



Universitat de Lleida

Influencia de la variedad y zona de cultivo de cebada sobre las propiedades de malta, mosto y cerveza

Neus Prieto Diez

<http://hdl.handle.net/10803/688992>

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. 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.



Universitat de Lleida

Influencia de la variedad y zona de cultivo de cebada sobre las propiedades de malta, mosto y cerveza

Neus Prieto Diez

Memoria presentada para optar al grado de
Doctora por la Universitat de Lleida

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

Co-Directores

María Paz Romero Fabregat
Ignacio Romagosa Clariana

Tutora

María Paz Romero Fabregat

Lleida, abril de 2023

Esta memoria presentada por Neus Prieto Diez es para optar el grado de Doctora por la Universidad de Lleida. Este trabajo se ha realizado bajo la supervisión de la Dra. María Paz Romero Fabregat y el Dr. Ignacio Romagosa Clariana. Se ha llevado a cabo en el grupo de Antioxidants del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Lleida, así como en la Maltería La Moravia del Grupo Damm. Esta Tesis doctoral ha estado incluida en el programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria.

La financiación de la candidata a doctora fue una beca predoctoral del programa de Doctorats Industrials de la Generalitat de Catalunya (de mayo de 2019 a abril de 2022) con referencia 2018DI92.

A mi abuela Goya. Mi tesoro.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, la Dra. María Paz Romero y el Dr. Ignacio Romagosa, así como a mi responsable en industria del Doctorado Industrial, el Dr. Tomás Ramo Aparicio. He aprendido mucho a vuestro lado. Gracias por verme capaz para este proyecto, por confiar en mí y por darme esta maravillosa oportunidad que me ha cambiado la vida.

Agradecer a todos aquellos que han hecho posible este proyecto: a la Dra. Roxana Savin, por sus conocimientos sobre la materia y las muestras nitrogenadas; a la Dra. Alba Macià, por todo el trabajo fenólico que conllevaron mis muestras; al equipo del Laboratorio Central del Grupo Damm, que me ayudaron con las infinitas muestras de mosto y cerveza; a Mireia Cisternas, por proporcionar el lúpulo y las botellas necesarias para esta Tesis; a la Dra. Mariona Martínez, por sus conocimientos sobre fenoles y cebada, además de ser una gran compañera; al Dr. Patrick Hayes, por acogerme en Oregón; a Santiago Romagosa, por ayudarme a entender el no-funcionamiento de los equipos PicoBrew; a Semillas Batlle, por permitirme usar su calibradora y limpiadora de semillas; así como a Ramón Camarasa S.L, a la Cooperativa Los Monegros y al Dr. Ernesto Igartua de la Estación Experimental de Aula Dei (EEAD, CSIC, Zaragoza), por proporcionar para esta Tesis las muestras de cebada cultivadas en sus campos experimentales.

A todos y cada uno de mis compañeros de la Maltería La Moravia, que de una u otra forma me han ayudado entre sacos y muestras. Gracias por ayudarme a encontrar la motivación cuando la perdía. En especial quiero agradecer a la Dra. María Jesús Tovar de Dios por ser mi compañera de trincheras, tanto por su ayuda en lo profesional como en lo personal. No sabes lo afortunada que me siento de haber trabajado contigo y lo mucho que he aprendido a tu lado. Agradecer también a mis compañeros Jordi Sisques, por su ayuda incondicional, y Juan Antonio Álvarez, por su paciencia. Gracias a todos por acompañarme en este pedazo de viaje.

A Pere, por haber sido mi compañero. Sé que no fue fácil y a pesar de ello estuviste ahí. Gracias por alentarme a seguir y vivir mis logros como propios. Esta Tesis tiene como banda sonora tus playlists. ¡El siguiente eres tú!

Agradecer a mis chicas, Silvia e Iziar. A pesar de la distancia siempre habéis sido mis pilares científicos. Siempre nos quedarán las codornices (olorosas).

A Maria, Dúnia y Lull, mi familia. Habéis aguantado como nadie mis interminables charlas sobre cerveza y los ataques (en plural) de mi rodilla salvaje. No tengo palabras para agradecer todo vuestro apoyo, amor y locura. Qué maravilloso crecer juntos y qué bonito ver todo lo que hemos logrado.

Quiero agradecer también a mis compañeros de escalada. Gracias por portearme y compartir tantos momentos y cervezas que han hecho que me evada en más de un bajón doctoral.

Pero por encima de todo, quiero agradecer a mis padres, Carmen y Rafael. Gracias por vuestro amor incondicional y paciencia (mucha), por transmitirme felicidad, por enseñarme a luchar, por repetirme desde pequeña que era capaz de todo y, como no, por los tupperes... Sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Sois mi suerte.

Un trocito de esta Tesis es de cada uno de vosotros.

RESUMEN

La búsqueda de estabilidad en los parámetros de calidad del producto que ofrece la industria cervecera es un reto continuo. El hecho de no poder asegurar la estabilidad en la calidad de la cebada supone un desafío, no tan solo para la industria cervecera, sino también para las malterías, quienes son las responsables de asegurar que los parámetros de calidad de la malta final sean idóneos para la elaboración de cerveza de calidad. No obstante, cada variedad de cebada puede adaptarse de forma distinta a los cambios inducidos por las condiciones del año de cultivo, al mismo tiempo que cada genotipo puede reaccionar de manera distinta a las condiciones del proceso de malteado que se apliquen, por lo que también resultaría ser un factor que va a suponer todo un reto tratar de controlar. En este contexto, se plantea un estudio con seis variedades de uso industrial, cultivadas durante dos años de cultivo en cuatro zonas distintas del Valle del Ebro, considerada como una de las principales zonas de cultivo de cebada maltera en España. Además, en una de las zonas de cultivo, se llevaron a cabo ensayos con fertilización nitrogenada diferencial para evaluar su implicación sobre compuestos determinantes del aroma de la cerveza. En el marco de esta Tesis, se ha validado un método alternativo de micro-malteado por medio de bolsas de malla tras obtener resultados significativamente más representativos de la calidad industrial respecto al método tradicional en planta piloto. También se ha evaluado la repetibilidad de equipos comerciales para la elaboración de cerveza a pequeña escala. Se ha determinado el año como una variable con efecto significativo más importante que los efectos genotípicos, tanto en la variabilidad del perfil fenólico en la cebada y la malta, como en el perfil de aminoácidos y compuestos aromáticos volátiles del mosto cervecero y de la cerveza. La fertilización con nitrógeno también ha resultado tener una implicación significativa sobre la variabilidad fenólica en la cebada y la malta, al contrario que sobre los parámetros analizados en los mostos y la cerveza, puesto que su efecto ha sido relativamente bajo. A lo largo de esta Tesis, la variable genotipo no ha resultado tener una implicación significativa de manera individual sobre las muestras estudiadas, cobrando más importancia el año, el manejo y la zona de cultivo. Por otro lado, analizando todas las zonas de cultivo de manera conjunta, se ha observado una disminución considerable del efecto significativo de las variables de estudio conforme avanzaba el proceso, desde el malteado a la fabricación del mosto y a la fermentación. Además, en la cebada y la malta se ha podido determinar un importante componente genético sobre algunos de los parámetros estudiados, que ha ido disminuyendo en los mostos y sus correspondientes cervezas. En otras palabras, se ha evidenciado que la zona de cultivo y su manejo tienen un cierto impacto sobre alguno de los parámetros de calidad de la malta y alguno de los compuestos aromáticos de las cervezas analizadas. Así como las condiciones del proceso, puesto que en esta Tesis la variable año incluye tanto las condiciones ambientales como las condiciones de proceso, como conjunto de malteado y elaboración de cerveza. No obstante, los resultados obtenidos parecen indicar que tanto el proceso de malteado, de elaboración del mosto, de fermentación y de maduración, equiparan las diferencias presentes en las cebadas de partida, obteniendo una cerveza final equilibrada sin grandes variabilidades sobre sus componentes aromáticos.

RESUM

La cerca d'estabilitat dels paràmetres de qualitat del producte que ofereix la indústria de la cervesa és un repte continu. El fet de no poder assegurar un equilibri en la qualitat de l'ordi suposa un desafiament, i no sols per la indústria cervesera, sinó també per les malteries, les quals són les responsables d'assegurar que els paràmetres de qualitat de la malta final siguin els idonis per poder elaborar cerveses de qualitat. No obstant, les diferents varietats d'ordi poden arribar a adaptar-se de forma diferent als canvis induïts per les condicions de l'any de cultiu, així com poden reaccionar distintament a les condicions del procés de maltejat que s'apliquen, pel que resulta ser un factor que suposarà tot un repte poder-lo controlar. En aquest context, es planteja un estudi amb sis varietats d'ús industrial, cultivades durant dos anys de cultiu a quatre zones del Valle del Ebro, considerada com una de les principals zones de cultiu d'ordi malter a España. Tanmateix, en una de les zones de cultiu, es va dur a terme assajos amb fertilització nitrogenada diferencial per avaluar així la seva implicació sobre els compostos determinants de l'amora de la cervesa. En el marc d'aquesta Tesi, s'ha pogut validar un mètode alternatiu de micro-maltejat mitjançant bosses de malla, donat que es van obtenir resultats significativament més representatius de la qualitat industrial respecte al mètode tradicional de micro-maltejat en planta pilot. Així també, s'ha avaluat la repetibilitat d'equips comercials per a la elaboració de cervesa a petita escala. S'ha determinat l'any com una variable amb efecte significatiu més important que els efectes genotípics, tant a la variabilitat del perfil fenòlic de l'ordi i la malta, com al perfil d'aminoàcids i compostos aromàtics volàtils del most cerveser i de la cervesa. La fertilització amb nitrogen també ha resultat tenir una implicació significativa sobre la variabilitat fenòlica de l'ordi i la malta, al contrari que sobre els paràmetres analitzats als mostos i a les cerveses, atès que el seu efecte ha resultat ser relativament baix. En altres paraules, el genotip no ha resultat tenir una implicació significativa de manera individual sobre les mostres estudiades en aquesta Tesi, obtenint més importància l'any, el maneig i la zona de cultiu. Altrament, analitzant totes les zones de cultiu conjuntament, s'ha observat una disminució considerable de l'efecte significatiu de les variables d'estudi a mesura que avançava el procés, des del maltejat fins l'elaboració del most i la seva fermentació. En concret, a les mostres d'ordi i de malta s'ha pogut determinar un important component genètic sobre algun dels paràmetres estudiats, el qual ha anat disminuint a les mostres de most i les seves corresponents cerveses. És a dir, s'ha evidenciat que la zona de cultiu i el seu maneig tenen cert impacte sobre algun dels paràmetres de qualitat de la malta i sobre algun dels compostos aromàtics de les cerveses estudiades. De la mateixa manera, les condicions de procés també han resultat tenir impacte en la qualitat final, donat que en aquesta Tesi la variable any inclou tant les condicions ambientals com les condicions de procés, essent un conjunt entre el maltejat i l'elaboració de cervesa. A tall de conclusió, els resultats obtinguts semblen indicar que tant el procés de maltejat, d'elaboració del most, la fermentació i la maduració de la cervesa, acaben equiparant les diferències presents a l'ordi de partida, obtenint una cervesa final equilibrada sense grans variabilitats sobre els seus perfils aromàtics.

SUMMARY

The search for stability in the quality parameters of the product offered by the brewing industry is a continuous challenge. Not being able to ensure stability in barley quality is a challenge not only for the brewing industry, but also for the malting houses, which are responsible for ensuring that the quality parameters of the final malt are suitable for the production of quality beer. However, each barley variety may adapt differently to the changes induced by the growing year conditions, while each genotype may react differently to the malting process conditions applied, which would also prove to be a challenging factor to control. In this context, a study is proposed with six commercial varieties, grown during two years of cultivation in four different areas of the Valle del Ebro, considered to be one of the main growing areas for malting barley in Spain. In addition, in one of the cultivation areas, trials were carried out with differential nitrogen fertilization to evaluate its implication on aroma-determining compounds in beer. Within the framework of this Thesis, an alternative mesh-bah micro-malting method has been validated after obtaining results that are significantly more representative of industrial quality than the traditional method in a pilot plant. The repeatability of commercial equipment for small-scale brewing has also been evaluated. Year has been identified as a variable with a significant effect more important than genotypic effects, both on the variability of the phenolic profile in barley and malt, and on the amino acid and volatile aroma compounds profile of the brewing wort and beer. Nitrogen fertilization was also found to have a significant implication on phenolic variability in barley and malt, in contrast to the parameters analyzed in wort and beer, as its effect was relatively low. Throughout this Thesis, the genotype variable has not been found to have a significant implication individually on the samples studied, with the year, management and growing area becoming more important. On the other hand, analyzing all the cultivation areas together, a considerable decrease in the significant effect of the variables under study was observed as the process progressed, from malting to wort production and fermentation. Moreover, in barley and malt, it has been possible to determine an important genetic component on some of the parameters studied, which has been decreasing in the wort and their corresponding beers. In other words, it has been shown that the cultivation area and its management have a certain impact on some of the malt quality parameters and some of the aromatic compounds of the beers analyzed. The same applies to the process conditions, since in this Thesis the variable year includes both the environmental conditions and the process conditions, as a whole malting and brewing process. Nevertheless, the results obtained seem to indicate that both the malting, wort brewing, fermentation and maturation processes equalize the differences present in the starting barleys, obtaining a balanced final beer without great variability in its aromatic components.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	La cebada.....	3
1.1.1.	Cultivo de cebada	3
1.1.2.	Desarrollo de la planta.....	3
1.1.3.	Estructura y composición del grano	4
1.2.	La malta	6
1.2.1.	Remojo.....	6
1.2.2.	Germinación	7
1.2.3.	Secado-tostado.....	9
1.3.	La cerveza	10
1.3.1.	Maceración	10
1.3.2.	Ebullición	10
1.3.3.	Fermentación.....	11
1.3.4.	Maduración y clarificación.....	11
2.	ANTECEDENTES	15
2.1.	A pequeña escala.....	15
2.1.1.	Micro-malteado	15
2.1.2.	Micro-cervecería.....	17
2.2.	Manejo del cultivo y factores agroclimáticos.....	19
2.2.1.	Fertilización con nitrógeno	19
2.2.2.	Factores ambientales.....	20
2.3.	Relación entre malta y cerveza	23
2.3.1.	Influencia varietal	23
2.3.2.	Influencia del proceso.....	24
2.4.	Desarrollo del sabor de la cerveza	27
2.4.1.	Implicación de los ácidos grasos.....	30
2.4.2.	Papel de los minerales.....	31
2.4.3.	Implicación de los compuestos fenólicos	33
2.4.4.	Implicación de los aminoácidos.....	36
2.4.5.	Compuestos aromáticos volátiles.....	41
2.4.5.1.	Alcoholes superiores	41
2.5.5.2.	Ésteres	43
2.5.5.3.	Otros compuestos	45
3.	OBJETIVOS	497
4.	PLAN DE TRABAJO	53
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	575
5.1.	Diseño experimental	57
5.1.1.	Cebada	57
5.1.2.	Ensayos	57
5.1.2.1.	Evaluación agronómica.....	57
5.1.2.2.	Tratamiento nitrogenado	58

