural, nicotinato de etilo, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, fenilacetaldehído, (E)-2-nonanal, 2-acetilfurano, etilfenilacetato) y ésteres (acetato etilo, acetato isobutilo, butirato etilo, acetato de isoamilo, áctato  $\beta$ -feniletanol). La mayoría de los compuestos indicadores de envejecimiento presentaron valores positivos mientras que los compuestos del perfil volátil presentaron valores negativos, indicativo de que tuvieron un comportamiento opuesto a lo largo del envejecimiento acelerado, como también se evidencia en el gráfico de componentes 3D obtenido (Figura 6.6). Cabe comentar que el peso de los compuestos indicadores de envejecimiento estuvo repartido de forma muy homogénea (rango de 0,2 – 0,3 en valor absoluto), a excepción de la  $\gamma$ -nonalactona, benzaldehído, 2-propionilfurano, succinato de dietilo, cuyo rol fue menos destacable. En este sentido, se corroboró la idoneidad de estos compuestos como compuestos indicadores de envejecimiento, pero no ha sido posible concluir qué reacciones de envejecimiento se vieron más favorecidas (reacciones de Maillard, degradación de Strecker, formación de ésteres de etilo, etc.),



variabilidad existente entre las cervezas tratadas con UHPH a presiones diferentes, pues las cervezas quedan posicionadas ordenadamente, de menor a mayor presión aplicada durante el tratamiento, a medida que PC2 incrementa (Figura 6.7). Las cervezas tratadas a [REDACTED] (puntos rojos) se posicionan primero, seguidas de las cervezas tratadas a [REDACTED] (puntos rosas) y, a mayores valores de PC2 se observan las cervezas tratadas a [REDACTED] (puntos verdes).



**Figura 6.7.** Representación de las cervezas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tipo de tratamiento: pasteurización térmica ( $\square$ ), tratamiento UHPH [REDACTED] MPa ( $\times$ ), tratamiento UHPH [REDACTED] MPa ( $\circ$ ) o tratamiento UHPH [REDACTED] MPa ( $+$ ).

El componente principal PC2, que definió un 11,4 % de la variabilidad existente entre las cervezas, estuvo mayormente correlacionado con el acetaldehído, el alcohol  $\beta$ -feniletanol, los ésteres propionato de etilo, acetato isobutilo, caproato etilo, caprilato de etilo y caprato de etilo, y el compuesto indicador de envejecimiento  $\gamma$ -nonalactona (Tabla 6.4). En este sentido, el análisis ACP apuntó qué reacciones se vieron favorecidas o minimizadas debido al aumento de la presión aplicada en los tratamientos UHPH.

Por un lado, el aumento de la presión de los tratamientos UHPH ([REDACTED] Pa) resultó en cervezas con concentraciones de acetaldehído inferiores (peso de valor negativo en PC2) y concentraciones del alcohol superior  $\beta$ -feniletanol mayores (peso de valor positivo en PC2). Durante el envejecimiento de la cerveza, el acetaldehído es generado mediante reacciones de oxidación de alcoholes, principalmente etanol por su abundancia en cerveza, pero también a partir de otros alcoholes superiores (De Schutter *et al.*, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2006a; Yin *et al.*, 2016). En este sentido, el aumento de la presión en los tratamientos UHPH habría reducido dichas reacciones de oxidación de alcoholes superiores y generado una menor concentración de acetaldehído. En el *Capítulo 5*, las determinaciones del potencial de formación de radicales (T400), la capacidad antioxidante endógena (EAP) y la concentración del antioxidante sulfuroso

(SO<sub>2</sub>) también demostró que los tratamientos UHPH a mayor presión favorecieron la estabilidad oxidativa de las cervezas obtenidas.

Por otro lado, el análisis ACP sugiere que las condiciones de tratamiento UHPH presentaron un mayor efecto sobre los ésteres de etilo analizados que sobre los ésteres de acetato, a excepción del acetato de isobutilo (Tabla 6.4), a pesar de que se habían cuantificado previamente a concentraciones considerablemente bajas y cuya variabilidad no fue tan destacada como la de los demás ésteres de acetato. El propionato de etilo y caproato de etilo se encontraron a concentraciones mayores al aumentar la presión aplicada en los tratamientos UHPH, probablemente debido a la inhibición de su hidrólisis enzimática, mediante la inactivación de esterasas, y/o a la minimización de su hidrólisis química, mediante la mejora de la estabilidad oxidativa de las cervezas, como se observó en el *Capítulo 5*. En cambio, el caprilato de etilo y caprato de etilo se encontraron a concentraciones menores al aumentar la presión aplicada en los tratamientos UHPH (valor negativo en PC2, Tabla 6.4). Ramey & Ough (1980) demostraron que la estabilidad de los ésteres de etilo disminuía con el aumento de su peso molecular y determinaron que las reacciones de hidrólisis del caprilato de etilo (cadena de 10 carbonos) y del caprato de etilo (cadena de 12 carbonos) presentaban energías de activación menores que los demás ésteres de etilo, de cadenas más cortas. En este sentido, los tratamientos UHPH a mayores presiones podrían haber alcanzado con mayor facilidad los requerimientos energéticos de las reacciones de hidrólisis de estos ésteres de etilo de mayor peso molecular que los ésteres de etilo de menor peso molecular (caproato de etilo, propionato etilo, butirato etilo).

Por último, se deduce que la presión tendría muy poco efecto sobre los compuestos indicadores de envejecimiento, pues entre ellos solamente destaca la  $\gamma$ -nonalactona. Entre los ésteres indicadores de envejecimiento, la  $\gamma$ -nonalactona es el único éster cíclico analizado y el único éster descrito en cerveza por ser indicador de daño térmico. Los tratamientos con UHPH [REDACTED] MPa alcanzaron en válvula temperaturas más elevadas (85 °C) que los tratamientos a [REDACTED] MPa (72 °C y 63 °C, respectivamente), aunque solamente durante 0,2 segundos (*Capítulo 4*). Como se observó en la Tabla 6.4, la  $\gamma$ -nonalactona tendió a aumentar con el incremento de la presión aplicada en el tratamiento UHPH.

**Tabla 6.4.** Pesos y porcentajes de varianza para los tres primeros componentes (PC1, PC2 y PC3). En negrita, se destacan los valores >0,20 en valor absoluto.

Compuestos	Componentes Principales (% variabilidad)		
	PC1 (44,5 %)	PC2 (11,4 %)	PC3 (10,0 %)
<b>Indicadores de envejecimiento</b>			
Furfural	<b>0,28</b>	0,13	-0,11
$\gamma$ -nonalactona	0,12	<b>0,23</b>	-0,04
2-metilbutanal	<b>0,28</b>	0,13	-0,12
3-metilbutanal	<b>0,25</b>	0,07	-0,08
Benzaldehído	0,17	0,05	-0,07
Fenilacetaldehído	<b>0,22</b>	0,10	-0,11
(E)-2-nonenal	<b>0,22</b>	0,14	0,19
2-acetilfurano	<b>0,26</b>	0,16	-0,14
2-propionilfurano	0,07	0,13	<b>0,26</b>
Nicotinato de etilo	<b>0,27</b>	0,14	-0,17
Succinato de dietilo	-0,06	-0,11	<b>0,22</b>
Etilfenilacetato	<b>0,28</b>	0,12	-0,12
<b>Perfil volátil</b>			
<i>Ésteres</i>			
Acetato etilo	<b>-0,24</b>	0,12	<b>-0,23</b>
Acetato isobutilo	<b>-0,24</b>	<b>0,21</b>	-0,03
Acetato de isoamilo	<b>-0,26</b>	0,18	-0,05
Acetato $\beta$ -feniletanol	<b>-0,22</b>	0,17	-0,11
Propionato etilo	-0,15	<b>0,30</b>	<b>-0,31</b>
Butirato etilo	<b>-0,26</b>	0,12	<b>-0,22</b>
Caproato etilo	-0,09	<b>0,29</b>	<b>-0,27</b>
Caprilato etilo	-0,05	<b>-0,36</b>	<b>-0,33</b>
Caprato de etilo	-0,13	<b>-0,30</b>	<b>-0,25</b>
<i>Alcoholes superiores</i>			
Isobutanol	0,12	-0,15	<b>-0,37</b>
Isoamílico	0,14	-0,19	<b>-0,34</b>
$\beta$ -Feniletanol	-0,19	<b>0,24</b>	-0,09
<i>Acetaldehído</i>	0,03	<b>-0,39</b>	-0,13



## 6.2. Conclusiones

Inicialmente el tipo de tratamiento no afectó al contenido de compuestos indicadores de envejecimiento, alcoholes superiores (a excepción del  $\beta$ -feniletanol) y acetaldehído, indicando que los tratamientos UHPH (██████████ MPa) no presentaron efecto negativo sobre la cerveza, en comparación con la pasteurización térmica convencional (15 UP). Asimismo, se observó que las cervezas tratadas con UHPH ██████ MPa y las pasteurizadas térmicamente presentaron una mayor concentración de  $\beta$ -feniletanol y ésteres (a excepción del caprilato de etilo y caprato de etilo) que las tratadas con UHPH a ██████████ MPa. Las cervezas tratadas con UHPH ██████ MPa presentaron concentraciones de los ésteres caprilato de etilo y caprato de etilo menores que las demás cervezas.

A medida que las cervezas envejecieron, los compuestos indicadores de envejecimiento aumentaron en todas las cervezas, tratadas con UHPH (██████████ MPa) y pasteurizadas térmicamente, obteniéndose diferencias significativas entre ellas después de un mes de envejecimiento acelerado. Las cervezas tratadas con UHPH presentaron concentraciones de compuestos indicadores de daño térmico (furfural y  $\gamma$ -nonalactona) menores que las cervezas pasteurizadas térmicamente. En cambio, en cuanto a los demás compuestos de envejecimiento, dependió de la naturaleza química de los compuestos. En general, las cervezas tratadas con UHPH ██████ MPa presentaron niveles de (E)-2-nonenal, ésteres de etilo (nicotinato de etilo, succinato de dietilo y etilfenilacetato) y de algunos aldehídos de Strecker (benzaldehído y fenilacetaldehído) menores que las demás cervezas, evidenciando su mayor estabilidad oxidativa. Por el contrario, los tratamientos UHPH favorecieron la formación de los demás aldehídos de Strecker (2-metilbutanal y 3-metilbutanal) y compuestos heterocíclicos (2-acetilfurano y 2-propionilfurano), que se detectaron a concentraciones mayores que en cervezas pasteurizadas térmicamente.

Por otro lado, no se obtuvieron diferencias significativas en el perfil volátil (concentraciones de ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído) entre cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas tratadas con UHPH envejecidas. Sin embargo, las cervezas tratadas con UHPH tendieron a conservar concentraciones de ésteres de acetato (acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de etilo) mayores que las cervezas pasteurizadas térmicamente. Además, entre las cervezas tratadas con UHPH (██████████ MPa), se observó que estos ésteres tendieron a conservarse y los niveles de acetaldehído a disminuir al aumentar la presión de tratamiento. De hecho, el ACP permitió diferenciar entre cervezas tratadas con UHPH a presiones diferentes, sugiriendo que el aumento de la presión en los tratamientos UHPH disminuyó la oxidación de alcoholes superiores y la generación de acetaldehído, y afectó a la hidrólisis de ésteres de etilo.

**Capítulo 7.** Efecto de la homogenización a ultra alta presión sobre el perfil sensorial de la cerveza en comparación con la pasteurización térmica convencional



## 7.1. Resultados y discusión

Durante el envejecimiento de la cerveza, el deterioro de su perfil sensorial es el resultado de la aparición de sabores desagradables y, al mismo tiempo, de la pérdida de los sabores iniciales deseados en cerveza fresca. En este apartado, el efecto de ambos tratamientos, homogenización a ultra alta presión y pasteurización térmica, sobre la estabilidad del perfil sensorial de las cervezas se evaluó tanto analíticamente, mediante la determinación de los valores de percepción sensorial, como organolépticamente, mediante degustaciones sensoriales.

### 7.1.1. Percepción sensorial de compuestos volátiles e indicadores de envejecimiento

Los compuestos volátiles definen el perfil sensorial de las cervezas aportando gustos y aromas. La contribución de cada compuesto depende, principalmente, de la concentración a la que se encuentren, así como de la presencia y/o ausencia de otros compuestos que podría realzarlos, alterarlos o enmascararlos. En el apartado anterior se cuantificaron los ésteres y alcoholes superiores y aldehídos presentes en todas las cervezas tratadas y se identificó cuáles variaron debido al tratamiento aplicado y cuáles debido al envejecimiento de las cervezas. En este apartado, resultó de interés determinar si dichas variaciones afectaron potencialmente las propiedades organolépticas de las cervezas, es decir, si podrían ser percibidas o no por los degustadores. Para ello, se calculó el valor de percepción sensorial (PS) de cada compuesto, definido como la fracción entre la concentración del compuesto y su correspondiente umbral sensorial, en unidades de sabor (FU, de sus siglas en inglés). Compuestos con una percepción sensorial mayor a la unidad ( $PS > 1$  FU) serán potencialmente percibidos por los degustadores, mientras que compuestos con valores inferiores a la unidad de sabor ( $PS < 1$  FU) no serán percibidos y podrían no afectar el perfil sensorial de las cervezas. En la Tabla A.1 (*Anexo*) se presentan los umbrales sensoriales reportados en bibliografía y utilizados en el presente estudio, los descriptores de sabor de cada compuesto, así como las concentraciones a las cuales se encuentran más comúnmente en cerveza (lager), según la bibliografía consultada. Cabe mencionar que los compuestos succinato de dietilo, 2-propionilfurano y propionato de etilo fueron excluidos del análisis debido a que sus correspondientes umbrales sensoriales no han sido descritos previamente por otros autores.

Para evaluar las diferencias obtenidas entre cervezas, cabe tener en cuenta que los compuestos empiezan probablemente a ser de interés sensorial a partir de experimentar un incremento o reducción de  $\Delta PS = 0,2$  FU en comparación con otra muestra de referencia. A partir de un incremento o reducción de  $\Delta PS = 0,5$  FU, se empieza a percibir su influencia en el sabor de la

cerveza, aunque los degustadores podrán difícilmente identificar el compuesto o grupo de compuestos responsable. En cambio, los degustadores pueden identificarlos a partir de un incremento o reducción de  $\Delta PS = 1,0$  FU, mientras que un incremento o reducción de  $\Delta PS = 2,0$  FU, altera considerablemente el carácter de la cerveza (Meilgaard, 1975; Saison *et al.*, 2009).