5.1.3.	Condiciones climatológicas.....	58
5.1.4.	Esquema de muestras.....	58
5.2.	Obtención de la malta	59
5.2.1.	Malteado a escala industrial.....	59
5.2.2.	Micro-malteado a escala planta piloto.....	61
5.2.3.	Micro-malteado por medio de bolsas de malla.....	62
5.3.	Elaboración de cerveza.....	64
5.3.1.	Obtención del mosto cervecero	66
5.3.2.	Obtención de la cerveza final	68
5.4.	Métodos analíticos	69
5.4.1.	Parámetros de calidad en cebada	69
5.4.2.	Determinación β -glucanos en cebada	69
5.4.3.	Determinación ácidos grasos en cebada	70
5.4.4.	Parámetros de calidad en malta.....	70
5.4.5.	Determinación de β -glucanos en malta.....	73
5.4.6.	Perfil fenólico.....	74
5.4.7.	Parámetros de calidad en mosto cervecero.....	75
5.4.8.	Parámetros de calidad en cerveza.....	77
5.4.9.	Perfil de aminoácidos	80
5.4.10.	Perfil de compuestos aromáticos volátiles.....	80
5.5.	Análisis estadístico	80
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
6.1.	Desarrollo y evaluación de un método alternativo de micro-malteado	85
6.1.1.	Comparativa entre el malteado a escala industrial, el micro-malteado en planta piloto y el micro-malteado en bolsas de malla	85
6.1.2.	Evaluación del método alternativo de micro-malteado por medio de bolsas de malla.....	90
6.2.	Evaluación de la efectividad y reproducibilidad de un método de elaboración de cerveza a pequeña escala.....	92
6.3.	Implicación de la fertilización con nitrógeno	98
6.3.1.	Efecto de la fertilización con nitrógeno sobre el perfil fenólico de cebada y malta ...	98
6.3.2.	Efecto de la fertilización con nitrógeno sobre el contenido de aminoácidos y compuestos aromáticos volátiles del mosto cervecero y cerveza.....	118
6.4.	Determinación de los efectos genotípicos y ambientales desde la cebada hasta la cerveza	135
6.4.1.	Cebada.....	135
6.4.2.	Malta.....	139
6.4.3.	Mosto.....	144
6.4.4.	Cerveza	148
6.4.5.	De cebada a cerveza	154
7.	DISCUSIÓN GENERAL.....	163
8.	CONCLUSIONES	171
9.	BIBLIOGRAFÍA	177
10.	ANEJO	197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Principales aromas producidos por productos procedentes del metabolismo de la levadura durante la fermentación (fuente adaptada de James y Stahl, 2014).....	27
Tabla 2.2. Clasificación de los ácidos grasos presentes en la cebada según su naturaleza.....	30
Tabla 2.3. Concentraciones (mg/L) de los principales compuestos inorgánicos presentes en la cerveza (fuente adaptada de Buiatti (2009) y Hough et al. (1971)).....	32
Tabla 2.4. Clasificación de las principales familias fenólicas presentes en la cebada. Distinción entre los diferentes compuestos que las forman según el radical (fuente adaptada y ampliada de Rao et al. (2018)).	34
Tabla 2.5. Aminoácidos clasificados según las características aportadas por el grupo radical que contienen (fuente adaptada de Fontana y Buiatti, 2009).....	37
Tabla 2.6. Clasificación de los aminoácidos según su absorción y uso por la levadura, así como su rango típico de concentración en cerveza (fuente adaptada de Fontana y Buiatti, 2009)...	38
Tabla 2.7. Relación entre los principales alcoholes superiores y su aminoácido de origen, así como el rango de concentración (mg/L) y aroma/sabor que aportan a la cerveza (fuente adaptada de Buiatti (2009), James y Stahl (2014) y Pires et al. (2014)).	43
Tabla 2.8. Ésteres con mayor impacto sobre el aroma y sabor de la cerveza, así como su rango de concentraciones en cerveza (fuente adaptada de Loviso y Libkind (2018), Olaniran et al. (2017) y Pires et al. (2014)).	45
Tabla 2.9. Otros compuestos con implicación en el aroma y sabor de la cerveza, rango de concentración y aroma/sabor que aportan (fuente adaptada de Ferreira y Guido (2018) y Olaniran et al. (2017)).	46
Tabla 5.1. Tamaños de las parcelas y fechas de siembra de cada año de cultivo y zona de cultivo estudiada.	57
Tabla 5.2. Condiciones del malteado industrial realizado en 2018 en las instalaciones de la Maltería La Moravia.	61
Tabla 5.3. Condiciones de micro-malteado en los equipos de la planta piloto realizado en 2018.....	61
Tabla 5.4. Condiciones de micro-malteado mediante bolsas de malla para las muestras de cebada de los dos años de cultivo estudiados. Las muestras de 2018 se maltearon en 2019 y las muestras de 2019 se maltearon en 2020.	64
Tabla 5.5. Equipo PicoBrew, 1 o 2, empleado para cada elaboración de cerveza según muestra (localidad × variedad × malteado) del año 2018.....	65
Tabla 5.6. Equipo PicoBrew, 1 o 2, empleado para cada elaboración de cerveza según muestra (localidad × variedad × malteado) del año 2019.....	66

Tabla 5.7. Tiempo y temperatura de cada etapa de las elaboraciones de mosto cervecero en ambos equipos PicoBrew Z.	68
Tabla 6.1. Medias y error estándar de la diferencia (SED) de los parámetros de calidad analizados en las muestras de malta resultantes de las tres réplicas de las bolsas de malla enterradas en cada caja de germinación.	86
Tabla 6.2. Valores p del ANOVA de los parámetros de calidad de las muestras malteadas en bolsas de malla enterradas en distintas posiciones en la caja de germinación y de distinto genotipo al lote industrial.	86
Tabla 6.3. Medias y error estándar de la diferencia (SED) de los parámetros de calidad analizados en las muestras de malta, de las tres variedades de cebada, dependiendo del tipo de malteado empleado.	87
Tabla 6.4. Valores p del análisis de contraste entre los tres tipos de malteado para los parámetros de calidad de las maltas obtenidas.	88
Tabla 6.5. Repetitividad (H^2) y estimaciones de los componentes de varianza aleatorios de las muestras de malta de seis genotipos de cebada cultivados en cinco ambientes distintos.....	91
Tabla 6.6. Significancia del genotipo y análisis de los componentes de varianza para los parámetros de calidad de la malta usando la prueba de probabilidad de relación con un grado de libertad (χ^2) para la interacción entre el genotipo y el tipo de malteado (industrial vs. Bolsas de malla).....	91
Tabla 6.7. Resultados de los parámetros de calidad de los mostos elaborados a partir de las muestras del año 2018. Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	93
Tabla 6.8. Resultados de los parámetros de calidad de los mostos elaborados a partir de las muestras del año 2019. Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	94
Tabla 6.9. Valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de los mostos elaborados en dos equipos PicoBrew a partir de muestras de cebada malteada procedente de dos años de cultivo consecutivos.....	95
Tabla 6.10. Valores p del ANOVA de los ejes de los componentes principales uno y dos (PCA1 y PCA2) del PCA para los mostos elaborados.	97
Tabla 6.11. Concentración media de proteína total (% m/m) y error estándar de la diferencia (SED), así como valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de las seis variedades de cebada cultivadas bajo dos condiciones nitrogenadas distintas durante dos años.	99
Tabla 6.12. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el primer año (2018) sin fertilización con nitrógeno (N_0). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).....	100

Tabla 6.13. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el primer año (2018) bajo fertilización con nitrógeno (N ₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).....	101
Tabla 6.14. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el segundo año (2019) sin fertilización con nitrógeno (N ₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).....	102
Tabla 6.15. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el segundo año (2019) bajo fertilización con nitrógeno (N ₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).....	103
Tabla 6.16. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el primer año (2018) sin fertilización con nitrógeno (N ₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).....	106
Tabla 6.17. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el primer año (2018) bajo fertilización con nitrógeno (N ₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).....	107
Tabla 6.18. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el segundo año (2019) sin fertilización con nitrógeno (N ₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).....	108
Tabla 6.19. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el segundo año (2019) bajo fertilización con nitrógeno (N ₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).....	109
Tabla 6.20. Valores <i>p</i> del ANOVA para el modelo fijo del análisis de las seis variedades de cebada, cultivadas bajo dos condiciones nitrogenadas distintas durante dos años, así como para sus maltas correspondientes.	110
Tabla 6.21. Porcentaje (%) del cambio relativo tras el malteado sobre el contenido de compuestos fenólicos entre las muestras de cebada y malta.	113
Tabla 6.22. Valores <i>p</i> del ANOVA del cambio relativo en los compuestos fenólicos entre las muestras de cebada y sus correspondientes maltas una vez realizado el malteado.	114
Tabla 6.23. Valores <i>p</i> del ANOVA de los ejes de los componentes principales uno y dos (PCA1 y PCA2) del PCA para las muestras de cebada, cultivadas durante dos años bajo dos condiciones nitrogenadas distintas, y sus correspondientes maltas.	116

Tabla 6.24. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados y del perfil de aminoácidos de los mostos cerveceros elaborados a partir del primer malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas bajo dos condiciones de fertilización nitrogenada durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	119
Tabla 6.25. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados y del perfil de aminoácidos de los mostos cerveceros elaborados a partir del segundo malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas durante dos años bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	120
Tabla 6.26. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados, compuestos aromáticos y perfil de aminoácidos de las cervezas elaborados a partir del primer malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas durante dos años bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	123
Tabla 6.27. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados, compuestos aromáticos y perfil de aminoácidos de las cervezas elaborados a partir del segundo malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas durante dos años bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	124
Tabla 6.28. Valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de los mostos obtenidos de las cuatro variedades de cebada malteada cultivadas bajo dos condiciones de fertilización nitrogenada durante dos años consecutivos.	129
Tabla 6.29. Valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos elaborados.	131
Tabla 6.30. Valores p del ANOVA de los ejes uno y dos de los componentes principales (PCA1 y PCA2) del PCA para las muestras de mosto cervecero (A) y cerveza (B) procedentes de cebada malteada cultivada durante dos años y bajo dos condiciones nitrogenadas distintas.....	134
Tabla 6.31. Concentraciones de los parámetros de calidad y ácidos grasos analizados en las muestras de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).....	136
Tabla 6.32. Concentraciones de los parámetros de calidad y ácidos grasos analizados en las muestras de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).	136
Tabla 6.33. Valores p resultantes del ANOVA del modelo fijo para los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.....	137
Tabla 6.34. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos, ácidos grasos y familias fenólicas analizados en los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.....	139

Tabla 6.35. Concentraciones de los parámetros de calidad y familias fenólicas analizados en las correspondientes maltas de las muestras de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).....	140
Tabla 6.36. Concentraciones de los parámetros de calidad y familias fenólicas analizados en las correspondientes maltas de las muestras de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).....	140
Tabla 6.37. Valores <i>p</i> resultantes del ANOVA del modelo fijo para las maltas correspondientes de los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.	142
Tabla 6.38. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos y familias fenólicas analizados en las muestras de malta correspondientes a los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.....	143
Tabla 6.39. Concentraciones de los parámetros de calidad y aminoácidos analizados en los mostos elaborados a partir de las maltas de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).	144
Tabla 6.40. Concentraciones de los parámetros de calidad y aminoácidos analizados en los mostos elaborados a partir de las maltas de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).	145
Tabla 6.41. Valores <i>p</i> resultantes del ANOVA del modelo fijo para los mostos cerveceros elaborados a partir de cuatro genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.	146
Tabla 6.42. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos y aminoácidos analizados en los mostos cerveceros elaborados a partir de los seis genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.	147
Tabla 6.43. Concentraciones de los parámetros de calidad, compuestos aromáticos y aminoácidos analizados en las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos cerveceros elaborados a partir de las maltas de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).	149
Tabla 6.44. Concentraciones de los parámetros de calidad, compuestos aromáticos y aminoácidos analizados en las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos elaborados a partir de las maltas de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).....	150
Tabla 6.45. Valores <i>p</i> resultantes del ANOVA del modelo fijo para las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos cerveceros elaborados a partir de cuatro genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.....	152

Tabla 6.46. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos, compuestos aromáticos y aminoácidos analizados en las cervezas correspondientes a los mostos elaborados a partir de los seis genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos..... 153