A continuación, se describe y discute los resultados de percepción sensorial de los compuestos indicadores de envejecimiento y compuestos volátiles (ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído) obtenidos en todas las cervezas. Hay que tener en cuenta que los valores de percepción sensorial son útiles para predecir la contribución de cada compuesto sobre el sabor de las cervezas, pero es importante considerar que son valores indicativos, debido a la amplia variación en sensibilidad sensorial entre los diferentes degustadores. Asimismo, los valores de percepción sensorial dan una indicación de su impacto sobre el sabor global de la cerveza, pero considerar que el sabor global es la suma de las contribuciones individuales de cada compuesto es una aproximación incompleta, ya que pueden existir varias interacciones entre los compuestos individuales que afecten a la percepción global en su conjunto. La percepción sensorial de dos compuestos puede contrarrestarse (compuestos antagonistas), sumarse (compuestos aditivos) o incluso tener una mayor contribución que su suma (compuestos sinérgicos). Desafortunadamente, aún hay poca investigación al respecto, lo cual limita la interpretación de los resultados de percepción sensorial.

#### **7.1.1.1. Formación de compuestos indicadores de envejecimiento**

Las Figuras 7.1a, 7.2a, 7.3a y 7.4a muestran los resultados de percepción sensorial de todos los compuestos indicadores de envejecimiento analizados en las diferentes cervezas durante los 3 meses de envejecimiento acelerado, en comparación con sus correspondientes umbrales sensoriales en cerveza. Entre todos los compuestos, la  $\gamma$ -nonalactona y el (E)-2-nonenal fueron detectados a concentraciones superiores a sus umbrales sensoriales ( $PS > 1$  FU), a diferencia de los demás compuestos, que estuvieron presentes a concentraciones inferiores ( $PS < 1$  FU).

Inicialmente, en cervezas recién tratadas ( $t_0$ ), la  $\gamma$ -nonalactona ya se encontró presente por encima de su umbral sensorial en todas las cervezas ( $PS = 1,3 - 1,8$  FU) sin observarse diferencias significativas entre ellas, independientemente del tratamiento aplicado. Asimismo, los degustadores tampoco podrían distinguirlas fácilmente ( $\Delta PS = 0,5$  FU). A medida que las cervezas evolucionaron, los niveles aumentaron más rápidamente en cervezas pasteurizadas térmicamente que en cervezas tratadas con UHPH, ya que se cuantificaron niveles de  $\gamma$ -nonalactona significativamente mayores en cervezas pasteurizadas térmicamente ( $PS = 2,1$  FU) que en cervezas tratadas con UHPH  $\blacksquare$  MPa ( $PS = 1,3$  FU),  $\blacksquare$  MPa ( $PS = 1,5$  FU) y  $\blacksquare$  MPa ( $PS = 1,6$  FU) después del primer mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ). Las diferencias entre

las cervezas pasteurizadas térmicamente y las cervezas tratadas con UHPH podrían empezar a ser percibidas por los degustadores ( $\Delta PS > 0,5$  FU). En concreto, este compuesto es comúnmente relacionado con notas no deseadas a rancio, coco, vainilla, cola (Tabla A.1). Además, entre las cervezas tratadas con UHPH, se observó que la  $\gamma$ -nonalactona tendió a aumentar con el incremento de la presión aplicada durante el tratamiento. A partir del segundo mes de evolución ( $t_2$ ), todas las cervezas alcanzaron un nivel estacionario ( $PS = 1,9 - 2,2$  UF), en el cual ya no se encontraron diferencias significativas entre cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas tratadas con UHPH, y los degustadores tampoco las diferenciarían ( $\Delta PS < 0,5$  UF).

Por el contrario, el compuesto indicador de daño térmico furfural, que también aumentó durante los 3 meses de envejecimiento acelerado, se encontró a concentraciones muy inferiores a su umbral sensorial ( $PS < 0,01$  UF), como reportado también por otros investigadores (Saison. *et al*, 2009). A pesar de que fue el compuesto detectado en mayor abundancia (48 – 51 % del total de compuestos indicadores de envejecimiento analizados), su formación no presentaría impacto sobre el perfil organoléptico de las cervezas. Así pues, las diferencias observadas entre cervezas tratadas con UHPH y cervezas pasteurizadas térmicamente no serían perceptibles por degustadores.

Respecto a los demás compuestos indicadores de envejecimiento (no térmicos), solamente el aldehído (E)-2-nonenal, comúnmente relacionado con sabor a papel, alcanzó concentraciones superiores a su umbral sensorial. Inicialmente, el (E)-2-nonenal no fue detectado en cervezas recién tratadas ( $t_0$ ), pero se generó durante el envejecimiento de las cervezas hasta alcanzar niveles *ca.* 10 veces superiores a su umbral sensorial. Como comentado anteriormente, este compuesto también se generó más rápidamente en cervezas pasteurizadas térmicamente que en cervezas tratadas con UHPH, ya que se observaron niveles significativamente superiores en cervezas pasteurizadas térmicamente ( $PS = 11,7$  UF) que en cervezas tratadas con UHPH  $\blacksquare$  MPa ( $PS = 10,0$  UF),  $\blacksquare$  MPa ( $PS = 9,2$  UF) y  $\blacksquare$  MPa ( $PS = 8,3$  UF) durante el primer mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ). Estas diferencias entre la cerveza pasteurizada térmicamente y las cervezas tratadas con UHPH  $\blacksquare$  Pa ( $\Delta PS = 1,7$  UF),  $\blacksquare$  MPa ( $\Delta PS = 2,5$  UF) y  $\blacksquare$  MPa ( $\Delta PS = 3,4$  UF) serían identificadas por degustadores ( $\Delta PS > 1$  UF) y además alterarían considerablemente el perfil de la cerveza en el caso de las cervezas tratadas con UHPH  $\blacksquare$  y  $\blacksquare$  MPa ( $\Delta PS > 2$  UF). Además, entre las cervezas tratadas con UHPH, se observó que tendió a aumentar con la disminución de la presión aplicada, de manera que las cervezas tratadas mediante UHPH  $\blacksquare$  MPa presentaron los niveles de (E)-2-nonenal más bajos. A tiempos de evolución más avanzados ( $t_2$  y  $t_3$ ), no se obtuvieron diferencias significativas entre cervezas sometidas a tratamientos diferentes, probablemente debido al avanzado estado de envejecimiento.

Por otro lado, los aldehídos de Strecker (2-metilbutanal, 3-metilbutanal, benzaldehído, fenilacetadehído), ésteres (nicotinato de etilo, etilfenilacetato) y compuestos heterocíclicos (2-acetilfurano), que incrementaron durante los 3 meses de envejecimiento acelerado, presentaron concentraciones inferiores a su umbral sensorial en todas las cervezas durante toda la evolución ( $PS < 1$  FU). En concreto, entre los aldehídos de Strecker, el benzaldehído se encontró a niveles muy bajos en todas las cervezas durante toda la evolución ( $PS < 0,05$  FU), mientras que los compuestos 2-metilbutanal y 3-metilbutanal alcanzaron niveles ligeramente superiores ( $PS = 0,2 - 0,4$  FU), pero aún no detectables por degustadores. En cambio, el fenilacetadehído, que también se detectó a concentraciones inferiores, alcanzó concentraciones más próximas a su umbral sensorial ( $PS = 0,7 - 1,0$  FU) después de 3 meses de envejecimiento acelerado. Estos niveles podrían ser probablemente perceptibles por los degustadores, como notas dulces, a miel e incluso florales (jacinto, rosas) (Tabla A.1), aunque estos no diferenciarían entre cervezas obtenidas con tratamientos diferentes ( $\Delta PS < 0,5$  FU). Estudios previos también han demostrado que el fenilacetadehído es relevante en el perfil sensorial de cervezas envejecidas, mientras que otros aldehídos de Strecker no parecen importantes en la formación de sabores no deseados en las cervezas envejecidas, sino que pueden ser considerados como marcadores adecuados de cervezas oxidadas (Vanderhaegen *et al.*, 2006a). En cuanto a los ésteres nicotinato de etilo y etilfenilacetato y al 2-acetilfurano, se encontraron muy por debajo de su umbral sensorial en todas las cervezas ( $PS < 0,05$ ), coincidiendo con la bibliografía (Vanderhaegen *et al.*, 2006a). Por este motivo, los resultados indicaron que su formación podría no afectar prácticamente el perfil sensorial de las cervezas de manera que los degustadores no percibirían diferencias organolépticas entre cervezas tratadas con UHPH  $\blacksquare$  MPa y cervezas pasteurizadas térmicamente

Los compuestos indicadores de envejecimiento incrementan durante la vida útil de las cervezas y, aunque rara vez exceden su umbral sensorial, su monitorización es frecuentemente utilizada para obtener información relativa a la calidad de la cerveza, sobre todo cuando el objetivo es evaluar procesos y tecnologías nuevas, así como simular condiciones de almacenamiento (De Schutter *et al.*, 2008; Lehnhardt *et al.*, 2020). No obstante, algunos investigadores insisten que, aunque a concentraciones inferiores a su umbral sensorial, son necesarios y contribuyen al perfil sensorial de cervezas envejecidas (Saison *et al.*, 2009).

#### **7.1.1.2. Evolución de los compuestos volátiles durante el envejecimiento acelerado**

##### ***Ésteres***

Las Figuras 7.1b, 7.2b, 7.3b y 7.4b muestran los resultados de percepción sensorial de los ésteres aromáticos analizados en las diferentes cervezas durante los 3 meses de envejecimiento acelerado, en comparación con sus umbrales sensoriales en cerveza ( $PS = 1$  FU). Como se observa, los

ésteres acetato de etilo, butirato de etilo y acetato de isoamilo se detectaron a concentraciones superiores a su umbral sensorial ( $PS > 1$  FU) y, consecuentemente, fueron probablemente percibidos sensorialmente por los degustadores.

El acetato de etilo se encontró inicialmente a niveles equivalentes a su umbral sensorial en todas las cervezas recién tratadas ( $PS = 0,91 - 1,04$  FU) y, a medida que envejecieron, tendió a disminuir hasta niveles inferiores ( $PS = 0,81 - 0,88$  FU) pero aún próximos a su umbral sensorial. En general, no se obtuvieron diferencias significativas entre cervezas pasteurizadas térmicamente y cerveza tratadas con UHPH durante toda la evolución. Además, la disminución del acetato de etilo (que aporta notas afrutadas, dulces, a disolvente) observada durante la evolución no sería percibida por los degustadores ( $\Delta PS < 0,5$  FU) (Meilgaard, 1975; Saison *et al.*, 2009).

El butirato de etilo también se detectó a concentraciones mayores que su umbral sensorial en todas las cervezas recién tratadas ( $t_0$ ), pero en este caso su percepción sensorial en las cervezas pasteurizadas térmicamente ( $PS = 4,96$  FU) y en las tratadas con UHPH a ■■■ MPa ( $PS = 4,99$  FU) fueron significativamente mayores que en las cervezas tratadas con UHPH ■■■ MPa ( $PS = 2,63$  FU) y ■■■ MPa ( $PS = 2,48$  FU). Estas diferencias de percepción sensorial del butirato de etilo ( $\Delta PS$  aprox. 2 FU) serían fácilmente detectadas por los degustadores (notas a papaya, mantequilla, dulce, manzana). No obstante, destacar que la desviación estándar para las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa fue atípica. Después de un mes de envejecimiento acelerado, los niveles disminuyeron hasta valores inferiores a su umbral sensorial en todas las cervezas tratadas ( $PS = 0,23 - 0,26$  FU), y sin observarse diferencias significativas entre ellas durante toda la evolución ( $t_1 - t_3$ ). Esta pérdida de butirato de etilo durante la evolución de todas las cervezas también podría ser percibida sensorialmente por los degustadores ( $\Delta PS > 2$  FU).

Respecto al acetato de isoamilo, se detectó a concentraciones superiores a su umbral sensorial en todas las cervezas, tanto recién tratadas ( $t_0$ ) como durante el envejecimiento acelerado ( $t_1 - t_3$ ). Inicialmente, la percepción sensorial de las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa ( $PS = 3,46$  FU) fue significativamente inferior que la de las cervezas tratadas con UHPH a ■■■ MPa ( $PS = 3,82$  FU), ■■■ MPa ( $PS = 3,88$  FU) y pasteurizadas térmicamente ( $PS = 3,85$  FU). No obstante, estas diferencias podrían ser aún no percibidas sensorialmente por los degustadores ( $\Delta PS < 0,5$  FU). Durante el envejecimiento acelerado, los niveles disminuyeron en todas las cervezas, pero manteniéndose superiores al umbral sensorial. Esta disminución del contenido acetato de isoamilo (compuesto que aporta notas afrutadas, dulces, esterificadas, a disolvente) durante la evolución sería percibida por los degustadores en todas las cervezas ( $\Delta PS = 0,5 - 1,0$  FU). Por el contrario, los degustadores no llegarían a percibir las diferencias observadas en acetato de isoamilo entre las diferentes cervezas durante toda la evolución ( $\Delta PS < 0,5$  FU), aunque las cervezas tratadas con UHPH ■■■■■■■■■ MPa presentaron concentraciones significativamente mayores que las

demás cervezas (Tabla 6.3). Después del primer mes, la percepción sensorial de acetato de isoamilo en las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa (PS = 3,30 FU) y [REDACTED] MPa (PS = 3,37 FU) fue mayor que en las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa (PS = 3,00 FU) y pasteurizadas térmicamente (PS = 3,03 FU). A los 3 meses de evolución, la percepción sensorial en las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa (PS = 3,08 FU) y [REDACTED] MPa (PS = 3,11 FU) fue mayor que en las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa (PS = 2,40 FU) y en las cervezas pasteurizadas térmicamente (PS = 2,85 FU). Por otro lado, a pesar de no esperarse diferencias en la percepción sensorial del acetato de isoamilo entre las diferentes cervezas, su presencia podría enmascarar a otros compuestos. Saison *et al.* (2009) demostraron que la adición de 0,30 ppm de acetato de isoamilo incrementó un 250 % el umbral sensorial del aldehído 2-metilbunal (de 0,045 a 0,157 ppm). En el presente estudio se observó que las cervezas pasteurizadas térmicamente perdieron más de 0,30 ppm de acetato de isoamilo durante el envejecimiento acelerado que las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa, lo cual podría favorecer que la percepción del 2-metilbutanal (notas césped, afrutadas, medicinales, manzana, malta) aflorase en cervezas pasteurizadas térmicamente a concentraciones inferiores que en cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa. En concreto, las cervezas tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa presentaron 0,28 ppm y 0,48 ppm de acetato de isoamilo más que las cervezas pasteurizadas térmicamente después de 1 y 3 meses de envejecimiento acelerado respectivamente. Asimismo, las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa también presentaron 0,24 ppm y 0,46 ppm de acetato de isoamilo más que las cervezas pasteurizadas térmicamente después de 1 y 3 meses de envejecimiento acelerado respectivamente (Tabla 6.3).

Por el contrario, en las Figuras 7.1b, 7.2b, 7.3b y 7.4b también se demostró que todas las cervezas contenían los ésteres acetato isobutilo (PS = 0,15 – 0,25 FU), acetato  $\beta$ -feniletanol (PS = 0,13 – 0,20 FU), caproato de etilo (PS = 0,44 – 0,54), caprilato de etilo (PS = 0,10 – 0,56 FU) y caprato de etilo (PS < 0,01 FU) a niveles inferiores a su umbral sensorial durante todo el envejecimiento acelerado. Por consiguiente, a pesar de que se observaron concentraciones de caprilato de etilo y caprato de etilo significativamente inferiores en cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa que en cervezas tratadas térmicamente (Tabla 6.3), probablemente los degustadores no percibirían sensorialmente estas diferencias ( $\Delta$ PS < 0,5 FU). Por el contrario, otros autores mencionan que la presencia de diversos ésteres, aunque a concentraciones inferiores a su umbral sensorial, pueden tener en conjunto un efecto sinérgico en el sabor global de la cerveza (Hiralal *et al.*, 2013; Olaniran *et al.*, 2017).

### ***Alcoholes superiores***

Las Figuras 7.1c, 7.2c, 7.3c y 7.4c muestran los resultados de percepción sensorial de los alcoholes superiores analizados en las diferentes cervezas durante los 3 meses de envejecimiento



acelerado, en comparación con sus umbrales sensoriales en cerveza (PS = 1 FU). Como se observa, el isoamílico y el  $\beta$ -feniletanol fueron detectados por encima de su umbral sensorial.

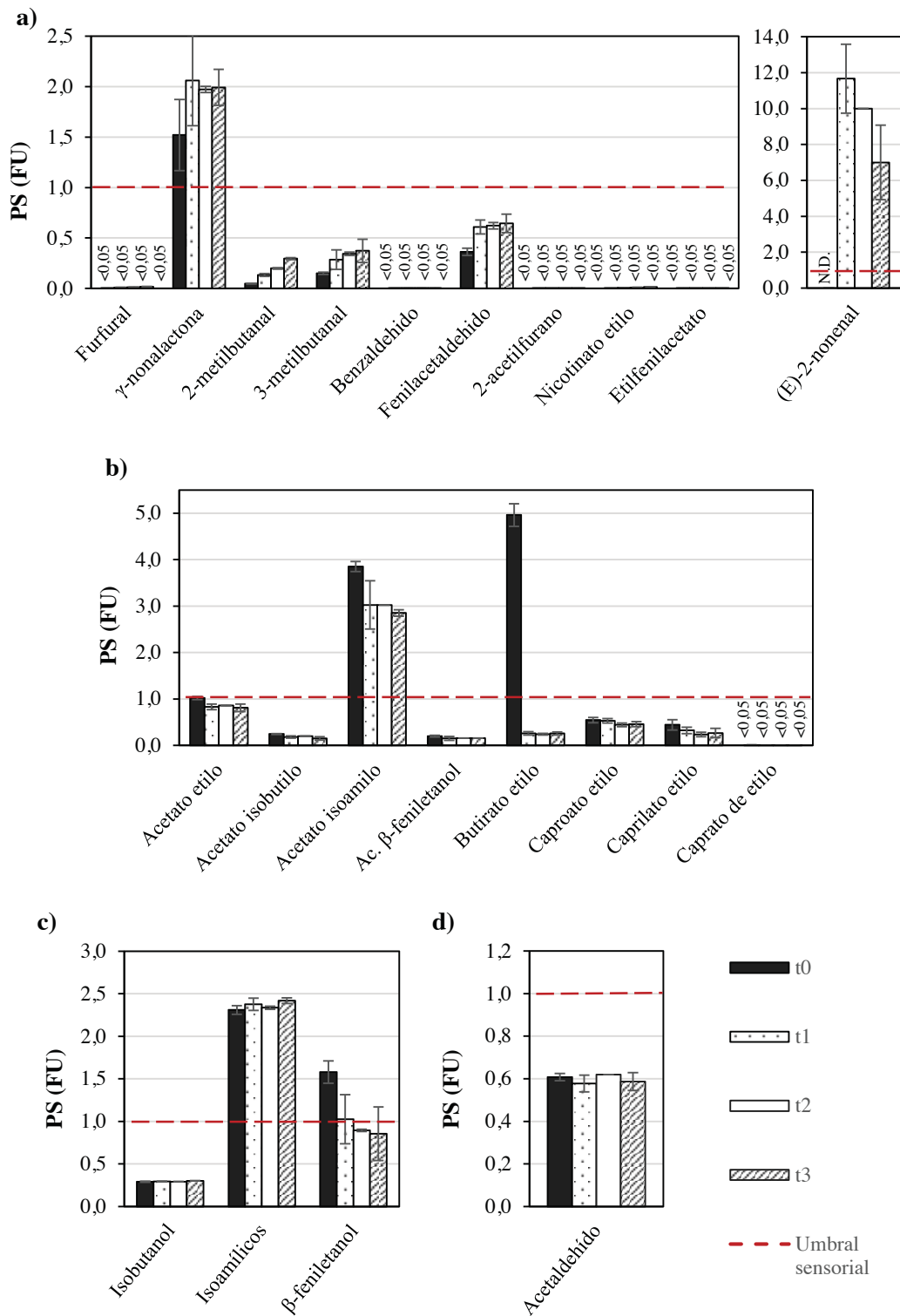
El isoamílico se detectó por encima de su umbral sensorial en todas las cervezas recién tratadas, así como durante su envejecimiento acelerado (PS = 2,3 – 2,4 FU), sin observarse diferencias significativas entre ellas, independientemente del tratamiento aplicado, y tampoco serían diferenciadas en una degustación ( $\Delta$ PS = 0,1 FU), con notas a alcohol, plátano, dulce, malta, vino.

En cambio, el  $\beta$ -feniletanol, que también se detectó a concentraciones superiores a su umbral sensorial en todas las cervezas recién tratadas, decreció hasta niveles inferiores durante el envejecimiento acelerado. Inicialmente, las cervezas recién tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa presentaron niveles de  $\beta$ -feniletanol (PS = 1,1 FU) significativamente inferiores que las cervezas recién tratadas con UHPH a [REDACTED] MPa (PS = 1,4 FU) y recién pasteurizadas térmicamente (PS = 1,6 FU). Estas diferencias serían difícilmente percibidas por los degustadores ( $\Delta$ PS = 0,3 – 0,5 FU). Además, durante el envejecimiento acelerado tampoco se volvieron a observar diferencias significativas entre cervezas obtenidas con tratamientos diferentes (PS = 0,8 – 1,2 FU). Comentar que la pérdida de los mayores niveles de  $\beta$ -feniletanol observados en cervezas pasteurizadas térmicamente ( $\Delta$ PS = 0,7 FU) y cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa ( $\Delta$ PS = 0,6 FU) a los 3 meses de envejecimiento acelerado podría ser percibida por los degustadores, a diferencia de la degradación observada as en las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa ( $\Delta$ PS = 0,3 FU) y [REDACTED] MPa ( $\Delta$ PS = 0,2 FU), que, de hecho, ya partían de concentraciones inferiores.

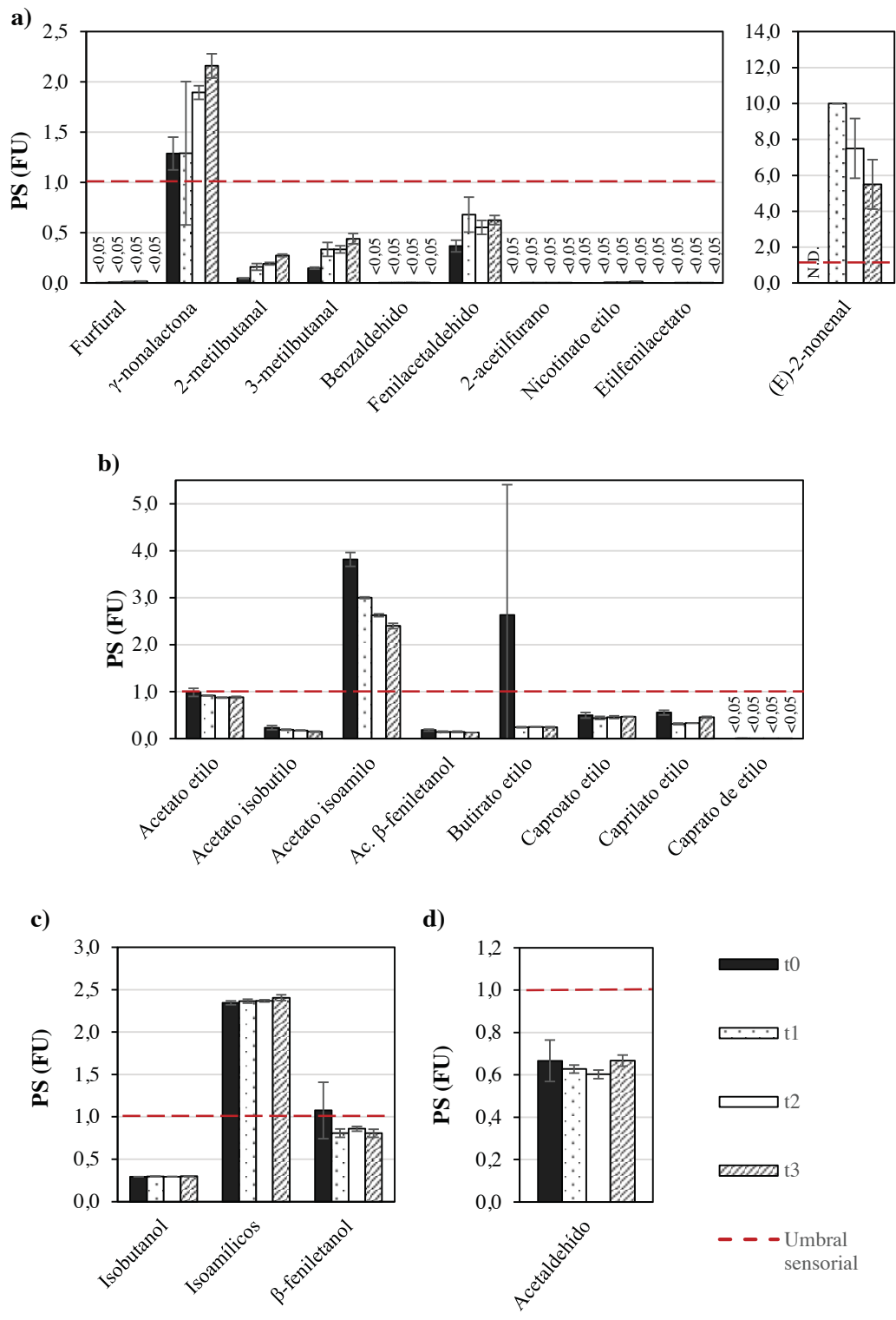
Respecto al isobutanol, se detectó a concentraciones inferiores a su umbral sensorial en todas las cervezas durante todo el envejecimiento acelerado, sin obtenerse diferencias significativas (PS = 0,3 FU), por lo cual se esperarí que no fuese percibido por los degustadores.

### ***Acetaldehído***

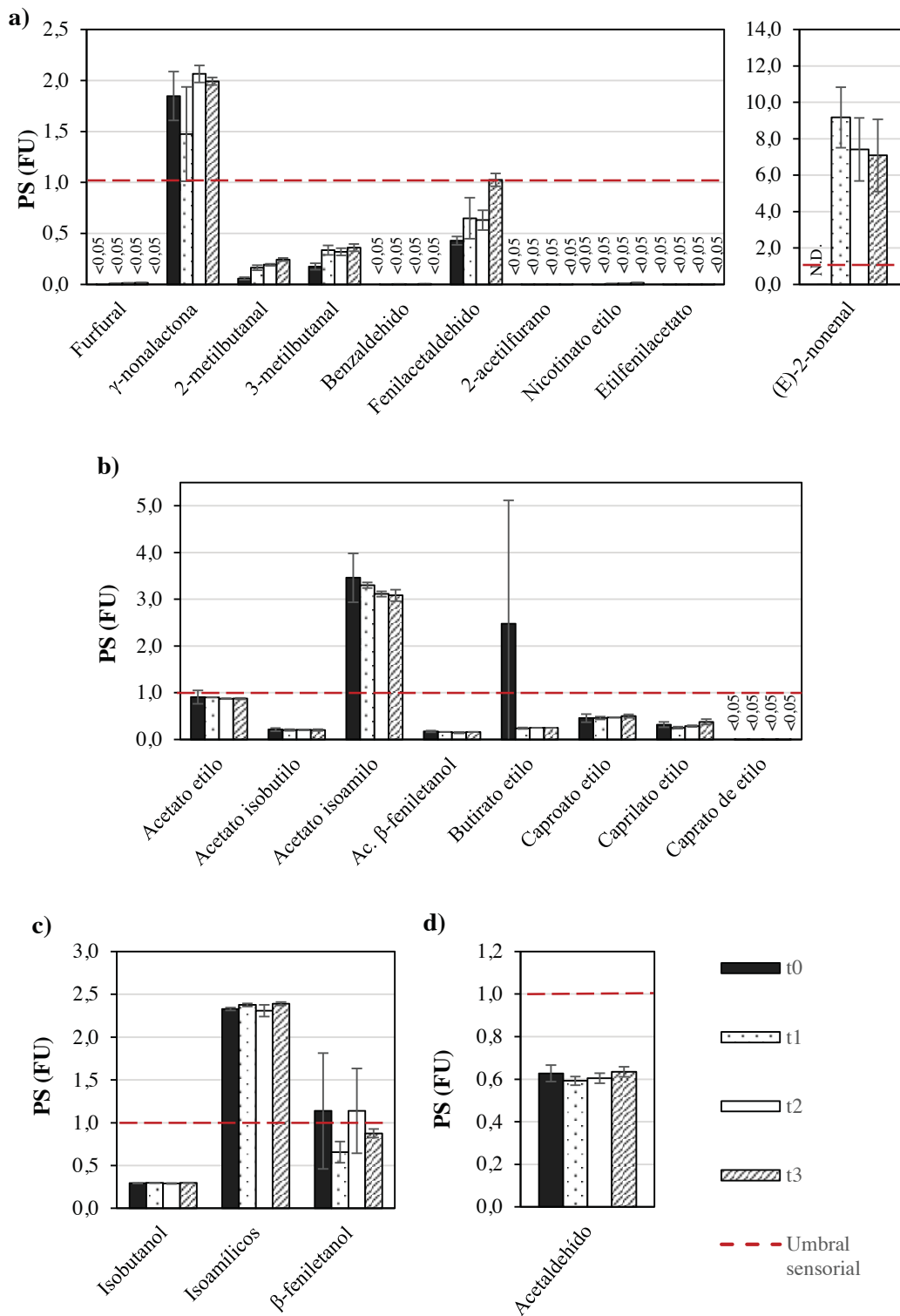
Las Figuras 7.1d, 7.2d, 7.3d y 7.4d muestran los resultados de percepción sensorial del acetaldehído cuantificado en las diferentes cervezas durante los 3 meses de envejecimiento acelerado, en comparación con sus umbrales sensoriales en cerveza (PS = 1 FU). Como se observa, todas las cervezas presentaron niveles de acetaldehído inferiores a su umbral sensorial, ya sea recién tratadas como durante toda la evolución (PS = 0,6 – 0,7), por lo cual, los degustadores podrán difícilmente identificar este compuesto, relacionado con sabor a manzana verde. Además, no se observaron diferencias significativas entre cervezas obtenidas con tratamientos diferentes y tampoco durante el envejecimiento de las cervezas.