Tabla 6.47. Valores p del ANOVA de los ejes uno y dos de los componentes principales (PCA1 y PCA2) del PCA para cada comparación entre fracciones. (A) Cebada vs. Malta, (B) Malta vs. Mosto y (C) Mosto vs. Cerveza..... 159

Tabla 7.1. Heredabilidad (H^2) de los parámetros comunes en dos o más fracciones, heredabilidad (H^2) media y error estándar de la media (SED) para cada fracción estudiada...166

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Desarrollo fenológico del cultivo de cereal de grano pequeño. Sw: siembra; E: emergencia de las plántulas; FI: iniciación floral; DR: inicio ahijamiento; TM: formación hijuelos; MP: máximo número de hijuelos; Hd: encabezamiento; BGF: inicio del llenado de granos; PM: madurez fisiológica; Hv: cosecha. (Fuente adaptada de Slafer and Rawson, 1994).
..... 4
- Figura 1.2.** Aspecto externo del grano de cebada (Fuente adaptada de Taketa et al. (2008)). A: parte dorsal y extremo distal; B: parte ventral y extremo proximal..... 5
- Figura 1.3.** Morfología del interior del grano de cebada (fuente adaptada de Molina-Cano (1989))..... 5
- Figura 1.4.** Ciclo de activación y modificación interna del grano. 1: absorción de agua y activación del embrión; 2: segregación de giberelinas por parte del embrión; 3: estimulación de la aleurona por parte de las giberelinas que inicia la cascada enzimática, dónde participan endoproteasas, β -glucanasas, fitasas y amilasas; 4: degradación del almidón a maltosa por actividad de las amilasas; 5: conversión de maltosa en glucosa por acción enzimática; 6: transporte de glucosa al embrión como fuente de energía para su crecimiento (fuente adaptada de Ivor, 2019). 8
- Figura 1.5.** Cambios morfológicos durante el proceso de malteado desde el grano de cebada que entra a remojo hasta el grano de malta final. Las 0 h hacen referencia al fin de remojo e inicio de germinación. Las 24, 48 y 80 h hacen referencia al proceso de germinación; h: horas. El grano de malta es posterior al secado-tostado y desgerminación (fuente adaptada de Gorzolka et al. (2016))..... 9
- Figura 2.1.** Esquema general del proceso de las etapas de elaboración de la cerveza desde la cebada hasta el producto final, así como de los principales cambios y reacciones que tienen lugar en cada etapa (fuente adaptada de Hough et al. (1971), Schwarz y Li (2011) y Wannemacher et al. (2018)). 26
- Figura 2.2.** Adaptación de la rueda de aromas y sabores desarrollada por Meilgaard et al. (1979) (fuente adaptada de Orallo (2013))..... 29
- Figura 2.3.** Ruta biosintética de las familias mayoritarias de los compuestos fenólicos presentes en la cebada, a partir del aminoácido fenilalanina. PAL: fenilalanina-amonio liasa. 35
- Figura 2.4.** Estructura básica de los aminoácidos (fuente adaptada de Fontana y Buiatti (2009))..... 36
- Figura 2.5.** Proceso de síntesis endógena de aminoácidos por parte de la levadura. 1: acción de la enzima transaminasa, se obtiene un oxo-ácido (b) por transferencia del grupo amino (NH_2) del aminoácido (a) de origen; 2: acción de las transaminasas, síntesis de un nuevo aminoácido (c) por transferencia del grupo amino; R: grupo radical de cualquier aminoácido (fuente adaptada de Fontana y Buiatti (2009))..... 39

Figura 2.6. Esquema a modo resumen de la implicación de los aminoácidos en el desarrollo de compuestos aromáticos, desde el malteado hasta la cerveza embotellada. DS: degradación de Strecker; CA: condensación aldólica; TA: transposición de Amadori; Met: metionina; Cis: cistina; Val: valina; Leu: leucina; HMF: aldehído hidroximetilfurfural (fuente adaptada de Ferreira y Guido (2018)).	40
Figura 2.7. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de alcoholes superiores por parte de la levadura. BAP2,3, AGP, TAT y GAP: proteínas transportadoras de aminoácidos en la membrana plasmática; flecha azul: acción de enzimas aminotransferasas; flecha verde: acción de enzimas descarboxilasas; flecha roja: acción de enzimas deshidrogenasas (fuente de Loviso y Libkind (2019)).	42
Figura 2.8. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de ésteres por parte de la levadura (fuente de Loviso y Libkind (2018)).	44
Figura 5.1. Esquema de las muestras obtenidas en cada año de cultivo estudiado y puntos de análisis.	59
Figura 5.2. Instalaciones de la Maltería La Moravia (Bell-lloc d’Urgell, Lleida, Catalunya, España).	59
Figura 5.3. SCADA de las cajas de germinación de la Maltería La Moravia. En el esquema superior se ve representado el flujo de aire durante la germinación, inyectando aire humectado desde la parte inferior del inicio de la caja. En el esquema inferior representa el secado-tostado, dónde la inyección de aire caliente seco se da por la parte inferior del final de la caja (imágenes cortesía de Maltería La Moravia).	60
Figura 5.4. Equipo de micro-malteado a escala planta piloto y SCADA de control situada en las instalaciones de la Maltería La Moravia.	61
Figura 5.5. Micro-malteado en bolsas de malla en las instalaciones industriales de la Maltería La Moravia.	62
Figura 5.6. Disposición de las bolsas de malla en 2018 durante la germinación y secado-tostado. PW: Pewter; SK: Shakira; SH: Shuffle. Cada caja de germinación hace referencia a una réplica de malteado, donde cada variedad tuvo tres repeticiones.	63
Figura 5.7. Disposición de las bolsas de malla en 2019 durante la germinación y secado-tostado. En la primera y segunda imagen de la réplica malteado 1, se representa el movimiento de las bolsas de malla tras cada removido. Cada caja de germinación hace referencia a una réplica de malteado. Las localidades se disponían a lo ancho para cada variedad. BA: Basic; PW: Pewter; PL: Planet; SK: Shakira; SH: Shuffle; T: Traveler.	63
Figura 5.8. Disposición de las bolsas de malla en 2020 durante la germinación y secado-tostado. Cada caja de germinación hace referencia a una réplica de malteado. Las localidades se disponían a lo ancho para cada variedad. BA: Basic; PW: Pewter; PL: Planet; SK: Shakira; SH: Shuffle; T: Traveler.	64
Figura 5.9. Equipos PicoBrew Z y preparación de la muestra para la elaboración de cerveza a pequeña escala.	67

Figura 5.10. Gráfica de temperaturas del proceso de maceración y ebullición para la elaboración de las cervezas..... 68

Figura 6.1. Resultado del PCA para los parámetros de calidad de la malta obtenida en cada tipo de malteado para los tres genotipos estudiados. El color de los círculos identifica el genotipo. Ind: malteado industrial; PP: micro-malteado en planta piloto; B: micro-malteado en bolsas de malla; PT: proteína total; PS: proteína soluble; IK: índice Kolbach; FAN: aminonitrógeno libre; PD: poder diastásico; SC: sobrecolor. 89

Figura 6.2. Resultado del PCA para los parámetros de calidad significativos de los mostos elaborados. El color de los círculos identifica el equipo PicoBrew. BA: basic; PW: pewter; SK: shakira. 96

Figura 6.3. Concentraciones (mg/kg peso seco) de las principales familias fenólicas. (A) muestras de cebada cultivadas bajo dos condiciones de nitrógeno durante dos años consecutivos (2018 y 2019); (B) maltas correspondientes.104

Figura 6.4. Resultado del PCA de los compuestos fenólicos significativos de las muestras de cebada (A) y sus correspondientes maltas (B) según año de cultivo y aplicación nitrogenada. El color de los círculos identifica el ambiente (combinación año × nitrógeno); el tamaño de los círculos representa el total marginal. BA: basic; PW: pewter; PL: planet; SK: shakira; SH: shuffle; T: traveler. HBA: ácidos hidroxibenzoicos; HCA: ácidos hidroxicinámicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico y derivados; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequina y derivados; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados. 115

Figura 6.5. Contenido medio de los aminoácidos determinados en los mostos cerveceros para cada combinación nitrógeno × año × malteado..... 121

Figura 6.6. Contenido medio de los aminoácidos determinados en las cervezas para cada combinación nitrógeno × año × malteado. 126

Figura 6.7. Contenido medio de los compuestos aromáticos determinados en las cervezas para cada combinación nitrógeno × año × malteado..... 127

Figura 6.8. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros analíticos significativos de los mostos cerveceros (A), y sus correspondientes cervezas (B), elaborados a partir de cuatro genotipos de cebada distintos cultivados durante dos años bajo dos condiciones nitrogenadas distintas. El color de los círculos identifica el ambiente (combinación nitrógeno × año). BA: basic; PW: pewter; PL: planet; SK: shakira. FAN: amino nitrógeno libre. 133

Figura 6.9. Evolución de la heredabilidad (H^2) entre las comparaciones de las fracciones estudiadas y los parámetros en común. (A) Cebada vs. Malta, (B) Malta vs. Mosto y (C) Mosto vs. Cerveza. PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados; FAN: aminonitrógeno libre. 155

Figura 6.10. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros de calidad y compuestos fenólicos comunes entre las muestras de cebada (óvalo azul) y malta (óvalo rojo). El color de los círculos identifica el ambiente (localidad × año); el tamaño de los círculos indica el total marginal. PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados. 156

Figura 6.11. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros de calidad comunes entre las muestras de malta (óvalo rojo) y mosto (óvalo verde). El color de los círculos identifica el ambiente (localidad × año); el tamaño de los círculos indica el total marginal. FAN: aminonitrógeno libre. 157

Figura 6.12. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros de calidad y aminoácidos comunes entre las muestras de mosto (óvalo verde) y cerveza (óvalo naranja). El color de los círculos identifica el ambiente (localidad × año); el tamaño de los círculos indica el total marginal. FAN: aminonitrógeno libre; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Ala: alanina; Fen: fenilalanina; Gli: glicina; His: histidina; Tir: tirosina; Val: valina..... 158

Figura 7.1. Gráfico de las medias de mínimos cuadrados de las heredabilidades por fracciones estudiadas. Se han seleccionado aquellos parámetros comunes en dos o más fracciones. Cebada: n=11; Malta: n=14; Mosto: n=26; Cerveza: n=26. Las distintas letras indican diferencias significativas entre fracciones (Tukey-Kramer HSD, $\alpha=0.05$). 167

Figura 10.1. Precipitación mensual durante los meses de cosecha en las cuatro zonas de cultivo para ambos años estudiados..... 197

Figura 10.2. Temperatura media mensual durante los meses de cosecha en las cuatro zonas de cultivo para ambos años estudiados..... 197

Figura 10.3. Radiación media mensual durante los meses de cosecha en las cuatro zonas de cultivo para ambos años estudiados..... 198

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Año
Abs	Absorbancia
AEMET	Agencia Estatal de Meteorología
Ala	Alanina
Alc-est	Relación alcoholes-ésteres
ANOVA	Análisis de varianza
Api	Apigenina y derivados
Arg	Arginina
ASBC	American Society of Brewing Chemists
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
CA	Condensación aldólica
Ca	Calcio
CafA	Ácido cafeico y derivados
Cat	Catequina y derivados
CinA	Ácido cinámico
Cis	Cistina
Cl	Cloruros
CouA	Ácido cumárico y derivados
CPU	Central Processing Unit
DC	Forma descarboxilada
DMS	Sulfuro de dimetilo
DS	Degradación de Strecker
EBC	European Brewing Convention
ETSEA	Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria
Ext.	Extracto
FAN	Aminonitrógeno libre
Fen	Fenilalanina
FerA	Ácido ferúlico y derivados
Fos	Fosfatos
Friab	Friabilidad
G	Genotipo
GC	Galactocatequina
GL	Grados de libertad
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
H²	Heredabilidad en sentido amplio
HBA	Ácidos hidroxibenzoicos
HCA	Ácidos hidroxicinámicos
Hip	Hidroxiprolina
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida
IBU	International Bittering Units
IK	Índice Kolbach
Ile	Isoleucina
Isoam	Isoamílicos

Isobut	Isobutanol
L	Localidad
Leu	Leucina
Lis	Lisina
LOQ	Límite cuantificable
Lut	Luteolina y derivados
Met	Metionina
Mg	Magnesio
N	Nitrógeno
n.d.	no determinado
Nit	Nitratos
Olig	Oligómeros
Oxa	Oxalatos
PAL	Fenilalanina amino liasa
PB	PicoBrew
PCA	Análisis de componentes principales
PD	Poder diastásico
Pentan	Pentanodiona
PP	Planta piloto
Pro	Prolina
PS	Proteína soluble
PT	Proteína total
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RDF	Atenuación real
SARGA	Sociedad Aragonesa de Gestión Agroambiental
SC	Sobrecolor
SCADA	Supervisory Control And Data Acquisition (Control Supervisor y Adquisición de Datos)
s.m.	sin muestra
SED	Error estándar de la diferencia
Ser	Serina
Sulf	Sulfatos
TA	Transposición de Amadori
Tir	Tirosina
Tre	Treonina
Trp	Triptófano
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento en tándem de masas
Val	Valina
VDK	Cetonas vecinales
Visc	Viscosidad
χ²	Distribución chi-cuadrado

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CEBADA

1.1.1. CULTIVO DE CEBADA

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) forma parte de la familia de las gramíneas y es una de las especies de cultivo más antigua del mundo. Es uno de los cereales más cultivados en el mundo y, aunque antiguamente su uso era para el consumo humano, actualmente solo una pequeña parte se destina a éste. Mayoritariamente se emplea para la alimentación animal y la elaboración de bebidas alcohólicas, como la cerveza, así como una pequeña parte es destinada a la alimentación humana. En 2020 España fue el tercer productor de cebada a nivel mundial, ya que su producción fue de 10.9 millones de toneladas y destinó un total de 2.8 millones de hectáreas a su cultivo (Orús, 2022a; Orús, 2022b).