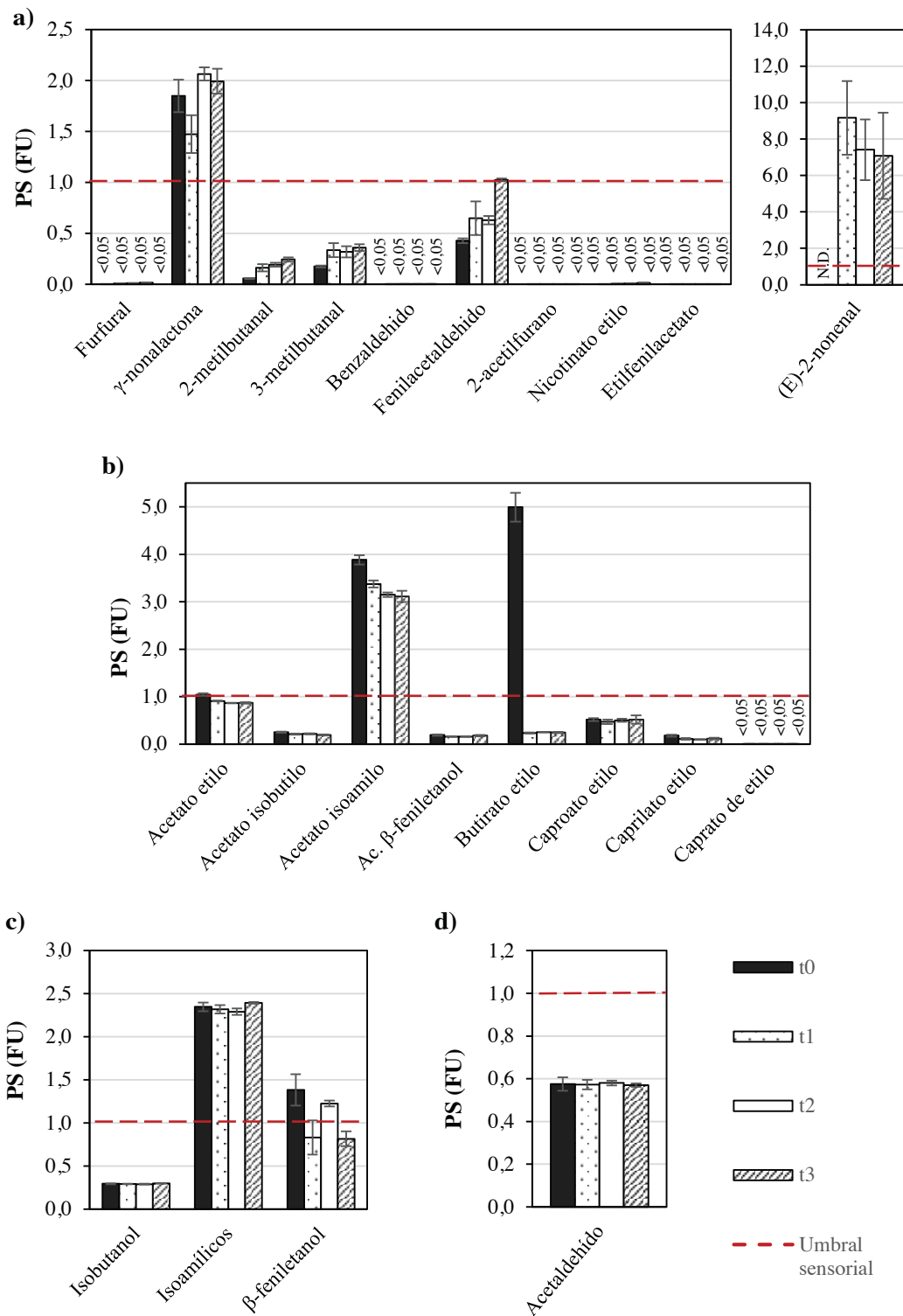
**Figura 7.1.** Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas recién XXXXXXXXXX (t<sub>0</sub>) y envejecidas durante 1 mes (t<sub>1</sub>), 2 meses (t<sub>2</sub>) y 3 meses (t<sub>3</sub>) a 35 °C.



**Figura 7.2.** Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas recién [redacted] (t<sub>0</sub>) y envejecidas durante 1 mes (t<sub>1</sub>), 2 meses (t<sub>2</sub>) y 3 meses (t<sub>3</sub>) a 35 °C.



**Figura 7.3.** Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas recién [redacted] (t<sub>0</sub>) y envejecidas durante 1 mes (t<sub>1</sub>), 2 meses (t<sub>2</sub>) y 3 meses (t<sub>3</sub>) a 35 °C.



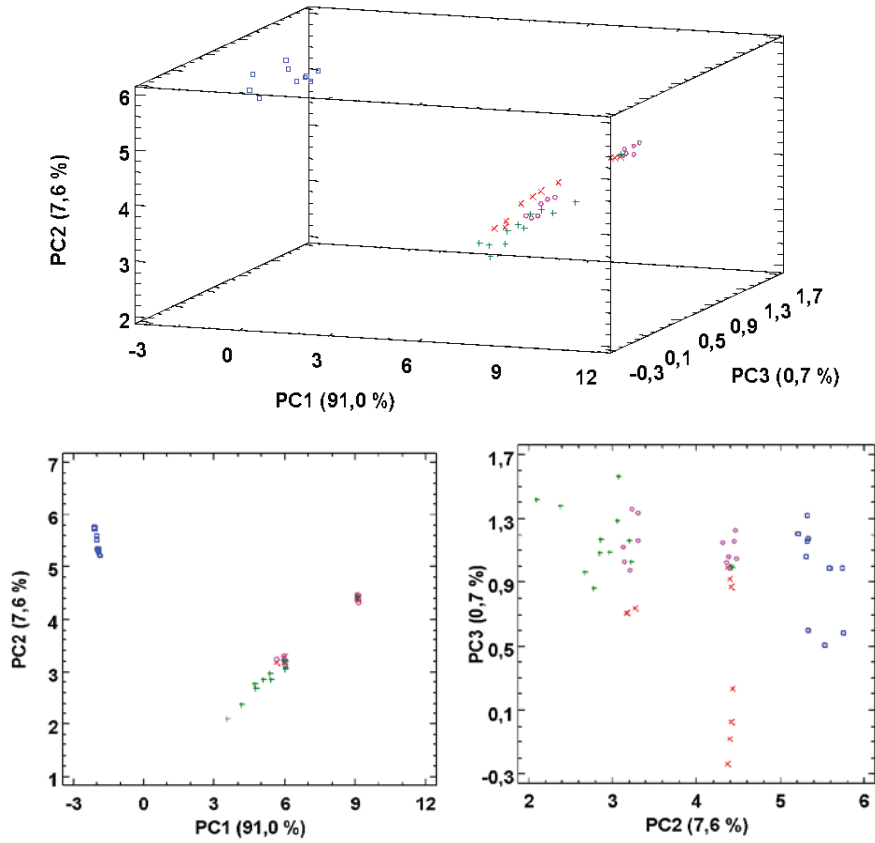
**Figura 7.4.** Percepción sensorial (PS), en unidades de sabor (UF), de a) los compuestos indicadores de envejecimiento, b) ésteres, c) alcoholes superiores y d) acetaldehído presentes en cervezas ████████████████████ (t<sub>0</sub>) y envejecidas durante 1 mes (t<sub>1</sub>), 2 meses (t<sub>2</sub>) y 3 meses (t<sub>3</sub>) a 35 °C.

### 7.1.1.3. Análisis de componentes principales del perfil sensorial de las cervezas tratadas

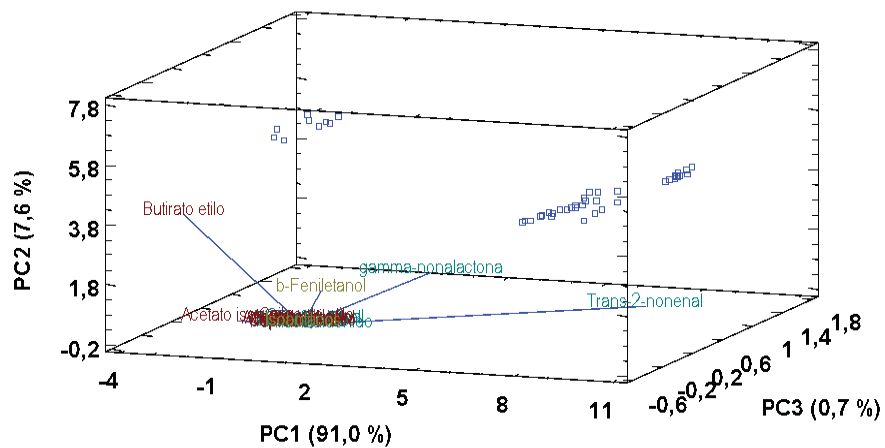
En este apartado, se utilizó el análisis ACP para distinguir de forma visual y simplificada las diferencias existentes a nivel de percepción sensorial entre las cervezas obtenidas con tratamientos diferentes – mediante pasteurización térmica, [REDACTED] MPa, UHPH [REDACTED] MPa y UHPH [REDACTED] MPa –, así como identificar los compuestos que más influyeron en diferenciarlas. El análisis ACP se realizó con los valores de percepción sensorial de todos los compuestos analizados, tanto en las cervezas recién tratadas ( $t_0$ ) como durante los 3 meses de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ). En esta ocasión, se realizó un análisis ACP no estandarizado ya que todas las variables fueron, por definición, medidas en la misma unidad. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en función del tipo de tratamiento y en función del tiempo de envejecimiento acelerado.

#### *Efecto del tiempo de envejecimiento acelerado*

La Figura 7.5 muestra la distribución de todas las cervezas respecto a los tres primeros componentes principales, en función del tiempo que han estado en condiciones de envejecimiento acelerado. Como se observa, el análisis ACP no estandarizado obtenido demostró que los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2) explicaron un 98,6 % de la variabilidad existente entre las cervezas analizadas y permitió diferenciarlas en función del tiempo de evolución, ya que se pudieron visualizar en grupos diferentes ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ). Como se observa en la Tabla 7.1 y en la Figura 7.6, los componentes principales PC1 (91,0 % variabilidad) y PC2 (7,6% variabilidad) estuvieron fuertemente correlacionados con el aldehído (E)-2-nonanal y el éster butirato de etilo. Así pues, a pesar de que el análisis ACP realizado con las concentraciones de los compuestos volátiles describió que la variabilidad existente entre las cervezas envejecidas a diferentes tiempos se podría atribuir a varios aldehídos (furfural, nicotinato de etilo, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, fenilacetaldehído, (E)-2-nonanal, 2-acetilfurano, etilfenilacetato) y ésteres (acetato etilo, propionato etilo, acetato isobutilo, butirato de etilo, acetato de isoamilo, ácido  $\beta$ -feniletanol)(Capítulo 6), se sugiere que, entre estos compuestos, el aldehído (E)-2-nonanal y el éster butirato de etilo contribuyeron mayormente sobre la variabilidad existente entre las cervezas a nivel de percepción sensorial. En este sentido, la variación de estos compuestos sería con probabilidad sensorialmente más percibida por los degustadores, al producirse a concentraciones superiores o próximas a su umbral sensorial.



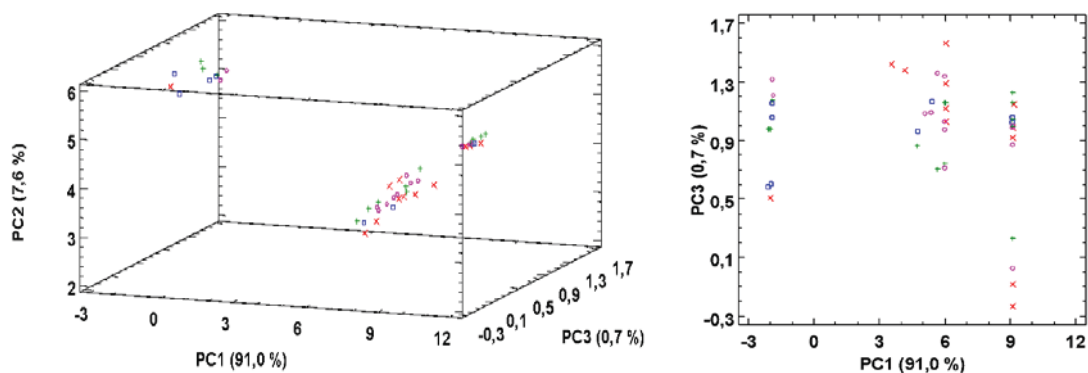
**Figura 7.5.** Representación de las cervezas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tiempo de envejecimiento acelerado a 35°C: 0 meses ( $\square$ ), 1 mes ( $\times$ ), 2 meses ( $\circ$ ) o 3 meses ( $+$ ) (ACP no estandarizado).



**Figura 7.6.** ACP no estandarizado ( $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ). Localización de cada variable (percepción sensorial,  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ) en el espacio de 3 primeros componentes principales, así como las cervezas (puntos azules). Las variables se dividen en compuestos indicadores de envejecimiento (verde), ésteres (rojo) y alcoholes (amarillo), acetaldehído (verde).

### Efecto del tipo de tratamiento

En cambio, como muestra la Figura 7.7, el mismo ACP no estandarizado no permitió observar una diferenciación clara entre las cervezas obtenidas con tratamientos diferentes. Así pues, a pesar de que anteriormente el análisis ACP realizado con las concentraciones de los compuestos volátiles permitió diferenciar las cervezas tratadas con UHPH en función de la presión aplicada, principalmente debido a la variabilidad observada en los aldehídos  $\gamma$ -nonalactona y acetaldehído, los ésteres propionato de etilo, acetato isobutilo, caproato etilo, caprilato de etilo y caprato de etilo y el alcohol  $\beta$ -feniletanol (*Capítulo 6*), no se observó que esta variabilidad presentara suficiente impacto sobre la percepción sensorial de las cervezas tratadas con UHPH que permitiera diferenciar entre cervezas tratadas con UHPH a presiones diferentes. De hecho, entre los compuestos volátiles detectados anteriormente, solamente la  $\gamma$ -nonalactona y el  $\beta$ -feniletanol se detectaron a niveles por encima de su umbral sensorial y, como se observa en el ANOVA, no se apreciaron diferencias significativas entre los niveles de estos dos compuestos en las cervezas tratadas con UHPH a diferentes presiones. Por último, de forma similar al ACP realizado con las concentraciones de los compuestos volátiles, el ACP con las percepciones sensoriales tampoco permitió diferenciar entre cervezas tratadas con UHPH y cervezas pasteurizadas térmicamente (Figura 7.7). En este sentido, estos resultados sugirieron que los degustadores no podrían diferenciar entre las diferentes cervezas tratadas a partir de los gustos y/o aromas atribuidos a los compuestos analizados en el presente estudio.



**Figura 7.7.** Representación de las cervezas según los 3 primeros componentes principales PC1, PC2 y PC3 en función del tipo de tratamiento: pasteurización térmica ( $\square$ ), tratamiento UHPH  $\blacksquare$  MPa ( $\times$ ), tratamiento UHPH  $\blacksquare$  ( $\circ$ ) o tratamiento UHPH  $\blacksquare$  ( $+$ ) (ACP no estandarizado).



**Tabla 7.1.** Pesos y porcentajes de varianza para los tres primeros componentes (PC1, PC2 y PC3). En negrita, se destacan los valores superiores a 0,20 en valor absoluto.

Compuestos	Componentes Principales (% variabilidad)		
	PC1 (91,0 %)	PC2 (7,6 %)	PC3 (0,7 %)
<b>Indicadores de envejecimiento</b>			
Furfural	0,00	0,00	-0,01
$\gamma$ -nonalactona	0,02	-0,03	<b>-0,91</b>
2-metilbutanal	0,01	-0,02	-0,07
3-metilbutanal	0,01	-0,02	-0,04
Benzaldehído	0,00	0,00	0,00
Fenilacetaldehído	0,03	-0,03	0,00
(E)-2-nonenal	<b>0,94</b>	<b>0,35</b>	0,01
2-acetilfurano	0,00	0,00	0,00
Nicotinato de etilo	0,00	0,00	-0,01
Etilfenilacetato	0,00	0,00	0,00
<b>Perfil volátil</b>			
<i>Ésteres</i>			
Acetato etilo	-0,01	0,03	0,03
Acetato isobutilo	0,00	0,01	0,02
Acetato de isoamilo	-0,06	0,19	<b>0,32</b>
Acetato $\beta$ -feniletanol	0,00	0,01	0,01
Butirato etilo	<b>-0,34</b>	<b>0,90</b>	-0,06
Caproato etilo	0,00	0,02	-0,03
Caprilato etilo	-0,01	-0,01	0,02
Caprato de etilo	0,00	0,00	0,00
<i>Alcoholes superiores</i>			
Isobutanol	0,00	0,00	0,00
Isoamílico	0,00	-0,01	0,00
$\beta$ -Feniletanol	-0,04	0,17	<b>-0,23</b>
<i>Acetaldehído</i>	0,00	-0,02	0,00

### 7.1.2. Evaluación sensorial de la estabilidad de las cervezas obtenidas

Con el objetivo de evaluar la estabilidad sensorial de las cervezas tratadas con UHPH, las cervezas fueron presentadas ante un panel de degustadores entrenados. Entre las cervezas tratadas con UHPH (██████ MPa), se seleccionaron las cervezas tratadas (██████) para ser evaluadas sensorialmente en pruebas de degustación triangular y en pruebas de perfil descriptivo en comparación con las cervezas pasteurizadas térmicamente. A nivel analítico, las cervezas recién tratadas con UHPH a (██████) MPa presentaron niveles muy similares de compuestos indicadores de envejecimiento, ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído que las cervezas pasteurizadas térmicamente. En cambio, durante el envejecimiento acelerado, los compuestos que podrían potencialmente afectar el perfil sensorial de las cervezas, ya que se detectaron a concentraciones por encima de su umbral sensorial los cuales ( $PS > 1$ ), presentaron una mejor estabilidad en las cervezas tratadas con UHPH (██████) MPa que en las demás cervezas. En concreto, las cervezas tratadas con UHPH (██████) MPa contenían niveles de  $\gamma$ -nonalactona y (E)-2-nonenal menores y niveles de acetato de isoamilo mayores que las cervezas pasteurizadas térmicamente, coincidiendo también con los resultados de estabilidad oxidativa (EAP, T400, SO<sub>2</sub>), reportados en el *Capítulo 5*.

#### 7.1.2.1. Distinción sensorial entre cervezas mediante pruebas triangulares

Un panel de degustadores entrenados degustó las cervezas tratadas con UHPH (██████ MPa) y las cervezas pasteurizadas térmicamente en una prueba triangular de elección forzada con la finalidad de evaluar si eran capaces de distinguir las sensorialmente. Las pruebas de degustación se realizaron con las cervezas recién tratadas ( $t_0$ ) y se repitieron mensualmente después de haberlas envejecido durante 3 meses a condiciones aceleradas ( $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ ). Los resultados se muestran en la Tabla 7.2. Como se observa, el panel de degustadores detectó diferencias significativas entre ambas cervezas solamente cuando las evaluaron recién tratadas ( $t_0$ ), mientras que no pudieron volver a diferenciarlas entre ellas durante los tres meses de envejecimiento acelerado ( $t_1 - t_3$ ).

**Tabla 7.2.** Resultados de las pruebas triangulares entre cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión (UHPH) [REDACTED] MPa y cervezas pasteurizadas térmicamente. Las pruebas triangulares se realizan con cerveza recién tratada ( $t_0$ ), cerveza envejecida 1 mes ( $t_1$ ), 2 meses ( $t_2$ ) y 3 meses ( $t_3$ ) a 35°C.

Tiempo de la prueba (mes)	Respuestas correctas	Respuestas totales	Significancia
$t_0$	12	20	Existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ )
$t_1$	13	26	No existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ )
$t_2$	13	26	No existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ )
$t_3$	4	14	No existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

### 7.1.2.2. Identificación de diferencias sensoriales entre cervezas mediante pruebas de perfil descriptivo

El sabor se define como las sensaciones químicas detectadas por el gusto en combinación con el aroma. Los degustadores evaluaron sensorialmente el sabor de ambas cervezas, cerveza tratada con UHPH [REDACTED] MPa y cerveza pasteurizada térmicamente, presentadas de forma individual en una prueba de perfil descriptivo. En la prueba tuvieron que puntuar diferentes atributos aromáticos y gustativos según su nivel de intensidad (puntuación del 1 al 9), entre los cuales se incluyeron atributos descriptivos generales y típicos de cerveza (afrutado, lúpulo, DMS, cereal, malta, acetaldehído, dulzor, amargor, astringencia, cuerpo, persistencia) así como atributos descriptivos específicos para identificar defectos relacionados con el envejecimiento de las cervezas (caramelo, quemado, azufrados, vino/acético, rancio, metálico, papel, agrio).

Los resultados de las puntuaciones obtenidas para cada uno de los atributos se trataron mediante un ANOVA multifactorial y la prueba de LSD para determinar si existían diferencias entre las puntuaciones otorgadas a cada una de las cervezas e identificar sus causas, es decir, si se atribuían al tipo de tratamiento aplicado o al efecto del tiempo de evolución. La Tabla 7.3 muestra el efecto de ambos factores, tipo de tratamiento y tiempo de evolución, sobre cada uno de los atributos sensoriales evaluados. Como se observa, el tipo de tratamiento no presentó efecto significativo ni sobre el gusto ni sobre el aroma de las cervezas ( $p < 0,05$ ), pero la interacción de ambos factores (tratamiento\*tiempo) indicó que, para un tiempo determinado, el tratamiento afectó significativamente a la persistencia (en gusto) y al rancio (en aroma) de las cervezas obtenidas ( $p < 0,05$ ).

El análisis LSD corroboró estos resultados y, además, también mostró diferencias significativas entre ambas cervezas en los niveles de los atributos afrutado y papel, como se muestra en los diagramas de perfil descriptivo (Figura 7.8 - 7.11). Inicialmente, las cervezas recién obtenidas ( $t_0$ ) con los tratamientos UHPH [REDACTED] MPa presentaron, en gusto, niveles de notas afrutadas más elevados que las cervezas recién pasteurizadas térmicamente, mientras que, en aroma, no se observaron diferencias significativas entre ambas cervezas (Figura 7.8). Al cabo de 1 mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ), ya no se observaron diferencias en los niveles de notas afrutadas, sino que los degustadores percibieron notas de papel y de rancio de menor intensidad en cervezas tratadas con UHPH que en cervezas pasteurizadas térmicamente (Figura 7.9). Cabe mencionar que los niveles de rancio fueron muy ligeramente percibidos en ambas cervezas, pues obtuvieron puntuaciones muy bajas ( $< 1/9$ ), a diferencia de las notas de papel, que fueron más intensas. Las notas de papel son un buen indicativo del estado de envejecimiento de las cervezas (Rodrigues & Almeida, 2008; Vanderhaegen *et al.*, 2006a), evidenciando que las tratadas con UHPH estaban menos envejecidas que las pasteurizadas térmicamente. En cambio, las cervezas pasteurizadas térmicamente presentaron una mayor persistencia que las cervezas tratadas con UHPH. Por último, a tiempos de envejecimiento acelerado más avanzados, después de 2 y 3 meses de evolución ( $t_2$ ,  $t_3$ ), no se observaron diferencias significativas entre ambas cervezas en ninguno de los atributos evaluados (Figuras 7.10 y 7.11).

Por otro lado, en la Tabla 7.3 se observa que el tiempo de evolución tuvo efecto sobre el gusto y aroma de ambas cervezas, tratadas con UHPH [REDACTED] y pasteurizadas térmicamente, afectando principalmente a la intensidad de notas a vino (acéticas), amargas y afrutadas (esterificadas). Como se observa en las Figuras 7.12 y 7.13, el análisis LSD también reflejó estos resultados, pues ambas cervezas mostraron una disminución significativa del amargor y de las notas afrutadas, así como un ligero aumento del gusto a vino (acético), el cual fue significativo solamente para cervezas pasteurizadas térmicamente, mientras que en cervezas tratadas con UHPH se observó solamente una tendencia. Además, también se demostró que algunos atributos no evolucionaron igual en ambas cervezas (Figuras 7.12 y 7.13). En las cervezas pasteurizadas térmicamente, el gusto y aromas de lúpulo disminuyeron significativamente mientras que el aroma a papel aumentó durante el primer mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ), atributo típico en cervezas envejecidas. Por el contrario, las cervezas tratadas con tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa perdieron persistencia durante el primer mes de envejecimiento acelerado ( $t_1$ ) así como aroma dulce durante todo el envejecimiento ( $t_0 - t_3$ ). En la mayoría de los casos, el avance de este comportamiento no fue significativo después de dos y tres meses de envejecimiento acelerado ( $t_2$  y  $t_3$ ), probablemente debido al avanzado estado de envejecimiento de las cervezas, que dificulta su puntuación. De hecho, los degustadores dejaron comentarios en referencia al elevado deterioro de las cervezas después de 2 y 3 meses de envejecimiento.

Así pues, la evolución de los atributos destaca mayormente después de 1 mes de evolución ( $t_1$ ) (Figuras 7.12 y 7.13), observándose principalmente diferencias significativas en los atributos persistencia, papel y rancio entre ambas cervezas (Figura 7.9).

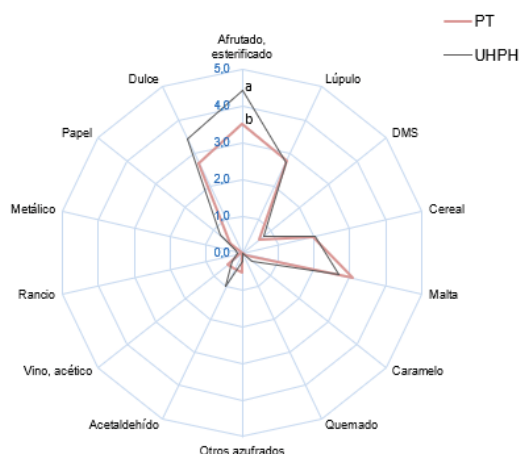
**Tabla 7.3.** Efecto del tipo de tratamiento aplicado (pasteurización térmica, homogenización a ultra alta presión [redacted] MPa) y del tiempo de envejecimiento acelerado (0 – 3 meses) sobre los atributos sensoriales gustativos y aromáticos evaluados en las cervezas obtenidas.