En el caso de ser destinada como materia prima para cervecería, la cebada es la principal fuente de proteínas, lípidos, carbohidratos, compuestos antioxidantes y micronutrientes. El equilibrio que presenta entre el contenido de almidón y de proteínas, garantiza la fermentabilidad de los mostos cerveceros, por lo que la convierte en el cereal perfecto para la elaboración de esta bebida alcohólica.

Existen cebadas de dos o seis carreras y su cultivo, dependiendo de la fecha de siembra, puede ser de primavera o invierno (Calderini y Dreccer, 2003). Normalmente, las cebadas de primavera siempre son de dos carreras, en cambio, las cebadas de invierno pueden ser de ambas tipologías, dos o seis carreras (Calderini y Dreccer, 2003; Kunze, 2006). La cebada de primavera suele ser de gran interés puesto que permiten una mayor rotación de los campos, puesto que se caracterizan por su ciclo corto.

1.1.2. DESARROLLO DE LA PLANTA

El desarrollo de la planta de cebada es un proceso continuo en el tiempo que puede dividirse en tres grandes fases: fase vegetativa, fase reproductiva y llenado de los granos. La duración de cada una dependerá, en gran medida, de los factores ambientales de cada año de cultivo (Molina-Cano, 1989). En la **Figura 1.1** se representa el crecimiento de la planta de cereal de grano pequeño, sus distintas fases y los principales factores que pueden influir.

Primeramente, en la fase vegetativa se produce el crecimiento de las raíces y las hojas, que tienen la finalidad de anclarse al suelo para extraer el agua y los nutrientes necesarios para sobrevivir durante las primeras semanas de desarrollo. También se produce un nudo de ahijamiento, desde donde se originará el tallo principal de la planta. A través de él se transportan el agua y los nutrientes desde las raíces hasta la parte superior de la planta. En el momento que aparece la primera hoja en el extremo superior, la cual recibe el nombre de banderola, se inicia la fase reproductiva: la vaina se hincha, emergen las espigas y se da la antesis. Cuando la floración ha llegado a su fin, los granos de la espiga incrementan su tamaño y se rellenan progresivamente con las reservas almacenadas en los tallos y vainas foliares, así como los carbohidratos fotosintetizados por las partes verdes aun activas de la planta. Cuando

los granos se llenan completamente, reciben el nombre de *granos lechosos*, ya que su textura es acuosa. En ese momento es cuando aumenta su grosor y densidad, pasando a ser un *grano pastoso* que, llegando a su madurez fisiológica, pasará de tener una coloración verde a amarillo-rojizo. Frente a esta maduración, la espiga va curvándose hacia abajo por el propio peso de los granos y éstos perderán humedad hasta un 10-12%, siendo las condiciones ideales para su cosecha (Molina-Cano, 1989; Zadock et al., 1974).

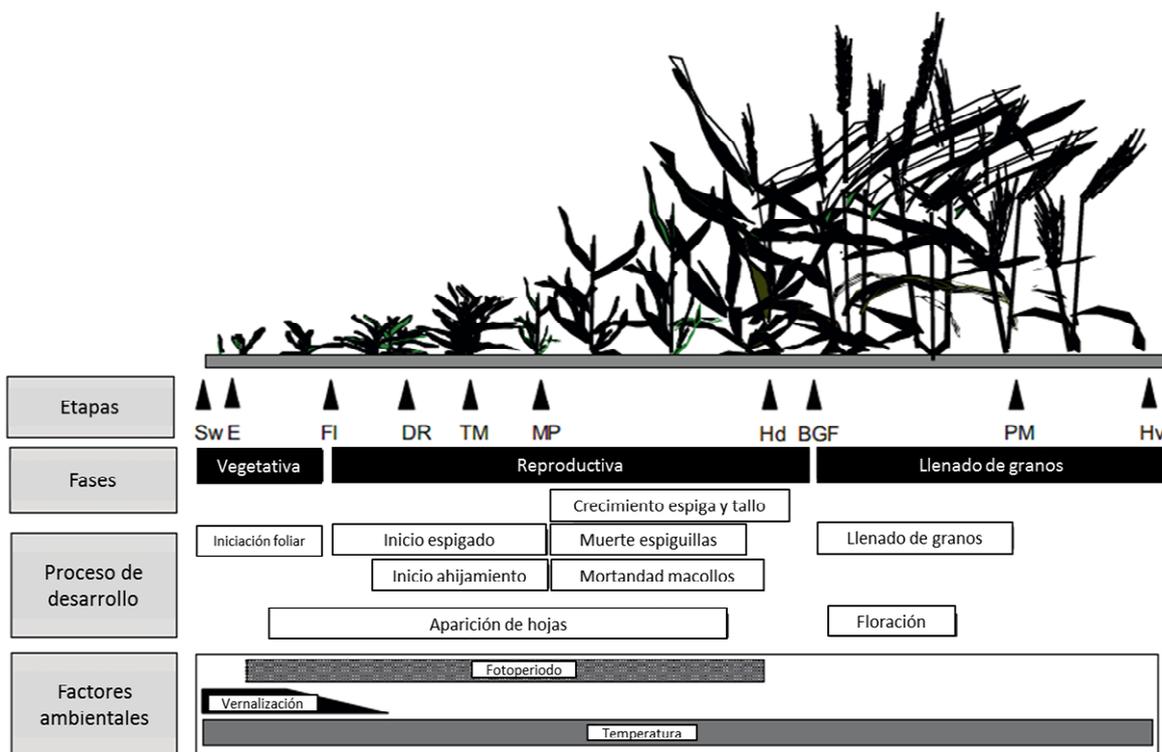


Figura 1.1. Desarrollo fenológico del cultivo de cereal de grano pequeño. Sw: siembra; E: emergencia de las plántulas; FI: iniciación floral; DR: inicio ahijamiento; TM: formación hijuelos; MP: máximo número de hijuelos; Hd: encabezamiento; BGF: inicio del llenado de granos; PM: madurez fisiológica; Hv: cosecha. (Fuente adaptada de Slafer and Rawson, 1994).

1.1.3. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL GRANO

El grano de cebada presenta un revestimiento de glumas que lo protegen, por lo que se la considera un cereal de tipo glumáceo. Exteriormente se caracteriza por tener una forma alargada con dos lados bien diferenciados: ventral y dorsal. Asimismo, se pueden distinguir dos extremos: proximal y distal (**Figura 1.2**).

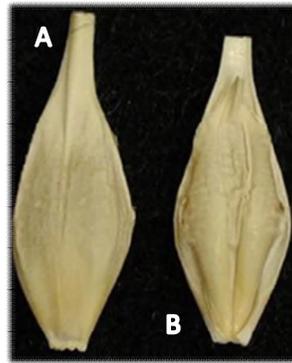


Figura 1.2. Aspecto externo del grano de cebada (Fuente adaptada de Taketa et al. (2008)). A: parte dorsal y extremo distal; B: parte ventral y extremo proximal.

Internamente, el grano se puede dividir en dos partes principales, el embrión y el endospermo. Ambos están recubiertos por distintas envolturas mostradas en la **Figura 1.3** y explicadas a continuación:

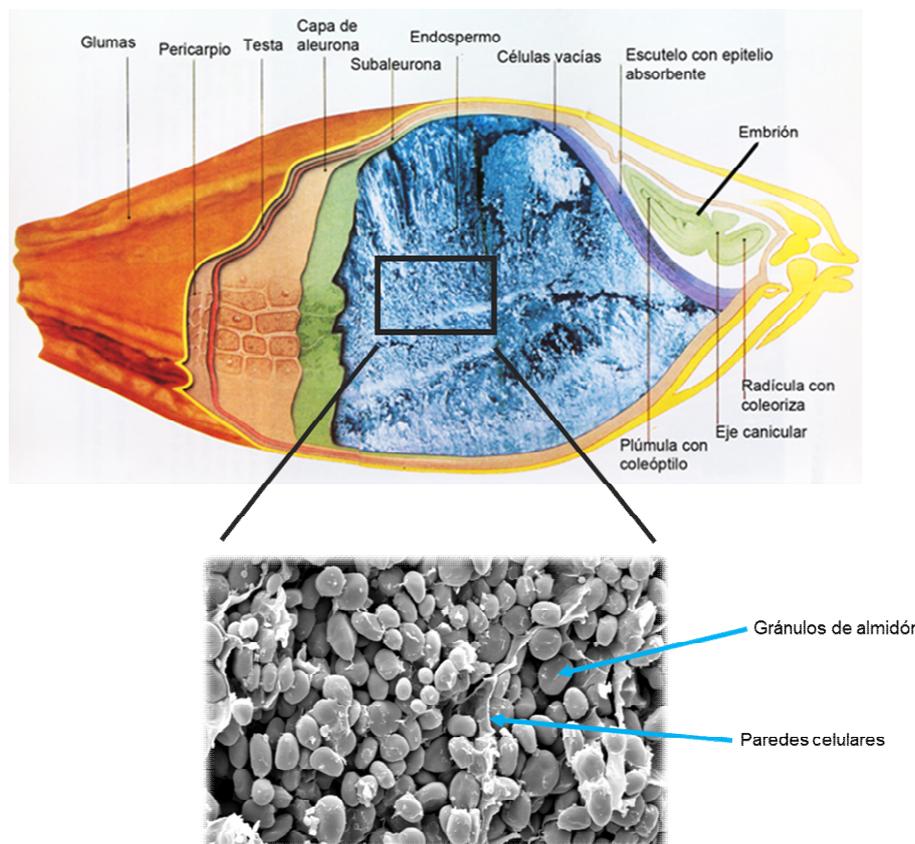


Figura 1.3. Morfología del interior del grano de cebada (fuente adaptada de Molina-Cano (1989)).

- Las envolturas, o glumas, están compuestas principalmente por celulosa a la cual se unen taninos, compuestos amargos y ácido testérico. Todas estas moléculas pueden aportar efectos desagradables a la calidad de la cerveza (Kunze, 2006). Aunque la principal función de estas envolturas es, sobre todo, proteger al grano frente agentes externos:

- La cáscara es la capa protectora más externa del grano. Tiene un alto contenido en sílice, lo que le proporciona un carácter abrasivo.
- El pericarpio y epicarpio son membranas semipermeables que impiden el paso hacia el interior de los posibles compuestos que se encuentran solubles en agua.
- La testa es una capa casi impermeable rica en flavonoides, los cuales impiden la difusión de los compuestos obtenidos durante el malteado del interior hacia el exterior del grano.
- El embrión es el encargado de iniciar el crecimiento de la semilla. Contiene azúcares, proteínas y lípidos.
- El endospermo es la reserva de nutrientes que dispone el grano para poder germinar. Lo forman el albumen y la aleurona:
 - El albumen está compuesto por paredes celulares de β -glucanos y proteínas que contienen gránulos de almidón. Supone un 75% del peso total del grano y es la fuente de nutrientes que utilizará el embrión para su crecimiento (Evers and Millar, 2002).
 - La aleurona es una capa rica en proteínas y antocianos, de ahí su color rojizo. Representa cerca del 10% de la materia seca y es la fuente principal de enzimas hidrolíticas que, durante el malteado, potenciarán la actividad de las demás enzimas involucradas en el proceso (Kunze, 2006).

1.2. LA MALTA

El proceso de malteado consiste en realizar controladamente la germinación del grano de cebada con el fin de producir su desagregación. Esta desagregación conlleva la rotura de la matriz proteica, de los β -glucanos que forman las paredes celulares y de los gránulos de almidón que contiene el endospermo. Mediante esta desagregación se producen moléculas de menor tamaño: las proteínas se degradan a péptidos, los β -glucanos de cadena larga se convierten en β -glucanos de cadena corta y los gránulos de almidón se transforman en azúcares de cadena corta (glucosa, maltosa y maltotriosa). Para llevar a cabo esta desagregación son necesarias enzimas, las cuales se irán generando durante todo el malteado desde la aleurona. Las materias nitrogenadas e hidrocarbonadas obtenidas de la actividad enzimática son elementos imprescindibles para el crecimiento del grano (Molina-Cano, 1989). No obstante, estas enzimas no son solo necesarias para su desagregación, sino que posteriormente, en cervecería, serán indispensables para la elaboración de cerveza.

Existen diferentes tipos de malta, las cuales se obtienen ajustando las condiciones del proceso de malteado. Esta Tesis se basa específicamente en malta Pilsner para cervezas Lager. A continuación, se describen las principales etapas del proceso.

1.2.1. REMOJO

La cebada almacenada, a baja humedad, se encuentra parcialmente inactiva, por lo que el primer objetivo del proceso será activar el grano por medio de la ganancia de humedad. El remojo consiste en alternar períodos con agua y períodos en seco para que el grano se

humedezca. La duración de los periodos depende del tipo de cebada, del grado de activación que se desee conseguir al final de la etapa y de las instalaciones de la maltería. Hay que tener en cuenta que la captación de agua por parte del grano puede verse acelerada o ralentizada por la composición y variedad de la cebada, así como por la temperatura del agua y la del ambiente (Kunze, 2006).

Teniendo en cuenta que la cebada almacenada parte de una humedad del 10-12%, al principio del proceso la captación de agua se da de forma rápida y llega a obtener hasta un 20-25% de humedad. A partir de entonces, la ganancia de agua se da con mayor lentitud hasta llegar al 40-44% (Kunze, 2006). Cuando el grano de cebada se activa e inicia su metabolismo, se produce un aumento de la respiración, es decir, aumenta el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, así como un aumento de la temperatura del entorno. Externamente, el grano se hincha debido a la ganancia de humedad y, si la activación del embrión ha sido suficiente, se podrá observar la aparición de una pequeña cresta blanca, siendo el primer despuntamiento de la raíz desde el embrión, en la parte proximal del grano.