Atributos sensoriales	Efecto de los factores (valor <i>p</i> )		
	Tratamiento	Tiempo	Tratamiento*Tiempo
<b>Gusto</b>			
Afrutado (esterificado)	0,874	0,256	0,232
Lúpulo	0,841	0,108	0,665
DMS	0,766	0,085	0,629
Cereal	0,958	0,822	0,917
Malta	0,584	0,125	0,996
Caramelo	0,413	0,997	0,981
Quemado	0,118	0,471	0,471
Otros azufrados	0,987	0,460	0,719
Acetaldehído	0,846	0,278	0,748
Vino (acético)	0,733	0,036**	0,344
Rancio	0,164	0,076	0,199
Metálico	0,827	0,502	0,385
Papel	0,658	0,913	0,464
Dulce	0,409	0,262	0,498
Amargo	0,930	0,021**	0,929
Agrio	0,732	0,440	0,514
Astringente	0,833	0,284	0,944
Cuerpo	0,326	0,289	0,667
Persistencia	0,078	0,504	0,049**
<b>Aroma</b>			
Afrutado (esterificado)	0,268	0,004***	0,341
Lúpulo	0,813	0,364	0,445
DMS	0,732	0,989	0,970
Cereal	0,715	0,885	0,509
Malta	0,163	0,080	0,776
Caramelo	0,535	0,415	0,704
Quemado	0,951	0,111	1,000
Otros azufrados	0,964	0,803	0,662
Acetaldehído	0,650	0,191	0,544
Vino (acético)	0,891	0,402	0,276
Rancio	0,257	0,299	0,042**
Metálico	0,566	0,456	0,630
Papel	0,431	0,252	0,180
Dulce	0,901	0,157	0,189

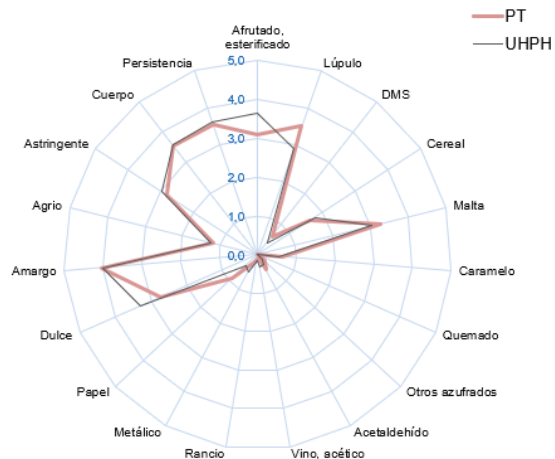
\*\* Efecto significativo (valor  $p < 0,05$ )

\*\*\* Efecto significativo (valor  $p < 0,01$ )

**a) Aroma**

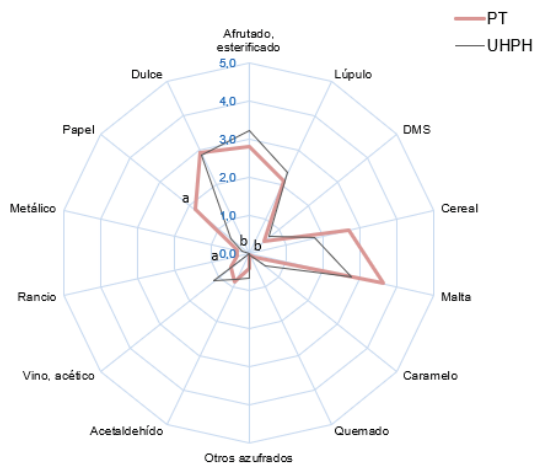


**b) Gusto**

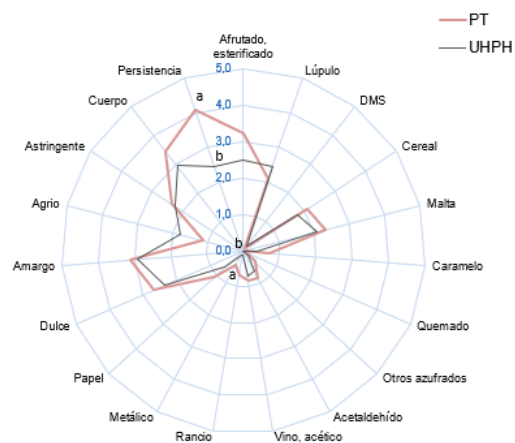


**Figura 7.8.** Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión a [redacted] recién obtenidas ( $t_0$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD).

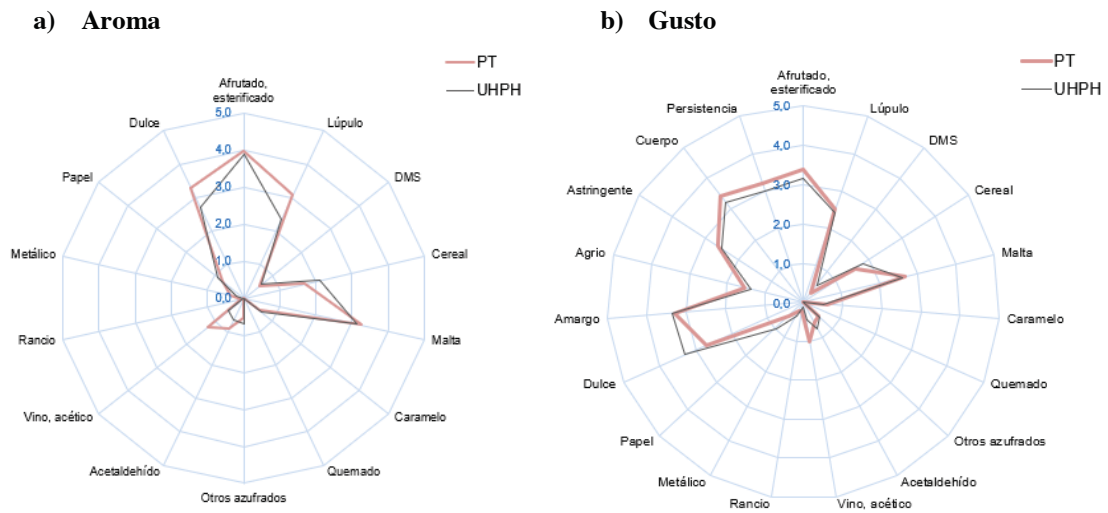
**a) Aroma**



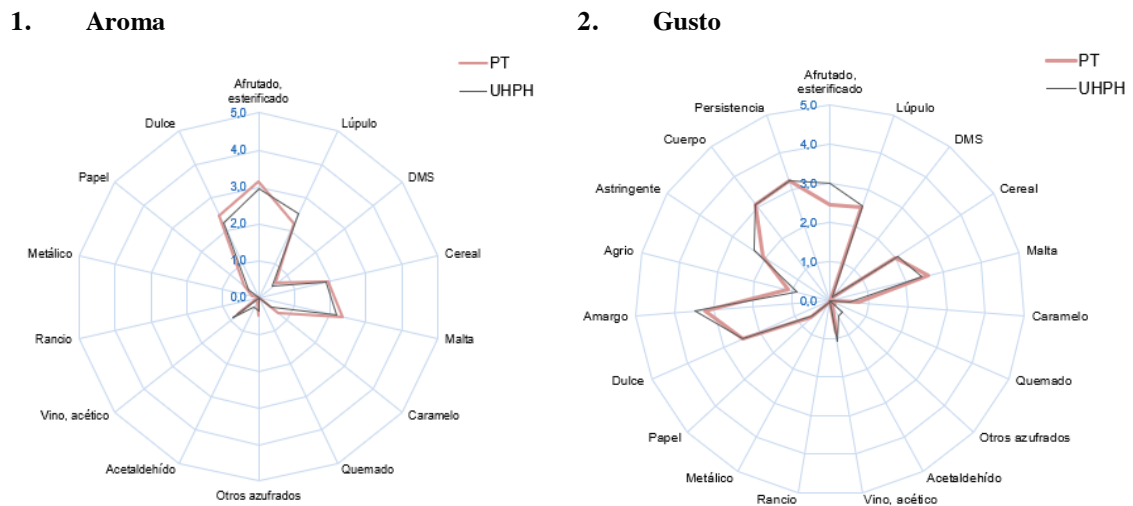
**b) Gusto**



**Figura 7.9.** Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión [redacted] después de 1 mes de envejecimiento acelerado a 35 °C ( $t_1$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD).



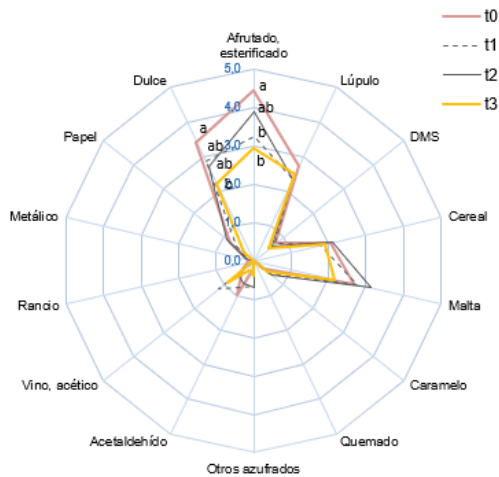
**Figura 7.10.** Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión (UHPH) después de 2 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C ( $t_2$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD).



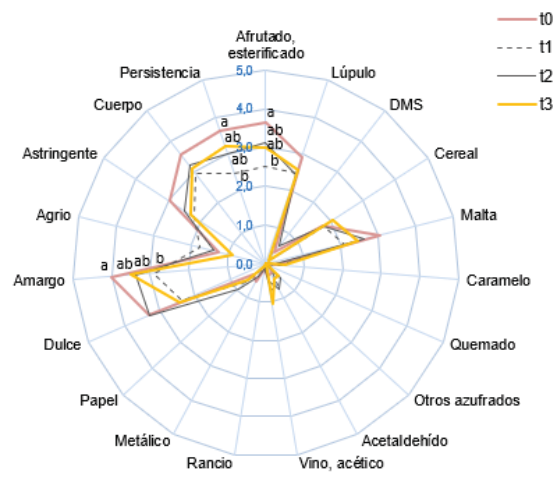
**Figura 7.11.** Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP (PT) y de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión (UHPH) después de 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C ( $t_3$ ). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD).



**a) Aroma**

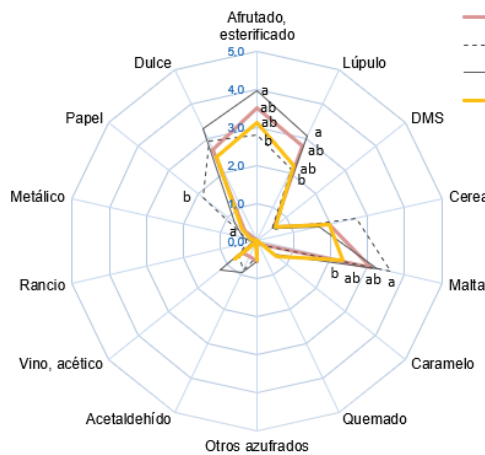


**b) Gusto**

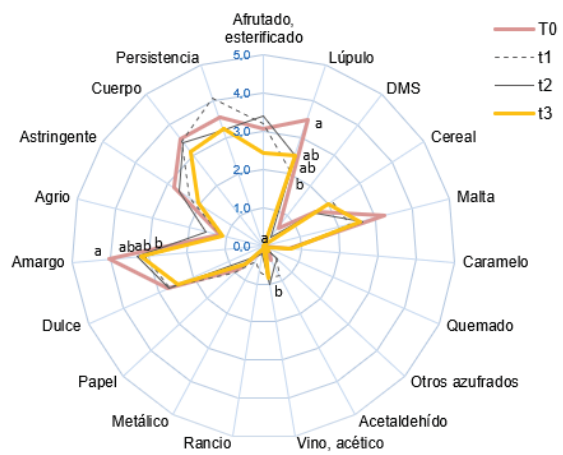


**Figura 7.12.** Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas tratadas con homogenización a ultra alta presión a [redacted] recién obtenidas (t<sub>0</sub>) y durante 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD).

**a) Aroma**



**b) Gusto**



**Figura 7.13.** Perfil sensorial descriptivo del a) aroma y b) gusto de las cervezas pasteurizadas térmicamente a 15 UP recién obtenidas (t<sub>0</sub>) y durante 3 meses de envejecimiento acelerado a 35 °C (t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>). Los valores representan las medias de las puntuaciones. Letras diferentes en un mismo eje (atributo) indican diferencias significativas entre las medias con un nivel de confianza del 95% (prueba LSD).

## 7.2. Conclusiones

Inicialmente, el panel de degustadores entrenados detectó diferencias significativas entre cervezas recién tratadas con UHPH (████████) y cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP), mediante pruebas de degustación triangulares. En pruebas de degustación de perfil descriptivo se demostró que las cervezas recién obtenidas con los tratamientos UHPH (████████) presentaron, en gusto, niveles de notas afrutadas más elevados que las cervezas recién pasteurizadas térmicamente, mientras que, en aroma, no se observaron diferencias significativas entre ambas cervezas. No obstante, estos resultados no se observaron a nivel analítico. El tipo de tratamiento no afectó a la percepción sensorial de compuestos indicadores de envejecimiento, ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído.

Después de un mes de envejecimiento acelerado, los degustadores no pudieron distinguir entre ambas cervezas mediante pruebas de degustación triangulares. En cambio, en las degustaciones de perfil descriptivo, se observó que algunos atributos evolucionaron de forma diferente. En las cervezas pasteurizadas térmicamente, el gusto y el aroma a lúpulo disminuyeron significativamente mientras que el aroma a papel aumentó. Por el contrario, las cervezas tratadas con UHPH (████████), perdieron persistencia y aroma dulce. Entre estos atributos, la persistencia fue significativamente mayor en cervezas pasteurizadas térmicamente que en cervezas tratadas con UHPH (████████) y las notas de papel fueron significativamente menores en cervezas tratadas con UHPH (████████) que en cervezas pasteurizadas térmicamente, indicativo de que las cervezas tratadas con UHPH estaban menos envejecidas que las pasteurizadas térmicamente. Estos resultados coincidieron con los valores de percepción sensorial, ya que se observaron niveles de (E)-2-nonenal significativamente superiores en cervezas pasteurizadas térmicamente que en cervezas tratadas con UHPH (300 MPa), diferencias que alterarían considerablemente el perfil de la cerveza y serían identificadas por los degustadores.

A tiempos de envejecimiento acelerado más avanzados, después de 2 y 3 meses de evolución, los degustadores no volvieron a diferenciar entre cervezas pasteurizadas térmicamente y cervezas tratadas con UHPH (████████) en pruebas de degustación triangulares. Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre ambas cervezas en ninguno de los atributos evaluados en las degustaciones de perfil descriptivo. A nivel analítico, tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de percepción sensorial de compuestos indicadores de envejecimiento, ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído de ambas cervezas, probablemente debido a su avanzado estado de envejecimiento. El ACP realizado tampoco permitió diferenciar entre las diferentes cervezas obtenidas.

## Capítulo 8. Conclusiones



En base a los resultados expuestos, las **conclusiones generales** de la presente tesis son:

1. La aplicación de la tecnología de homogenización a ultra alta presión (UHPH) es viable técnicamente para el tratamiento de cerveza carbonatada
2. La aplicación de los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa ( $T_E$  [REDACTED]) resultaron eficaces para la inactivación de los microorganismos típicos en cerveza.
3. En base a los parámetros de calidad fisicoquímicos (capacidad de retención de espuma, turbidez coloidal, color y compuestos amargos) y oxidativos (potencial oxidativo, potencial antioxidante endógeno y anhídrido sulfuroso) más importantes en cerveza:
  - 3.1. Los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa no presentaron diferencias significativas en comparación con la pasteurización térmica convencional (15 UP).
  - 3.2. Los tratamientos UHPH a [REDACTED] MPa afectaron negativamente a los compuestos amargos, capacidad de retención de espuma, turbidez coloidal y color. Dicho efecto observado, tendió a incrementar con el aumento de la presión aplicada en el tratamiento UHPH (excepto en el caso del color).
  - 3.3. Las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa presentaron una mejor estabilidad oxidativa que las demás cervezas analizadas.
4. En base a los parámetros de calidad sensoriales (análisis del contenido y percepción sensorial de compuestos indicadores de envejecimiento y compuestos de perfil volátil, y degustaciones sensoriales) más importantes en cerveza:
  - 4.1. Las cervezas tratadas con UHPH [REDACTED] MPa) presentaron un gusto afrutado mayor que las cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP). Sin embargo, estos resultados no se observaron a nivel analítico, pues el tipo de tratamiento no afectó a la percepción sensorial de los compuestos indicadores de envejecimiento, ésteres, alcoholes superiores y acetaldehído analizados.
  - 4.2. Después de un mes de envejecimiento acelerado, las cervezas pasteurizadas térmicamente (15 UP) presentaron notas de sabor a papel y una persistencia mayores que las cervezas tratadas con UHPH ([REDACTED] MPa). Estos resultados coincidieron con los resultados analíticos, ya que las cervezas pasteurizadas térmicamente presentaron concentraciones de compuestos indicadores de daño térmico (furfural y  $\gamma$ -nonalactona) y valores de percepción sensorial de (E)-2-nonenal significativamente superiores que las cervezas tratadas con UHPH ([REDACTED] MPa), indicativo de que las tratadas con UHPH estaban menos envejecidas que las pasteurizadas térmicamente.

5. Todas las cervezas envejecidas durante 2 y 3 meses a condiciones aceleradas (35 °C) se presentaron un estado de envejecimiento muy avanzado, afectando seriamente a sus propiedades fisicoquímicas, oxidativas y sensoriales.

## Capítulo 9. Referencias



- Amador-Espejo, G. G., Suárez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M. E., & Trujillo, A. J. (2014). Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of Dairy Science*, *97*(2), 659–671. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7245>
- Andersen, M. L., Outtrup, H., & Skibsted, L. H. (2000). Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3106–3111. <https://doi.org/10.1021/jf000354+>
- Aron, P. M., & Shellhammer, T. H. (2010). A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(4), 369–380. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x>
- ASBC Methods of Analysis. Beer 21. Total Sulfur Dioxide. (2011). *American Society of Brewing Chemists*, 1–3. <https://doi.org/10.1094/asbcmoa-beer-21>
- ASBC Methods of Analysis. Beer 46. Measurement of Oxidative Resistance in Beer by Electron Paramagnetic Resonance. (2011). *American Society of Brewing Chemists*, 1–3. <https://doi.org/10.1094/asbcmoa-beer-46>
- Baert, J. J., De Clippeleer, J., Hughes, P. S., De Cooman, L., & Aerts, G. (2012). On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(46), 11449–11472. <https://doi.org/10.1021/jf303670z>
- Balasubramaniam, V. M. (Bala), Martínez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and Application of High Pressure–Based Technologies in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, *6*(1), 435–462. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539>
- Bamforth, C. W. (2011). 125th Anniversary Review : The Non-Biological Instability of Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(4), 488–497.
- Bamforth, C. W., & Lentini, A. (2009). The flavor instability of beer. *Beer. A Quality Perspective*, *2001*, 85–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-669201-3.00003-8>
- Barker, B. R. L., Pipasts, P., & Leiska, E. (1983). Liberation of staling aldehydes during storage of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, *89*, 411–415.

- Blanco, C. A., Nimubona, D., & Caballero, I. (2014). Prediction of the ageing of commercial lager beer during storage based on the degradation of iso- $\alpha$ -acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(10), 1988–1993. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6513>
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., & Stevens, R. (2004). *Brewing: science and practice: brewing processes*.
- Buzrul, S., Alpas, H., & Bozoglu, F. (2005a). Effect of high hydrostatic pressure on quality parameters of lager beer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(10), 1672–1676. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2166>
- Buzrul, S., Alpas, H., & Bozoglu, F. (2005b). Effects of high hydrostatic pressure on shelf life of lager beer. *European Food Research and Technology*, *220*(5–6), 615–618. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1086-z>
- Caballero, I., Blanco, C. A., & Porras, M. (2012). Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science and Technology*, *26*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Callemien, D., & Collin, S. (2007). Involvement of flavanoids in beer color instability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(22), 9066–9073. <https://doi.org/10.1021/jf0716230>
- Cao, L., Zhou, G., Guo, P., & Li, Y. (2011). Influence of Pasteurising Intensity on Beer Flavour Stability. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(1), 587–592. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00508.x>
- Castellari, M., Arfelli, G., Riponi, C., Carpi, G., & Amati, A. (2000). High Hydrostatic Pressure Treatments for Beer Stabilization. *Food Engineering and Physical Properties*, *65*(6), 974–977.
- Cerveceros de España. (2019). Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2019. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, 1–48.
- Codina-Torrella, I., Guamis, B., Zamora, A., Quevedo, J. M., & Trujillo, A. J. (2018). Microbiological stabilization of tiger nuts' milk beverage using ultra-high pressure homogenization . A preliminary study on microbial shelf-life extension. *Food Microbiology*, *69*, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.002>
- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007). Ultra



high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*, 40(6), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.003>

De Cooman, L., Aerts, G., Overmeire, H., & De Keukeleire, D. (2000). Alterations of the profiles of iso- $\alpha$ -acids during beer ageing, marked instability of trans-iso- $\alpha$ -acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso- $\alpha$ -acids. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(3), 169–178. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00054.x>

De Keukeleire, D., Keyerick, A., Huvaere, K., Skibsted, L. H., & Andersen, M. L. (2009). Beer Lightstruck Flavor: The Full Story. *Hop Flavor and Aroma, Proceedings of the 1st International Brewers Symposium, Master Brewers Association of the Americas and American Society of Brewing Chemists, July*, 1–16.

De Schutter, D. P., Saison, D., Delvaux, F., Derdelinckx, G., & Delvaux, F. R. (2008). The chemistry of aging beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00036-5>

*EBC Analytica*, 13.10. *Sensory analysis: description analysis (IM)*. (1997). 12(Im), 1–6.

*EBC Analytica*, 13.2. *Sensory analysis: tasting area, equipment, conduct of test*. (2010). 1–6.

*EBC Analytica*, 13.3. *Sensory analysis: (Guideline for) choice of method (IM)*. (2012). 1–5.

*EBC Analytica*, 13.4. *Sensory analysis: selection and training of assessors (IM) (AM)*. (1997). 1–7.

*EBC Analytica*, 13.7. *Sensory analysis: triangle test*. (2007). 1–9.

*EBC Analytica*, 2.1.4. *Pasteurisation*. (2011). 1–3.

*EBC Analytica*, 2.3.1 *Dilution of samples*. (2011). 2–3.

*EBC Analytica*, 2.3.2.1. *Laboratory membrane filtration technique*. (2011). 1–3.

*EBC Analytica*, 2.3.3.2. *Surface spread plating technique*. (2011). 1–2.

*EBC Analytica*, 4.2.4.2. *Lactobacillus and Pediococcus*. (2011). 1–3.

*EBC Analytica*, 4.2.5.2. *Heat differentiation*. (2011). 1, 2.

*EBC Analytica*, 4.3.2.1. *General aerobic count on beer*. (2011). 4–5.

- EBC Analytica*, 9.29 Haze in beer: calibration of haze meters. (2015). 1–8.
- EBC Analytica*, 9.42.1 Foam stability of beer using the Nibem-T meter. (2004). 1–4.
- EBC Analytica*, 9.6 Colour of beer: spectrophotometric method (IM). (2000). 1–2.
- EBC Analytica*, 9.8 Bitterness Units (BU) of Beer (IM). (2020). 1–4.
- Evans, D. E., Sheehan, M. C., & Stewart, D. C. (1999). The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part II: The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(3), 171–178. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1999.tb00016.x>
- Evans, D. Evan, & Bamforth, C. W. (2009). Beer foam: Achieving a suitable head. In *Beer. A quality perspective*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-669201-3.00001-4>
- Evans, D. Evan, & Sheehan, M. C. (2002). Don't be fobbed off: The substance of beer foam - A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 60(2), 47–57. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-60-0047>
- Feilner, R., & Jacob, F. F. (2015). Improving Resistance to Aging and Increasing Haze Stability in Southern German Wheat Beer Through Process Optimization. *Brewing Science*, 68(May/June), 58–66.
- Feilner, R., & Oehmichen, T. (2016). Flash pasteurisation of filtrated-and wheat beer with one heat holding tube: A process comparison with shortened heat-holding. *BrewingScience*, 69(9–10), 64–72.
- Fischer, S., Ruß, W., Buckow, R., Heinz, V., Ulmer, H., Behr, J., Knorr, D., & Vogel, R. F. (2006). Effects of hydrostatic high pressure on micro- biological and technological characteristics of beer. *Monatsschrift Für Brauwissenschaft*, May/June, 90–99.
- Fischer, S., Russ, W., & Meyer-Pittroff, R. (2002). High pressure advantages for brewery processes. *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, 19, 397–404. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Franchi, M. A., Tribst, A. A. L., & Cristianini, M. (2011a). Effects of High Pressure Homogenization on Beer Quality Attributes. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 117(2), 195–198.
- Franchi, M. A., Tribst, A. A. L., & Cristianini, M. (2011b). Inactivation of *Lactobacillus brevis*

- in beer utilizing a combination of high-pressure homogenization and lysozyme treatment. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 634–638. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00515.x>
- Franchi, Mark Alexandrow, Tribst, A. A. L., & Cristianini, M. (2013). High-pressure homogenization: A non-thermal process applied for inactivation of spoilage microorganisms in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), 237–241. <https://doi.org/10.1002/jib.99>
- Fricker, R. (1984). The flash pasteurisation of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 146–152.
- Gänzle, M. G., Ulmer, H. M., & Vogel, R. F. (2001). High pressure inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a model beer system. *Journal of Food Science*, 66, 1174–1181.
- Gibson, B., Aumala, V., Heiniö, R., Mikkelsen, A., & Honkapää, K. (2018). Differential evolution of Strecker and non-Strecker aldehydes during aging of pale and dark beers. *Journal of Cereal Science*, 83(May), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.009>
- Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70(3), S0022029903006320. <https://doi.org/10.1017/S0022029903006320>
- He, G. Q., Wang, Z. Y., Liu, Z. S., Chen, Q. H., Ruan, H., & Schwarz, P. B. (2006). Relationship of proteinase activity, foam proteins, and head retention in unpasteurized beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64(1), 33–38. <https://doi.org/10.1094/asbcj-64-0033>
- Herrmann, M., Klotzbucher, B., Wurzbacher, M., Hanke, S., Kattein, U., Back, W., Becker, T., & Krottenthaler, M. (2010). A new validation of relevant substances for the evaluation of beer aging depending on the employed boiling system. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 41–48. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00396.x>
- Hiralal, L., Pillay, B., & Olaniran, A. O. (2013). Stability profile of flavour-active ester compounds in ale and lager beer during storage. *African Journal of Biotechnology*, 12(5), 491–498. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1965>
- Hoff, S., Lund, M. N., Petersen, M. A., Frank, W., & Andersen, M. L. (2013). Storage stability of pasteurized non-filtered beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 172–181. <https://doi.org/10.1002/jib.85>

- Holt, S., Miks, M. H., Carvalho, B. T. De, Thevelein, J. M., Foulqui, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(3), 193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>
- Hughes, P. (n.d.). *Mechanism of  $\alpha$ -acid isomerization and approaches to the control of iso- $\alpha$ -acid stereochemistry*.
- Hughes, P. (2009). Beer flavor. In *Beer. A quality perspective*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-669201-3.00002-6>
- Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., & Koshino, S. (1994). Free radical reactions in beer during pasteurization. *International Journal of Food Science and Technology*, *29*, 195–200.
- Kappler, S., Krahl, M., Geissinger, C., Becker, T., & Krottenthaler, M. (2010). Degradation of iso- $\alpha$ -acids during wort boiling. *Journal of the Institute of Brewing*, *116*(4), 332–338. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00783.x>
- Karabín, M., Rýparová, A., Jelínek, L., Kunz, T., Wietstock, P., Methner, F. J., & Dostálek, P. (2014). Relationship of iso- $\alpha$ -acid content and endogenous antioxidative potential during storage of lager beer. *Journal of the Institute of Brewing*, *120*(3), 212–219. <https://doi.org/10.1002/jib.140>
- Kunz, T., & Mesasuring, H. (2012). EAP determination and Beverage Antioxidative Index (BAX) – Advantageous tools for evaluation of the oxidative flavour stability of beer and beverages. *Brewing Science*, *65*(January / February), 12–22.
- Kunz, T., Müller, C., & Methner, F. J. (2013). EAP determination and beverage antioxidative Index (BAX) - Advantageous tools for evaluation of the oxidative flavour stability of beer and beverages (Part 1). *Brewing Science*, *66*(1–2), 12–22.
- Lehnhardt, F., Becker, T., & Gastl, M. (2020). Flavor stability assessment of lager beer : what we can learn by comparing established methods. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03477-0>
- Leiper, K. A., & Miedl, M. (2009). Colloidal stability of beer. In *Beer. A quality perspective*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-669201-3.00004-X>
- Lermusieau, G., Noël, S., Liégeois, C., & Collin, S. (1999). Nonoxidative mechanism for