1.2.2. GERMINACIÓN

Una vez activado el grano y obtenida la humedad deseada, pasamos a la siguiente etapa. La germinación del grano se traduce como un periodo de vida activa, en el cual se produce una activación y síntesis enzimática que propicia la desagregación del grano necesaria para su propio crecimiento, así como la posterior elaboración de cerveza. Cabe destacar que, aunque la presencia de oxígeno, humedad y temperatura son imprescindibles para que el grano pueda realizar todas las modificaciones internas, la capacidad enzimática de la cebada está determinada, en gran medida, por la variedad (Molina-Cano, 1989).

Cuando el embrión se ha activado segrega fitohormonas de crecimiento, llamadas giberelinas, hacia la capa aleurona. Cuando la aleurona recibe esta señal, inicia una cascada enzimática hacia el endospermo para digerir las moléculas de gran tamaño que lo componen en moléculas más pequeñas aptas para el embrión y poder así realizar su crecimiento (Kunze, 2006; Gutiérrez Osnaya, 2019). Teniendo en cuenta que el endospermo es una matriz compleja donde las proteínas y los β -glucanos forman una estructura que envuelven los gránulos de almidón, la primera modificación que se efectuará será la rotura de estas paredes celulares por medio de proteasas y β -glucanasas. Gracias a la rotura de las proteínas, se pueden generar nuevas enzimas y así proseguir con la desagregación (Gutiérrez Osnaya, 2019). Una vez los gránulos de almidón son liberados, quedan como sustrato accesible para las amilasas, enzimas responsables de la degradación del almidón a azúcares sencillos (Kunze, 2016). En la **Figura 1.4** queda representado el ciclo continuo de modificación interna que se da en el grano durante la germinación.

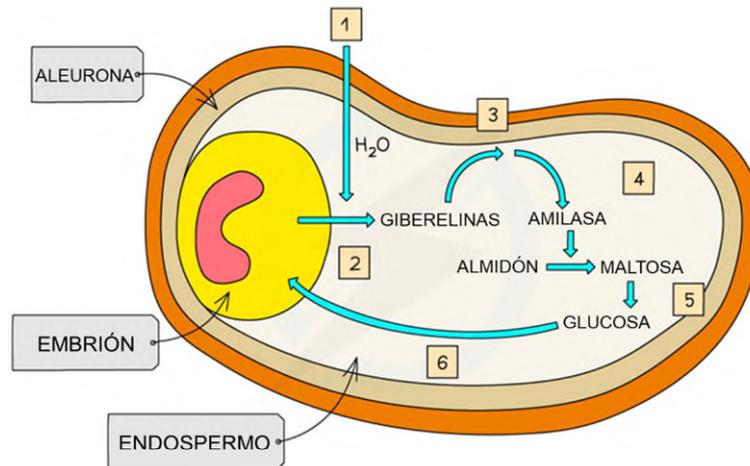


Figura 1.4. Ciclo de activación y modificación interna del grano. 1: absorción de agua y activación del embrión; 2: segregación de giberelinas por parte del embrión; 3: estimulación de la aleurona por parte de las giberelinas que inicia la cascada enzimática, donde participan endoproteasas, β -glucanasas, fitasas y amilasas; 4: degradación del almidón a maltosa por actividad de las amilasas; 5: conversión de maltosa en glucosa por acción enzimática; 6: transporte de glucosa al embrión como fuente de energía para su crecimiento (fuente adaptada de Ivor, 2019).

En pocas palabras, la energía necesaria para la formación de enzimas proviene del consumo de azúcares, resultantes de la degradación del almidón, y de materias grasas que contiene el grano. Por ello, la germinación no tan solo tiene como objetivo obtener enzimas, aminoácidos y azúcares para la elaboración de la cerveza, sino que también es necesaria para retroalimentar su propio crecimiento (Kunze, 2006).

Todas las modificaciones que se dan a nivel interno comentadas con anterioridad se ven reflejadas en su aspecto exterior, tal y como se muestra en la **Figura 1.5**. El crecimiento del embrión tiene como consecuencia el crecimiento de la raicilla y de la acrospira, que van siendo mayores conforme avanzan los días. Asimismo, la textura del endospermo va fluctuando y cambiando su aspecto, siendo gomoso al principio y harinoso al final del proceso.

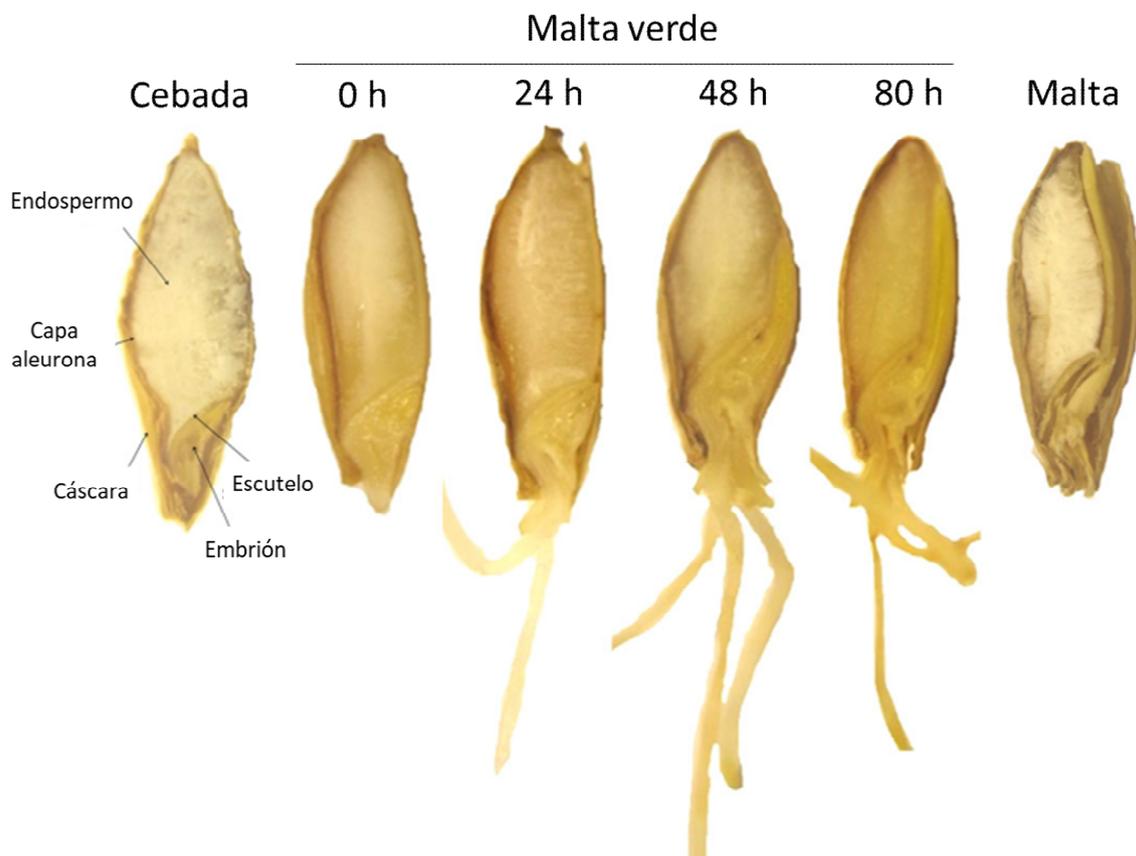


Figura 1.5. Cambios morfológicos durante el proceso de malteado desde el grano de cebada que entra a remojo hasta el grano de malta final. Las 0 h hacen referencia al fin de remojo e inicio de germinación. Las 24, 48 y 80 h hacen referencia al proceso de germinación; h: horas. El grano de malta es posterior al secado-tostado y desgerminación (fuente adaptada de Gorzolka et al. (2016)).

1.2.3. SECADO-TOSTADO

El secado tiene como finalidad detener la germinación aplicando aire caliente para deshidratarlo y reducir su humedad hasta un 5%, permitiendo así que el almacenaje de la malta final se pueda realizar de manera segura durante largos periodos de tiempo hasta ser utilizada para la elaboración de cerveza. Por otro lado, el tostado se consigue elevando la temperatura del aire y aportar así color, aroma y sabor a la malta. Cabe destacar que estas propiedades se transferirán a posterior a la cerveza resultante (Kunze, 2006).

Para realizar el secado, inicialmente se aplica aire caliente inferior a 65° C con el objetivo de eliminar rápidamente la humedad del interior del grano sin que su temperatura aumente en exceso, de esta manera se preserva la actividad enzimática puesto que el grano sigue levemente activo y germinando. La humedad del grano se disminuye hasta un 12% y la difusión de agua del interior al exterior se ve ralentizada, por lo que se aumenta la temperatura del aire entre 65-75° C. Como la humedad interior del grano es baja, las enzimas podrán resistir a las altas temperatura que alcanzará el grano. Finalmente, con tal de reducir la humedad entre un 4-4.5%, la temperatura se aumenta hasta 80-85° C. Este hecho también

propicia la formación de compuestos aromáticos claves para las propiedades organolépticas de la cerveza (Kunze, 2006).

1.3. LA CERVEZA

La cerveza es una bebida alcohólica carbonatada que se obtiene tras la fermentación del mosto cervecero con levadura del género *Saccharomyces*. El mosto cervecero se obtiene al macerar con agua la malta de cebada y, seguidamente, cociéndolo junto lúpulos y/o derivados. Por ello, las materias primas para la elaboración de cerveza son la malta, el lúpulo, el agua y la levadura.

Como en el caso de la malta, las condiciones del proceso de elaboración de cerveza se adecuan según el tipo de cerveza a elaborar y calidad deseada. Esta Tesis se ha centrado en la cerveza Lager.

El proceso de elaboración de la cerveza puede dividirse en cuatro etapas principales que se explican a continuación.

1.3.1. MACERACIÓN

La maceración tiene como objetivo disolver, por acción enzimática, los sustratos de la malta y solubilizarlos en agua. Para ello, la malta se tritura, se le añade agua y se van aplicando diferentes temperaturas con tal de potenciar la actividad enzimática. Las primeras enzimas en actuar son las endo- β -glucanasas y las fitasas, reduciéndose la viscosidad potencial del mosto resultante. Posteriormente, y frente un aumento de temperatura del agua, se activan las proteasas que solubilizarán la materia nitrogenada de la malta, hecho imprescindible para asegurar la fermentabilidad del mosto puesto que es uno de los principales nutrientes de la levadura. Una vez finalizada la proteólisis, se aumenta la temperatura con tal de potenciar la degradación del almidón, por medio de las amilasas, y obtener azúcares fermentables (Kunze, 2006).

1.3.2. EBULLICIÓN

Una vez finalizada la maceración, se filtra el mosto en su propio bagazo y se lleva a ebullición junto los lúpulos y/o adjuntos seleccionados. Los objetivos de esta etapa del proceso son varios (Kunze, 2006):

- Estabilizar biológica, bioquímica y coloidalmente el mosto.
- Desarrollar sabor y color por medio de reacciones de Amadori y Strecker.
- Disolver las resinas y aceites esenciales procedentes del lúpulo para aportar sabor y amargor.
- Ajustar el extracto por concentración.
- Volatilizar compuestos indeseables que pueden estar presentes en el mosto.
- Esterilizar el mosto.
- Desactivar enzimas presentes en el mosto para garantizar su estabilidad.

1.3.3. FERMENTACIÓN

Una vez enfriado el mosto post-ebullición, se inocula con levadura para transformar los azúcares presentes en el mosto, principalmente maltosa, en etanol, carbónico y otros compuestos del metabolismo de las levaduras como alcoholes superiores y ésteres. Muchos de estos compuestos son volátiles y, por tanto, tienen una implicación directa en el aroma final de la cerveza. Para poder realizar todas las transformaciones que se dan durante la fermentación, la levadura requiere nutrientes, especialmente compuestos nitrogenados (nitrógeno libre y aminoácidos) procedentes de la proteólisis que se da durante el malteado y la maceración. Es importante que la fermentación se lleve a cabo bajo una temperatura controlada y adecuada para la levadura seleccionada. Además, esta etapa se debe controlar exhaustivamente, sobre todo el consumo de azúcares fermentables midiendo la densidad, ya que podremos finalizar el proceso cuando se adquiera la deseada. Es al final de la fermentación cuando se obtiene lo denominado como *cerveza verde* (Kunze, 2006).

1.3.4. MADURACIÓN Y CLARIFICACIÓN

Con tal de transformar la cerveza verde en cerveza acabada, las temperaturas de almacenaje se reducen hasta 0 y 10° C para afinar los aromas y sabores, clarificar la cerveza precipitando los posibles turbios y saturarla de anhídrido carbónico hasta el nivel deseado (Kunze, 2006).

ANTECEDENTES



2. ANTECEDENTES

Conocer los factores que influyen en el proceso de malteado tiene gran interés, ya que determina la calidad de la malta de cebada que se utilizará en la elaboración de la cerveza. Pero la calidad de la malta no sólo viene determinada por las condiciones del malteado: la variedad de cebada, las condiciones climatológicas y la gestión del cultivo tienen un impacto directo en la malta resultante y, por tanto, en la cerveza. Por esta razón, conocer el impacto de estos factores en la calidad de la cebada, de la malta y de la cerveza no sólo puede proporcionar información sobre las propiedades organolépticas del producto final, sino que también puede ser una herramienta para diferenciar la producción y/o para anticiparse a los diferentes años de cultivo, así como para implementar programas de mejora.