- development of trans-2-nonenal in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(1), 29–33. <https://doi.org/10.1094/asbcj-57-0029>
- Li, H., Zhao, M., Cui, C., Sun, W., & Zhao, H. (2016). Antioxidant activity and typical ageing compounds: their evolutions and relationships during the storage of lager beers. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2026–2033. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13173>
- Liu, C., Li, Q., Niu, C., Zheng, F., & Zhao, Y. (2018). Simultaneous determination of diethylacetal and acetaldehyde during beer fermentation and storage process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4733–4741. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9008>
- Liu, J., Zamora, A., Castillo, M., & Saldo, J. (2018). Modeling the effect on skim milk during ultra-high pressure homogenization using front-face fluorescence. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47(October 2017), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.009>
- Loira, I., Morata, A., Bañuelos, M. A., Puig-Pujol, A., Guamis, B., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). Use of Ultra-High Pressure Homogenization processing in winemaking: Control of microbial populations in grape musts and effects in sensory quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 50(May), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.005>
- Lorencová, E., Salek, R. N., Černošková, I., & Buňka, F. (2019). Evaluation of force-carbonated Czech-type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. *Food Control*, 106(June), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106706>
- Lund, M. N., Hoff, S., Berner, T. S., Lametsch, R., & Andersen, M. L. (2012). Effect of pasteurization on the protein composition and oxidative stability of beer during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12362–12370. <https://doi.org/10.1021/jf303044a>
- Lund, M. N., Krämer, A. C., & Andersen, M. L. (2015). Antioxidative Mechanisms of Sulfite and Protein-Derived Thiols during Early Stages of Metal Induced Oxidative Reactions in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8254–8261. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02617>
- Madigan, D., Perez, A., & Clements, M. (1998). Furanic aldehyde analysis by HPLC as a method to determine heat-induced flavor damage to beer. *Journal of the American Society of*

*Brewing Chemists*, 56(4), 146–151. <https://doi.org/10.1094/asbcj-56-0146>

- Malfliet, S., Van Opstaele, F., De Clippeleer, J., Syryn, E., Goiris, K., De Cooman, L., & Aerts, G. (2008). Flavour instability of pale lager beers: Determination of analytical markers in relation to sensory ageing. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(2), 180–192. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00324.x>
- Martinez-Periñan, E., Hernández-Artiga, M. P., Palacios-Aantander, J. M., Elkaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., & Bellido-Milla, D. (2011). Estimation of beer stability by sulphur dioxide and polyphenol determination . Evaluation of a Laccase-Sonogel-Carbon biosensor. *Food Chemistry*, 127, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.097>
- Mastanjević, K., Krstanović, V., Lukinac, J., Jukić, M., Vulin, Z., & Mastanjević, K. (2018). Beer—the importance of colloidal stability (non-biological haze). *Fermentation*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation4040091>
- Meilgaard, M. C. (1975). Flavor chemistry of beer: part II: flavour and threshold of 239 aroma volatiles. *Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas*, 12(3), 151–168.
- Mezui, A. M. (2012). *The effect of UV-C treatment on the biochemical composition of beer* (Issue March). University of Stellenbosch.
- Milani, E. A., Gardner, R. C., & Silva, F. V. M. (2015). Thermal resistance of *Saccharomyces* yeast ascospores in beers. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.002>
- Milani, E. A., Ramsey, J. G., & Silva, F. V. M. (2016a). High pressure processing and thermosonication of beer: Comparing the energy requirements and *Saccharomyces cerevisiae* ascospores inactivation with thermal processing and modeling. *Journal of Food Engineering*, 181(April), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.023>
- Milani, E. A., Ramsey, J. G., & Silva, F. V. M. (2016b). High pressure processing and thermosonication of beer: Comparing the energy requirements and *Saccharomyces cerevisiae* ascospores inactivation with thermal processing and modeling. *Journal of Food Engineering*, 181, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.023>
- Morata, A., & Guamis, B. (2020). *Use of UHPH to obtain juices with better nutritional quality and healthier wines with low levels of SO<sub>2</sub>*. 7(December), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.598286>

- Niu, C., Han, Y., Wang, J., Zheng, F., Liu, C., Li, Y., & Li, Q. (2018). Malt derived proteins: Effect of protein Z on beer foam stability. *Food Bioscience*, 25(October 2017), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.07.003>
- Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer : production , regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing & Distilling*, 123, 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of Ultra-High Pressure Homogenization on Microbial and Physicochemical Shelf Life of Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1081–1093. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71595-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3)
- Poliseli-scopel, F. H., Hernández-herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012). Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological , physical and chemical quality of soymilk. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.004>
- Rachon, G., Rice, C. J., Pawlowsky, K., & Raleigh, C. P. (2018). Challenging the assumptions around the pasteurisation requirements of beer spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 443–449. <https://doi.org/10.1002/jib.520>
- Ramey, D. D., & Ough, C. S. (1980). Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1969), 928–934. <https://doi.org/10.1021/jf60231a021>
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1251–1260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>
- Rodrigues, J., & Almeida, P. (2008). E-2-nonenal and  $\beta$ -damascenone in beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00038-9>
- Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*, 114(4), 1206–1215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.078>

- Santos, L. M. R., Oliveira, F. A., Ferreira, E. H. R., & Rosenthal, A. (2017). Application and possible benefits of high hydrostatic pressure or high-pressure homogenization on beer processing: A review. *Food Science and Technology International*, 23(7), 561–581. <https://doi.org/10.1177/1082013217714670>
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2009). Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 71–78. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1416>
- Serra, M., Trujillo, A. J., Pereda, J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2008). Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.010>
- Shellhammer, T. H. (2009). Beer color. In *Beer. A quality perspective*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-669201-3.00007-5>
- Siebert, K. J., Carrasco, A., & Lynn, P. Y. (1996). Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1997–2005. <https://doi.org/10.1021/jf950716r>
- Steiner, E., Becker, T., & Gastl, M. (2010). Turbidity and haze formation in beer - insights and overview. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 360–368. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00787.x>
- Stewart, G. G., Mader, A., Chlup, P., & Miedl, M. (2006). The Influence of Process Parameters on Beer Foam Stability. *MBAA Technical Quarterly*, 43(1), 47–51.
- Stulikova, K., Bulir, T., Nespor, J., Jelinek, L., Krabín, M., & Dostálek, P. (2020). Application of high-pressure processing to assure the storage stability of unfiltered lager beer. *Molecules*, 25(2414), 1–11.
- Suárez-Jacobo, A., Gervilla, R., Guamis, B., & Saldo, J. (2010). Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice A preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.011>
- Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. In *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (Issue 1892). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00007-1>



- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, *13*(6), 427–439. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00051-7)
- Ulmer, H. M., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 3966–3973.
- Ulmer, H. M., Heinz, V., Gänzle, M. G., Knorr, D., & Vogel, R. F. (2002). Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *Journal of Applied Microbiology*, *93*(2), 326–335. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01699.x>
- Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2007). Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*, *103*(2), 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.062>
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2003). Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6782–6790. <https://doi.org/10.1021/jf034631z>
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006a). The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chemistry*, *95*(3), 357–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.006>
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006b). The chemistry of beer aging - a critical review. *Food Chemistry*, *95*(3), 357–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.006>
- Vecchio, H. W. Del, Dayharsh, C. A., Baselt, F. C., Vecchio, H. W. Del, Dayharsh, C. A., & Death, F. C. B. T. (1951). Thermal Death Time Studies on Beer Spoilage Organisms – I. *Proceedings. Annual Meeting - American Society of Brewing Chemists*, *9*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1080/00960845.1951.12006391>
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., & Menz, G. (2012). 125th Anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*, *118*(4), 335–345. <https://doi.org/10.1002/jib.49>

- Wang, B., Liu, F., Luo, S., Li, P., Mu, D., Zhao, Y., Zhong, X., Jiang, S., & Zheng, Z. (2019). Effects of High Hydrostatic Pressure on the Properties of Heat-Induced Wheat Gluten Gels. *Food and Bioprocess Technology*, 12(2), 220–227. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2205-3>
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Wu, M. J., Rogers, P. J., & Clarke, F. M. (2012). 125th anniversary review: The role of proteins in beer redox stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/jib.17>
- Yin, H., Deng, Y., He, Y., Dong, J., Lu, J., & Chang, Z. (2017). A preliminary study of the quality attributes of a cloudy wheat beer treated by flash pasteurization. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 366–372. <https://doi.org/10.1002/jib.429>
- Yin, H., Dong, J., Yu, J., Chang, Z., Qian, Z., Liu, M., Huang, S., Hu, X., Liu, X., Deng, Y., & Wang, D. (2016). A preliminary study about the influence of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a cloudy wheat beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(3), 462–467. <https://doi.org/10.1002/jib.344>
- Zamora, A., & Guamis, B. (2014). Opportunities for Ultra-High-Pressure Homogenisation (UHPH) for the Food Industry. *Food Engineering Reviews*, 7(2), 130–142. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9097-4>
- Zhao, H. (2014). Endogenous Antioxidants and Antioxidant Activities of Beers. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (Issue June 2014). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00002-7>
- Zufall, B. C., Wackerbauer, K., Berlin, T. U., & Brauwesen, F. (2000). The Biological Impact of Flash Pasteurization Over a Wide Temperature Interval \*. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(3), 163–168.

Anexo



**Tabla A.1.** Recopilación de umbrales sensoriales (US), concentraciones típicas, umbral sensorial seleccionado para la presente tesis y descriptores sensoriales de los compuestos indicadores de envejecimiento y compuestos del perfil volátil en cerveza, según la base de datos de la *American Society of Brewing Chemists* (ASBC).

Compuesto	Conc. Mín. (mg/l)	Conc. Máx. (mg/l)	Conc. Promedio (mg/l)	Umbral sensorial reportado (mg/l)			Umbral sensorial seleccionado	Descriptor sensorial
				1	2	3		
<b>Indicadores de envejecimiento</b>								
Furfural	0,01	1,8	0,93	15	25	150	■	Caramel, pan, grano, carne cocida
5-metilfurfural	0,007	0,035	0,02	1,2	14	17	■	Almendra mazapán, picante, dulce, caramel, vainilla, quemado
Nicotinato de etilo	ND	ND	1,5	6	ND	ND	■	Medicina, tinción, disolvente, anís, grano, uva
$\gamma$ -nonalactona	0,02	0,5	0,3	0,03	ND	ND	■	Rancio, coco, vainilla, cola, afrutado
2-metilbutanal	0,001	30	15	0,045	1,25	ND	■	Césped, afrutado, queso, agrio/medicinal, almendra, malta
3-metilbutanal	0,002	0,3	0,15	0,06	0,6	ND	■	Malta, cereza, almendra, chocolate, manzana, queso, plátano verde
Benzaldehido	0,0008	0,025	0,013	0,5	0,6	2	■	Almendra amarga, cereza
Fenilacetaldehido	0,005	5	2,5	0,018	0,1	1,6	■	Floral (jacinto, rosas, lilas), miel, dulce, aldehído
(E)-2-nonenal	0,00001	0,002	0,001	0,00003	0,0001	ND	■	Papel, cartón, oxidado, lino, pepino, cera
2-acetilfurano	ND	ND	ND	80	0,5	ND	■	Almendra, goma, quemado, nuez
Succinato de dietilo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	■	ND
Etilfenilacetato	0,05	2	1	0,2	3,8	NIF	■	Rosas, miel, manzana, dulce, floral
2-propionilfurano	ND	ND	ND	ND	ND	ND	■	ND

(continuación)

**Tabla. A.1.** Continuación

Compuesto	Conc.	Conc.	Conc.	Umbral sensorial reportado			Umbral sensorial seleccionado	Descriptor sensorial
	Mín. (mg/l)	Máx. (mg/l)	Promedio (mg/l)	(mg/l)				
				1	2	3		
<b>Perfil volátil</b>								
<i>Ésteres</i>								
Acetato etilo	5	50	28	20	21	25	■	Disolvente, afrutado, dulce, esterificado
Propionato etilo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	■	ND
Acetato isobutilo	0,01	0,8	0,4	0,5	1,6	ND	■	Plátano, dulce, afrutado
Butirato etilo	0,004	0,4	0,2	0,4	ND	ND	■	Papaya, mantequilla, dulce, manzana, perfume, afrutado
Acetato de isoamilo	0,3	8	4,2	0,5	0,6	0,7	■	Afrutado, plátano, pera, disolvente, esterificado, manzana, dulce
Caproato etilo	0,008	1,5	0,75	0,17	0,2	0,25	■	Manzana amarga, anisado, afrutado, dulce, esterificado, disolvente
Caprilato etilo	0,04	1,5	0,77	0,3	0,6	0,9	■	Manzana, dulce, afrutado, manzana amarga
Caprato de etilo	0,1	4	2,1	5	10	ND	■	Caprífico
Ac. de β-feniletanol	0,05	2	1	0,2	3,8	ND	■	Rosas, miel, manzana, dulce, floral
<i>Alcoholes superiores</i>								
Isobutanol	4	60	32	80	160	100	■	Alcohol, malta, disolvente
Isoamílico	5,6	140	73	0,06	40	50	■	Alcohol, plátano, dulce, malta, vino, pungente
β-Feniletanol	2,3	100	51,2	0,04	25	40	■	Alcohol, floral, miel, rosas, dulce
<i>Acetaldehído</i>	1,2	37	19	1,1	10	25	■	Manzana verde, piel de manzana, pintura, hierba, hojas verdes