2.1. A PEQUEÑA ESCALA

Los procesos industriales, tanto el malteado como la elaboración de cerveza, requieren de grandes cantidades de materia prima, siendo el principal inconveniente a la hora de realizar ensayos experimentales donde, normalmente, se dispone de pequeñas cantidades de cebada. Por ello son necesarios equipos y métodos que permitan simular los procesos industriales a pequeña escala de manera fiable, aplicable y representativa.

2.1.1. MICRO-MALTEADO

Realizar el proceso de malteado a escala industrial es un reto. Cada lote es único, dado que contiene, para una misma variedad, distintos orígenes y condiciones ambientales según donde se haya cultivo. Poder evaluar el potencial de los genotipos de cebada maltera con antelación resulta interesante con tal de evitar desperdiciar toneladas de producto. Es decir, conocer las necesidades particulares de cada variedad de cebada frente el proceso de malteado permite crear estrategias a nivel productivo con tal de adaptar el proceso y obtener malta de cebada de la mayor calidad. Con este fin, se han implementado métodos de micro-malteado que consisten en maltear cantidades muy pequeñas de cebada (desde unos pocos gramos hasta unos pocos kilos) a nivel de laboratorio o en planta piloto (Harrison y Rowlands, 1932; Schmitt y Budde, 2011).

Los equipos para llevar a cabo esta técnica empezaron a aparecer hace ya más de cien años y, aunque los resultados no siempre fueron totalmente aceptados, se implementaron como el método de referencia para evaluar nuevos genotipos de cebada (Banasik, 1973). Fue tal el impacto que tuvo el micro-malteado, que los equipos, hasta entonces manuales, se automatizaron y ajustaron sus capacidades con tal de albergar un mayor número de muestras (Atkinson y Bendelow, 1976; Bendelow, 1959; Henry y McLean, 1984; Swanston y Taylor, 1990).

Dado que se obtuvieron resultados que revelaban la baja repetitividad y fiabilidad al usar muestras de pequeño tamaño, se empezaron a adecuar los equipos para aumentar la cantidad de muestra. Cabe destacar la importancia de adaptar las condiciones de remojo y germinación al tamaño de la muestra para obtener resultados válidos, ya que, como observaron Henry y McLean (1984), las muestras de menor cantidad (entre 5 y 40 g) absorben agua más

rápidamente que las de mayor tamaño (> 100 g). Este hecho provocó que, utilizando las mismas condiciones de malteado y variedad para todas las muestras, se obtuvieran resultados diferentes entre tamaños para los parámetros de calidad analizados. Así como Moll et al. (1982), que estudiaron las diferencias entre dos tamaños de muestra (250 g y 2 kg), justificaron la necesidad de micro-maltear cantidades mayores con tal de obtener resultados más fiables y representativos. O Schmitt y Budde (2011), que también obtuvieron peores calidades en las muestras por debajo de 50 g.

La utilidad del micro-malteado a lo largo de este último siglo ha sido amplia. Gothard et al. (1980a; 1980b), evaluaron distintas técnicas de micro-malteado con tal de detectar diferencias varietales sobre la calidad final de la malta, así como también determinaron el impacto de las condiciones de malteado sobre el grado de modificación de éste. Swanston y Taylor (1990) estudiaron el efecto de diferentes condiciones de remojo sobre la ganancia de humedad y la ratio de germinación que alcanzaba el grano. Incluso se ha utilizado el micro-malteado con la finalidad de detectar diferencias ambientales entre muestras (Molina-Cano et al., 1995), así como para determinar la implicación de las condiciones de germinación sobre el perfil metabólico de las cebadas (Frank et al., 2011). Aunque una de las aplicaciones más interesantes en la industria es determinar la adaptabilidad de las variedades a los cambios de proceso, como Agu et al. (2012), que además observaron la variabilidad entre lotes malteados bajo las mismas condiciones en planta piloto y las consecuencias sobre la calidad de la malta final.

Sin embargo, aun siendo una técnica muy utilizada, muchos de los estudios realizados bajo el micro-malteado no se han evaluado ni comparado con la escala industrial, por lo que muchos de los resultados obtenidos son cuestionables si la finalidad es extrapolarlos a la industria. Se han detectado numerosos inconvenientes del micro-malteado realizado en equipos de planta piloto, como la imposibilidad de reproducir con exactitud las condiciones del proceso industrial (Harrison y Rowlands, 1932; Whitmore y Sparrow, 1957) ya que en los equipos de micro-malteado las condiciones de temperatura y humedad están totalmente controladas y el flujo de aire es mucho más homogéneo respecto a la escala industrial (Hough et al., 1971). También se ha resaltado como principal inconveniente la baja repetitividad entre muestras, asociada a la posición en la cual se encuentre dentro del equipo, así como entre réplicas de proceso (Haslemor et al., 1985). Otro factor en contra ha sido descrito por Gothard et al. (1980a), quienes resaltaron la alta susceptibilidad del micro-malteado a errores analíticos, dado que es una técnica que requiere una gran manipulación. Coincidiendo con Bendelow (1976), quien declara como factor crítico la manipulación de los equipos a la hora de obtener resultados fiables.

Por estas razones podríamos concluir que los métodos desarrollados en planta piloto no siempre son aplicables a escala industrial (Bourne y Wheeler, 1982; Haslemor et al., 1985), naciendo la necesidad de métodos para maltear pequeñas cantidades con resultados más representativos y aplicables a la industria. De hecho, Hough et al. (1971) hace referencia a un tipo de malteado a pequeña escala, que se empleaba sobre todo en malterías de tipo suelo, a base de bolsas de muselina con medio quilo de cebada enterrado en el lote industrial. Y, a

pesar de catalogarse como un método útil, hasta ahora no se ha encontrado evidencia de su uso en investigación.

2.1.2. MICRO-CERVECERÍA

El siguiente reto en la industria es la elaboración de cerveza a gran escala manteniendo su calidad frente a los cambios que supone cada año de cultivo. Si bien cabe destacar que un correcto control de la calidad de la malta de cebada ayuda, enormemente, a la estabilidad de la calidad final de la cerveza (Fitzsimon y Kneen, 1954), es de gran interés conocer este impacto y estudiar con detenimiento cómo se traducen las calidades de la cebada y malta sobre la calidad de la cerveza final. Antiguamente, el único método válido para realizar ensayos sobre la calidad de la cerveza era la escala industrial, a pesar de que existían diferentes equipos para micro-maltear cebadas, y dado que requiere de grandes cantidades de materia prima, no siempre podía realizarse (Banasik, 1973). Por lo que, para los ensayos experimentales, se analizaba la calidad de la malta y se extrapolaba a la cerveza. Esto conllevaba malinterpretaciones de los resultados, naciendo la necesidad de métodos a pequeña escala para elaborar cerveza (Fitzsimons y Kneen, 1954).

En 1950, apareció la primera planta piloto para elaborar cerveza a pequeña escala, la cual requería unos 12 kg de malta por elaboración, cantidades aún demasiado grandes para lo que a ensayos experimentales se refiere (Banasik, 1973). Cuando se evalúa una nueva variedad para maltería y cervecería, por ejemplo, en programas de mejora genética la extensión de cultivo suele ser pequeña, ya que al agricultor no le interesa invertir grandes extensiones de terreno para una variedad de cebada que igual no tiene futuro en la industria cervecera, por lo que las cantidades para realizar ensayos sobre nuevas variedades suelen ser pequeñas.

Es en 1956 cuando aparece uno de los primeros métodos de micro-cervecería a pequeña escala, usando material convencional de laboratorio, para obtener 1 L de producto final a partir de 250 g de malta (Day, 1956). Day (1956) propuso este método alternativo como una técnica de micro-cervecería que proporcionaba la misma información que las plantas piloto a gran escala, pero a un menor coste, ya que en sus muestras consiguió la misma calidad que las cervezas industriales a lo que parámetros se refiere, ya que reportó una notoria dificultad para igualar el sabor. Frente la necesidad de obtener resultados más representativos y aplicables a la industria, se propusieron métodos alternativos de micro-cervecería a escala laboratorio que obtenían cerca de 3 L de producto final. Burkhart et al. (1960) y Dietel (1965), los emplearon para estudiar nuevas variedades de cebada.

La utilidad, tanto de los equipos de planta piloto como de los métodos de laboratorio para elaborar cerveza, ha sido extensa. Dickson y Burkhart (1956), Dietel (1965), Parker y Lejeune (1956) y Sandegren (1951), analizaron el potencial cervecero de nuevas variedades de cebada, proponiendo el método de elaboración de cerveza en planta piloto como un método apto para la anticipación de las calidades. Por otro lado, Sfat y Mohr (1956) estudiaron la implicación de la malta en el sabor de la cerveza. Así como Kneen (1955), que determinó la influencia de la variedad de cebada y las variables de proceso sobre la atenuación del mosto cervecero.

No obstante, fueron muchos los problemas detectados. Burkhart et al. (1953) elaboraron cerveza en planta piloto y las compararon con cervezas industriales, en ambos métodos utilizaron las mismas cebadas malteadas, y observaron un menor extracto y un mayor color y fermentabilidad en las elaboradas en el laboratorio respecto las industriales. Contrariamente, Banasik (1973), que utilizó la escala laboratorio, observó que al elaborar cerveza a partir de 250 g de malta el contenido de proteína y el extracto eran mayores y la fermentabilidad y el contenido de alcohol disminuían respecto las cervezas industriales. Asimismo, Moll et al. (1982) justificaron la necesidad de micro-mallear cantidades mayores para poder utilizar equipos de micro-cervecería de mayor capacidad y obtener así resultados más fiables y representativos.

Recientemente, las científicas Cassie Poirier y Lindsay Barr han elaborado un método alternativo para realizar evaluaciones sensoriales a través de la malta, el cual fue validado por la American Society of Brewing Chemists en 2016 (ASBC, 2016). El método de *Hot Steep* consiste en infundir una muestra de malta triturada con agua a 65° C mientras se filtra, obteniendo los compuestos aromáticos extraíbles de la malta en el mosto resultante. Con ello, se pretende estandarizar la elaboración del mosto para la evaluación sensorial y facilitar la identificación de los descriptores sensoriales.

Por otro lado, dado el aumento del uso de equipos para elaborar cerveza a pequeña escala, no tan solo en el ámbito de investigación sino también para su elaboración a nivel artesanal o en casa, han aparecido numerosos equipos que intentan simular el proceso industrial. La oferta va desde equipos integrados como PicoBrew o LG Homebrew, que se caracterizan por brindar métodos de elaboración sencillos y poco aparatosos. De la misma manera, también encontramos una gran disponibilidad de calderas de maceración Klarstein y fermentadores Brew Monk. Paralelamente, el interés por elaborar nuestra propia cerveza también ha crecido considerablemente, por lo que en el mercado se ofrecen todo tipo de kits para la elaboración en casa de distintas cervezas en pequeña cantidad (cinco litros aproximadamente), como por ejemplo los ofrecidos por Braufässchen.

Pero como afirmó Baker (1954), si el objetivo es llevar a cabo estudios sobre la cerveza y obtener resultados representativos y aplicables al proceso industrial, es difícil encontrar un tamaño de muestra que minimice los problemas que los equipos de pequeña escala pueden suponer sobre la calidad del producto final. Por lo que, el método empleado para elaborar cerveza a pequeña escala en futuros estudios debe tenerse en consideración como una variable más.

2.2. MANEJO DEL CULTIVO Y FACTORES AGROCLIMÁTICOS

El cultivo de cebada es conocido por su gran adaptabilidad a los ambientes hostiles, además es un cereal que se cultiva bajo diversas condiciones ambientales y edafológicas (Muñoz-Amatriaín et al., 2014). Sin embargo, existe una amplia variabilidad en el rendimiento y la calidad maltera año tras año. Además, generalmente, las interacciones entre el genotipo y el ambiente contribuyen en dicha variabilidad, lo que dificulta la identificación de genotipos, especialmente en zonas donde el estrés abiótico complejo es frecuente (Chenu, 2015).

2.2.1. FERTILIZACIÓN CON NITRÓGENO

Las moléculas más abundantes en las plantas son el carbono, el oxígeno, el hidrógeno y el nitrógeno. Este último es el componente principal de las enzimas presentes en las plantas, de su estructura proteica, de la clorofila, del componente de transferencia energética adenosín trifosfato (ATP) y de los ácidos nucleicos, por lo que el contenido de nitrógeno es un determinante indirecto de la tasa fotosintética, de la acumulación de materia seca y, por tanto, del rendimiento del cultivo (Anbessa y Juskiw, 2012). Además, la cebada destinada a maltería requiere un contenido bajo-medio de proteína (entre 9 y 12%), por lo que los agricultores apuestan por aplicaciones moderadas de este tipo de fertilización (Anbessa y Juskiw, 2012).

La aplicación de nitrógeno favorece la expansión de la lámina foliar, así como la cantidad y supervivencia de los hijuelos (Baethgen et al., 1995; Molina-Cano, 1989). Asimismo, su aplicación durante el desarrollo de la inflorescencia parece afectar en mayor medida al crecimiento y diferenciación de los primordios florales, teniendo una menor repercusión sobre su formación (Molina-Cano, 1989). Baethgen et al. (1995) observaron que, frente a la fertilización con nitrógeno aumentaba el número de espigas que, a su vez, producían un número menor de granos como efecto compensatorio. Sharma y Verma (2010) reportaron un descenso del peso de mil granos frente a la aplicación de dosis elevadas de nitrógeno, atribuyendo este hecho a la disminución del tamaño de los granos dado el aumento del número de granos por espiga. Por otro lado, Molina-Cano (1989) destacó que una deficiencia de nitrógeno puede provocar hasta un 40% de reducción en el número de granos por espiga. Recientemente, Decouard et al. (2022) han evidenciado una disminución global de la biomasa del cultivo, así como un aumento en el contenido de aminoácidos en hojas y raíces, sugiriendo la existencia de una interacción compleja entre la asimilación de nitrógeno y la homeostasis de aminoácidos.

Por otro lado, son numerosas las evidencias referentes a la implicación de la fertilización nitrogenada sobre la calidad de la cebada y de la malta. Marconi et al. (2010) y Oscarsson et al. (1998) son dos ejemplos que muestran la repercusión directa de esta práctica sobre la fracción proteica final de la cebada. Así como Wang et al. (2007), que estudiaron el efecto sobre los parámetros analíticos de la malta, reportando un efecto significativo sobre el extracto, el índice Kolbach y el poder diastásico. El aumento observado en la actividad enzimática, o poder diastásico, sumado al aumento en la fracción nitrogenada del grano, puede resultar en un aumento del contenido de aminoácidos libres que se obtendrán en el

mosto elaborado a posterior, hecho de gran interés en cervecería puesto que los aminoácidos son imprescindibles para el desarrollo de las levaduras y del perfil aromático (Thompson-Witrick y Pitts, 2020). Por otro lado, Ramo (1991) detectó que, frente abonados nitrogenados excesivos, se producía una disminución considerable de los parámetros de calidad extracto o atenuación límite y aumentaba los valores de proteína total y viscosidad. Del mismo modo, Edney et al. (2012) observaron una disminución del índice de germinación frente a un uso elevado de fertilización nitrogenada que, como consecuencia, resultó en maltas poco modificadas con un elevado contenido de β -glucanos en el mosto, bajos índices Kolbach y bajas friabilidades. Es decir, tanto la no aplicación nitrogenada como su aplicación en exceso tiene un efecto notorio sobre la calidad de cebada y malta.

No tan solo existe una implicación de la aplicación de nitrógeno sobre la calidad final de cebada y malta, sino también del momento en el cual se aplica. Wang et al., (2007) reportaron un efecto significativo del momento de la aplicación sobre el poder diastásico y el contenido proteico final. Algunos estudios sugieren que la aplicación nitrogenada debe realizarse en el momento de la siembra para que sea más efectiva sobre el rendimiento del cultivo (Baethgen et al., 1995). Aplicaciones durante estadios vegetativos tempranos, como durante el ahijamiento o la elongación de los tallos, o en estadios tardíos como el espigado, pueden mejorar el crecimiento de la planta y, por tanto, su rendimiento. Aunque como consecuencia puede resultar en un incremento significativo del contenido proteico de los granos de cebada, por lo que en cultivos destinados a maltería debe ser una práctica utilizada con moderación (Baethgen et al., 1995; Halstead et al., 202; Molina-Cano, 1989; Prystupa et al., 2008).

Con los años han nacido nuevos intereses sobre las repercusiones de la fertilización con nitrógeno que han ido más allá de parámetros analíticos básicos de cebada y malta. Por ejemplo, se ha estudiado la influencia de la gestión del cultivo sobre la concentración de fenoles. En cultivos de trigo, se han reportado modificaciones sobre el contenido fenólico total, determinado por Folin-Ciocalteu, y sobre el contenido de algunos compuestos fenólicos importantes conocidos, como los ácidos ferúlicos, cumáricos o vanílicos determinados por HPLC (Engert et al., 2012; Ma et al., 2014). Esta implicación podría explicarse por el hecho de que la fertilización nitrogenada puede aumentar el contenido proteico del grano (Halstead et al., 2022) y, en consecuencia, un aumento de la disponibilidad de aminoácidos de éste para iniciar la vía biosintética de los fenoles, ya que requiere el aminoácido fenilalanina como precursor (Mikyška et al., 2002). Otro ejemplo sería el estudio sobre el contenido de β -glucanos, Oscarsson et al. (1998) y Paynter y Harasymow (2010) reportaron un aumento en el contenido total de β -glucanos al incrementar la ratio de nitrógeno fertilizado, aunque ambos estudios concluyeron que la influencia genotípica es mayor que la ambiental sobre este parámetro.

En cebadas destinadas a la producción de cerveza es esencial un adecuado manejo del nitrógeno para obtener altos rendimientos, pero en exceso, puede resultar perjudicial para la calidad maltera. Esto ocurre porque existe generalmente una relación inversa entre alto contenido de nitrógeno en grano y el extracto de malta (Howard et al. 1996; Stone y Savin, 1999), por tanto, la estrategia de fertilización de estos cultivos es muy relevante para obtener buenos rendimientos sin disminuir la calidad maltera.

2.2.2. FACTORES AMBIENTALES

Los factores ambientales que pueden afectar en mayor medida el rendimiento y la calidad del cultivo de cebada, dado que pueden limitar el crecimiento y productividad de los cultivos, y que son considerados principales factores de estrés abiótico son la falta de agua, las temperaturas excesivamente elevadas, una alta salinidad del suelo y la falta de nutrientes (Barnabás et al., 2008).

En el caso de las temperaturas, frente a su incremento se verá acelerada la diferenciación floral y se estimulará el crecimiento de hojas y tallos. Esto provocará que la competencia por los asimilados se vea aumentada y se reduzca la diferenciación de nuevas espiguillas (Miralles et al., 2021). Se ha observado que temperaturas elevadas pueden acelerar la senescencia y disminuir el índice de área foliar de la planta, por lo que la interceptación de luz puede verse disminuida (Molina-Cano, 1989). Molina-Cano (1989) determinó el efecto directo de las temperaturas sobre el ahijamiento de la planta. Temperaturas cálidas inducen la formación del tallo principal, por lo que se forman menos tallos hijos por reducción del suministro de asimilados. En cambio, las bajas temperaturas suelen favorecer el ahijamiento de la planta por provocar justamente el efecto contrario, disminuyen el crecimiento de las hojas y, por tanto, la competencia por los asimilados (Molina-Cano, 1989).

El aumento de las temperaturas durante el periodo de llenado de los granos resulta en una disminución del peso de éstos, ya que se reduce la etapa de llenado con baja o nula compensación en la tasa de llenado de los granos (Przulj et al., 2014; Savin y Nicolas, 1996; Savin et al., 1997a). Cuando el aumento de las temperaturas supera los 30-32° C, Jenner (1994), y posteriormente otros investigadores como Passarella et al. (2003), propusieron que esta disminución del peso de los granos y aumento del contenido proteico estaba propiciada por la disminución de la síntesis de almidón que provocan las altas temperaturas. Asimismo, Wei et al. (2009) en un estudio con 148 genotipos encontraron que, frente a una mayor temperatura en el periodo de post-antesis, se producía un incremento en la actividad de la β -amilasa y aumentaba el contenido de proteína, presumiblemente como consecuencia de la dilución del almidón. Además, observaron que la morfología de los gránulos de almidón también se veía afectada, modificándose el porcentaje de gránulos grandes y respecto los gránulos pequeños. De la misma manera lo describieron Savin et al. (1997b), quienes observaron una disminución general del contenido de almidón, así como del contenido de β -glucanos frente temperaturas moderadamente altas y muy alta.

Respecto al estrés hídrico, una deficiencia ligera de agua, a pesar de tener un efecto bajo sobre el crecimiento vegetativo de la planta, puede deprimir la formación de primordios florales. Su repercusión es mayor si se da durante el periodo vegetativo, ya que retrasa el inicio de la floración, o durante la diferenciación de la inflorescencia, lo cual se traducirá en una disminución del número de espiguillas por espiga. Por otro lado, la formación de los granos de polen es sensible a la escasez de agua en el suelo, por lo que las deficiencias hídricas pueden impedir la formación de polen fértil (Miralles et al., 2021). Si la deficiencia de agua se da desde la antesis hasta la madurez, los tallos y las hojas se marchitarán y morirán

antes de tiempo, hecho que acortará la duración del periodo de llenado de los granos (Savin y Nicolas, 1996), resultando en cebadas con granos de bajo calibre y poco interés en maltería.

Normalmente en el campo, la síntesis de proteína en los granos ocurre durante la fase temprana del llenado de los granos, mientras que la acumulación de carbohidratos ocurre a lo largo de toda la fase de llenado, así como la acumulación de β -glucanos, la cual ocurre con mayor intensidad en la fase tardía. Por tanto, una deficiencia de agua en la fase temprana resultaría en granos con menor peso total y en un aumento en el porcentaje de proteínas (Hong et al., 2020; Savin y Molina-Cano, 2003). Así lo reportaron también Eagles et al. (1995), quienes observaron un aumento del contenido proteico de los granos frente situaciones de estrés hídrico. Contrariamente, un exceso de lluvia puede provocar pérdidas del nitrógeno del suelo por lixiviación o desnitrificación de éste (Baethgen, 1995), posiblemente resultando en cebadas con un bajo contenido proteico.

A parte del estudio de la implicación de los cambios en las condiciones ambientales a nivel de cultivo y de la cebada resultante, se ha estudiado su efecto sobre parámetros de calidad concretos de cebada y malta. Como por ejemplo Campbell et al. (1989) y Truelsen (1987) quienes determinaron que las condiciones climáticas cálidas y secas, la cosecha temprana y el aumento de la fertilización con nitrógeno, son factores que dan lugar a un aumento de la viscosidad en los mostos de malta. Por otro lado, Aastrup (1979), Oscarsson et al. (1998) y Stuart et al. (1988) observaron que frente una correcta irrigación o lluvia suficiente las cebadas presentaban un contenido menor de β -glucanos, hecho que se traducía también en una menor viscosidad. Recientemente, Hong et al. (2020) han observado una reducción significativa del contenido de β -glucanos frente condiciones de sequía en las primeras etapas del desarrollo de la planta, presuntamente consecuencia del aumento de la actividad de la enzima β -amilasa que se dio bajo las mismas condiciones de estrés hídrico.

Las condiciones ambientales durante el desarrollo y crecimiento del cultivo de cebada tienen una repercusión relevante sobre el cultivo, pudiendo producir pérdidas en el rendimiento de los cultivos y modificaciones en la composición química del grano que, a su vez, pueden alterar las características tecnológicas y el valor nutritivo, aroma y sabor del producto final (Hasanuzzaman et al., 2013). Controlar las condiciones ambientales en el campo y/o prever la interacción de los distintos factores ambientales es, como mínimo, complejo, pero entender cómo los principales factores ambientales pueden influir sobre la capacidad maltera de la cebada y/o sobre los parámetros de calidad implicados en el desarrollo del aroma y sabor de la cerveza es muy relevante para la industria maltera y cervecera. Por tanto, conocer la materia prima como herramienta para tratar de adaptar el proceso de malteado y de elaboración de cerveza es una estrategia de gran utilidad y gran interés a nivel industrial.

2.3. RELACIÓN ENTRE MALTA Y CERVEZA

La malta influye enormemente en las propiedades de la cerveza, puesto que es una de las materias primas más importantes por su aporte de nutrientes imprescindibles para el crecimiento de la levadura, además contribuye en la formación de color, aroma y sabor (Chandra et al. 1999). Se ha identificado que las distintas variedades de cebada pueden contribuir de manera distinta en las características sensoriales de la cerveza, de la misma manera que las condiciones ambientales a las cuales haya estado expuesto el cultivo. Aunque como describen Herb et al. (2017b) y McMillan et al. (2020), probablemente la mayor influencia venga dada por las condiciones del malteado. Por ello, conocer la capacidad maltera de la cebada es de gran interés tanto en maltería como en cervecería.

2.3.1. INFLUENCIA VARIETAL

La adaptabilidad de las distintas variedades de cebada a cambios en las condiciones de cultivo y/o en las condiciones de proceso es muy variable, puesto que en la germinación de la semilla, crecimiento y desarrollo intervienen numerosos genes (Cattivelli et al., 2003; Hayes et al., 2003; Igartua et al., 2002). De hecho, es un aspecto conocido y ampliamente estudiado que, tanto agricultores como malteros, no debemos dejar de tener en cuenta. Por ejemplo, Hayes et al. (2003) describieron que las variedades de cebada de dos carreras, normalmente, presentan un mayor número de hijuelos por planta y sus semillas son de mayor tamaño respecto las cebadas de seis carreras.

Numerosos autores han descrito la influencia genotípica, ambiental e, incluso, del proceso de malteado sobre las propiedades organolépticas de la cerveza (Bettenhausen et al., 2018; Bettenhausen et al., 2020; Herb et al., 2017a; Morrissey et al., 2021; Stewart et al., 2022; Windes et al., 2021). Recientemente, Gastl et al. (2021) observaron diferencias en la composición de sustancias procedentes de la degradación citolítica dependiendo de la variedad de cebada, asociándolo a la implicación genética sobre la combinación entre la estructura de las paredes celulares y el potencial enzimático de la variedad. Asimismo, Swanston et al. (2006) en un estudio con cuatro genotipos cultivados durante un año en tres localizaciones distintas, observaron un comportamiento distinto entre variedades y zonas de cultivo.

Si nos centramos en la respuesta que pueden tener las diferentes variedades frente a las condiciones ambientales, Fox et al. (2007) y Przulj et al. (2014) han observado un comportamiento distinto entre genotipos bajo las mismas condiciones ambientales, sobre todo cuando éstas no suponen un estrés para la planta. Por lo que ambos trabajos sugieren la existencia de una interacción entre el ambiente y el genotipo. Por otro lado, Wang et al. (2007) detectaron diferencias entre genotipos respecto la variación de las fracciones proteicas según la aplicación de nitrógeno en el campo, sugiriendo la posibilidad de modificar esta respuesta por medio de un enfoque de mejora genética de las variedades de cebada.

En un estudio que comprendía 187 variedades, 70 localidades y 33 años de cultivo (del 1983 al 2015), Laidig et al. (2017) evaluaron la mejora genética de las cebadas malteras y estimaron la

influencia genotípica y ambiental sobre parámetros de calidad. Observaron como el genotipo tenía una mayor influencia sobre las características de la malta de cebada, mientras que la adaptabilidad agronómica era menor. Es decir, durante el desarrollo de la planta los factores con mayor influencia son los ambientales y sobre el proceso de malteado y la calidad de la malta existe una mayor influencia varietal. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Rutger et al. (1966).

En la misma línea, cabe destacar la fuerte interacción entre el genotipo y el año de cultivo, o condiciones ambientales, como describen Laidig et al. (2017), Przulj et al. (2014), Swanston et al. (2006) y Ramo (1991), que en muchos casos tiene un mayor efecto que el genotipo individualmente. Esta interacción entre el genotipo y el entorno se considera una de las causas de la variación impredecible que se da en los caracteres cuantitativos de los cultivos (Romagosa y Fox, 1993).

2.3.2. INFLUENCIA DEL PROCESO

Como en toda elaboración de un producto, la calidad de la materia prima es un aspecto de alta importancia, pero no debemos olvidar la implicación de las condiciones del proceso de elaboración. En el caso de la cerveza, desde que la cebada entra al proceso hasta que se obtiene el producto final se dan numerosas etapas, todas ellas con un papel importante puesto que repercuten directamente sobre la calidad final. En la **Figura 2.1** se han esquematizado las principales etapas de todo el proceso, resaltando las reacciones más importantes que se dan en cada una.

Cabe destacar el gran impacto que suponen las condiciones tecnológicas sobre la calidad, sobre todo el malteado, puesto que el grado de modificación de la malta que se obtenga es un aspecto de suma importancia para la elaboración de cerveza. Como se ha explicado anteriormente, el malteado tiene como principal objetivo generar enzimas y degradar moléculas de gran tamaño en sustratos accesibles para el embrión y la levadura. La degradación de las paredes celulares del endospermo durante el malteado se traduce en una producción de malta de calidad y una gran disponibilidad enzimática (Bourne y Wheeler, 1982; Fincher, 2011). Si el resultado del proceso son maltas poco modificadas, cabrá esperar mostos con niveles bajos de azúcares y proteínas en extracto (Brennan et al., 1996), lo que, si no se compensa en cervecería, limitará el crecimiento de la levadura y, como consecuencia, la fermentación puede llegar a ser insuficiente (Molina-Cano, 1989). Por otro lado, si se obtienen maltas excesivamente modificadas se producirán pérdidas de producción y una mayor probabilidad de obtener mostos con un color superior al deseado (Molina-Cano, 1989)

La modificación de la malta vendrá determinada, principalmente, por la temperatura del agua de remojo, el grado de humedad del grano durante todo el proceso, el tiempo de remojo y/o de germinación, las temperaturas de germinación y/o del secado-tostado y por la oxigenación del grano durante todo el proceso. Las primeras horas de remojo son críticas puesto que se produce la activación de distintos procesos, como la actividad enzimática, el desarrollo y liberación hormonal, todos ellos determinarán en gran medida la calidad final de la malta (Bewley, 1997). Cabe destacar que la etapa con mayor repercusión en el color y aroma de la

cerveza es, sin duda, el secado-tostado, ya que se produce la solubilización de compuestos, procesos de caramelización y reacciones de Maillard (Díaz et al., 2022).

Teniendo en cuenta que, durante el proceso de malteado y macerado el contenido de almidón de la cebada se degrada a azúcares libres casi en su totalidad y que tan solo un 45% aproximadamente de la proteína se solubiliza (Hayes et al., 2003), cabe destacar que el grado de modificación y la calidad de la malta vendrán determinados, en gran parte, por la estructura y capacidad de malteado del grano de cebada. Brennan et al. (1996) quienes estudiaron ocho variedades de cebada con distintas capacidades maltera, observaron que la principal diferencia entre las cebadas de mayor calidad y las de menor era el grado de unión entre las moléculas de almidón y proteína. Además, observaron que las cebadas con una mayor capacidad de malteado presentaban un menor contenido de proteína y, por ende, un mayor contenido de almidón (Brennan et al., 1996).

El proceso de degradación viene propiciado por varias enzimas (citólíticas, proteolíticas y amilolíticas), las cuales deben actuar equilibrada y homogéneamente durante el proceso de malteado para resultar en maltas de alta calidad (Gastl et al., 2021). Con tal de evaluar la efectividad del malteado: parámetros como la friabilidad, vitrosidad y contenido en β -glucanos de la malta reflejan la actividad citolítica; el extracto, la atenuación final, viscosidad y el poder diastásico muestran la actividad amilolítica; y, por último, la actividad proteolítica se verá reflejada por el contenido de proteína total, proteína soluble, índice Kolbach y FAN (Edney et al., 2012; Gastl et al., 2021; Stewart et al., 2022). Cualquier desequilibrio en la actividad enzimática durante el malteado puede inducir cambios en el metabolismo de la levadura que, posiblemente, afectarán al desarrollo de compuestos aromáticos (Moll et al., 1979). Por ejemplo, se ha observado que maltas con un exceso de azúcares libres resultan en cervezas dulces, dado que durante la fermentación no se consumen en su totalidad (Fox et al., 2010). Asimismo, se ha destacado que maltas con un exceso de FAN pueden propiciar un exceso en la producción de diacetilo durante la fermentación, compuesto que se considera desagradable ya que aporta un carácter mantecoso a la cerveza (Dong et al., 2015).

Es por todo ello, que el proceso de malteado debe considerarse como una variable importante, por su influencia en las características organolépticas de la cerveza, y debería adaptarse a las necesidades del producto final.

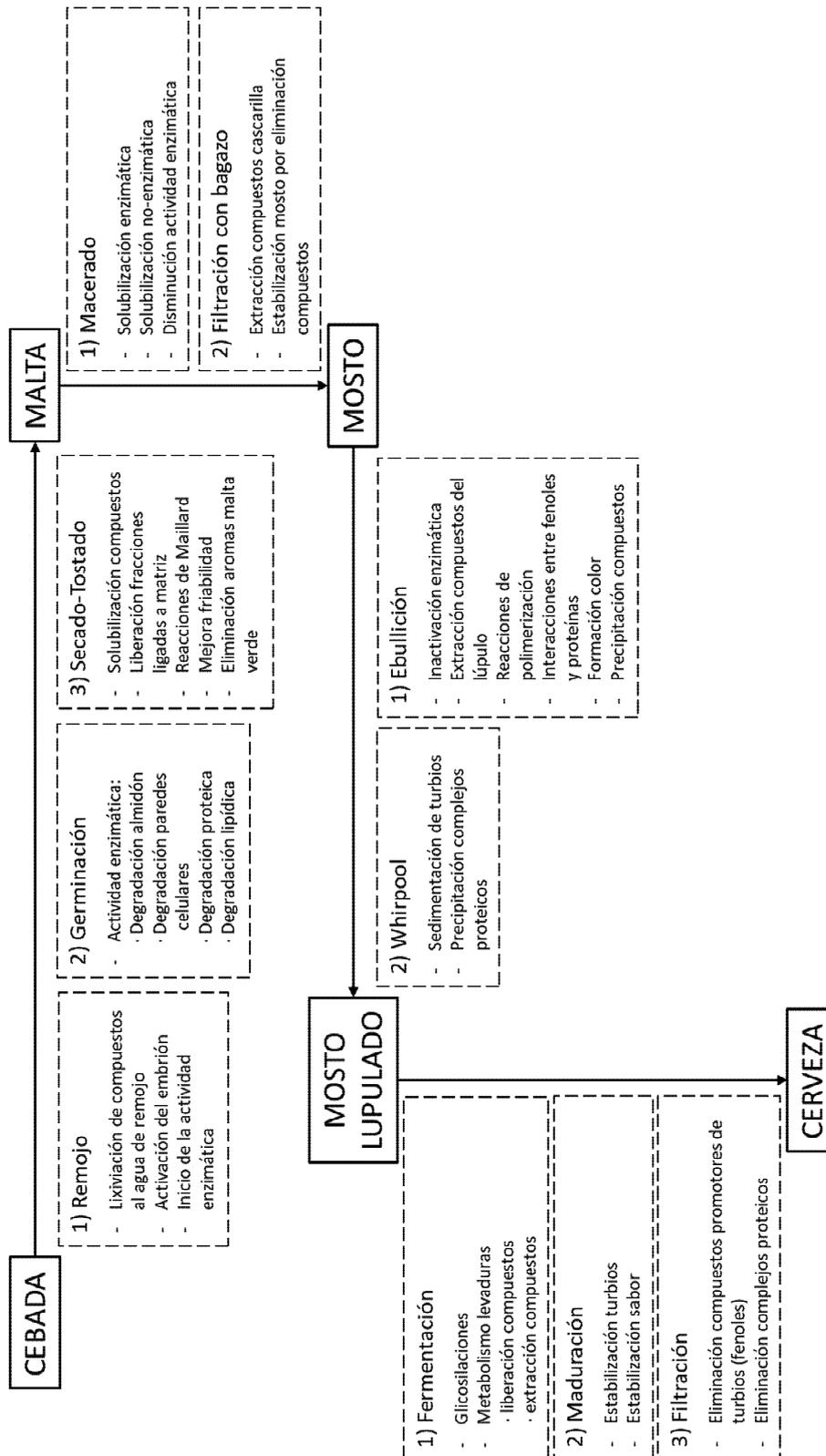


Figura 2.1. Esquema general del proceso de las etapas de elaboración de la cerveza desde la cebada hasta el producto final, así como de los principales cambios y reacciones que tienen lugar en cada etapa (fuente adaptada de Hough et al. (1971), Schwarz y Li (2011) y Wannemacher et al. (2018)).

2.4. DESARROLLO DEL SABOR DE LA CERVEZA

En los últimos años se ha visto un aumento de la competencia en la industria cervecera con la aparición de la producción artesanal, por lo que los consumidores son cada vez más críticos y exigentes con el producto. En cervecería, la búsqueda de estabilidad del producto es uno de los mayores retos, puesto que las materias primas utilizadas son susceptibles a los cambios ambientales de cada campaña de cultivo y, además, el hecho que el proceso industrial desde la cebada hasta la cerveza comprenda tantas etapas, implica que exista un gran número de variables que pueden inducir cambios en la calidad del producto final.

A grandes rasgos, el mosto cervecero es un medio de cultivo para la levadura que contiene azúcares fermentables (fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa), compuestos nitrogenados (aminoácidos, péptidos y polipéptidos), vitaminas, iones, compuestos fenólicos y minerales, entre otros. Por ello, la composición del mosto es considerada una parte importante en el desarrollo del sabor de la cerveza (Bamforth & Kanauchi, 2001; Ferreira y Guido, 2018) así como para el crecimiento y metabolismo de la levadura (Loviso y Libkind, 2018). Son numerosos los compuestos que se ven involucrados en el desarrollo del aroma y sabor. En la **Tabla 2.1** se muestran los principales aromas asociados a productos del metabolismo de la levadura durante la fermentación.

Tabla 2.1. Principales aromas producidos por productos procedentes del metabolismo de la levadura durante la fermentación (fuente adaptada de James y Stahl, 2014).

Aroma/Sabor	Compuestos
Cuerpo	Polisacáridos, dextrinas
Ácido, agrio	Ácido láctico, ácido acético
Astringencia	Iso- α ácidos
Sulfúrico	Sulfuro de dimetilo (DMS), sulfuro de hidrógeno
Vegetales cocidos	Disulfuroso, DMS, butilo mercaptano, etilo mercaptano
Metálico	Compuestos ferrosos
Salado	Sulfato de magnesio, cloruro sódico, sales minerales
Cartón	Aldehídos, 2-trans-nonenal
Mantequilla	Diacetilo
Fenólico	Clorofenoles
Caramelo, quemado	Melanoidinas
Resinoso, herboso	Aldehídos, hexanal
Disolvente	Ésteres, acetato de etilo
Afrutado	Acetato etilo, caprilato etilo, caproato de etilo
Floral, lupulado	Alcohol fenético
Cereal	Aldehído aromático ciclopentimetanol, melanoidinas, 2-acetilpiridina, trimetilpirazina
Dulce	Dextrinas

Recientemente, Stewart et al. (2022) recogieron las principales variables que tienen una repercusión sobre las características organolépticas de la cerveza:

- Variedad de la malta de cebada.
- Zona donde la cebada se ha cultivado.
- Diseño y configuración de las instalaciones de la maltería, así como las especificaciones necesarias para cervecería.
- Impacto de la lipoxigenasa.
- Reacciones de Maillard.
- Composición iónica del licor de cocción.
- Contenido de ácidos grasos del mosto cervecero.
- Relación entre la glucosa, fructosa y maltosa presente en el mosto cervecero.
- Temperatura de fermentación.
- Potencial de fermentación de la cerveza.
- Amargos y aromas procedentes del lúpulo.
- Interacción entre los polifenoles de la cerveza y la prolina presente en las proteínas de la saliva humana.

Definir sensorialmente una cerveza siempre ha sido complicado dada la complejidad de sus características organolépticas. Por ello, Meilgaard et al. (1979) desarrollaron una herramienta con el fin de estandarizar el vocabulario que se utilizaba en los análisis sensoriales. En la **Figura 2.2** se presenta una adaptación de la rueda de aromas y sabores que desarrollaron. En términos generales, esta herramienta cruza términos comunes con los que los consumidores pueden estar familiarizados con descriptores más específicos. En el círculo central podemos observar los descriptores de primer nivel que quedan agrupados en 14 clases diferentes, como las del círculo medial. A partir de éstas nacen los descriptores de segundo nivel más específicos, situados en el círculo exterior de la rueda. Una peculiaridad de la rueda de aromas y sabores es la distinción que se hace entre las características percibidas en boca o nariz.

A pesar del reto que supone caracterizar y catalogar los aromas y sabores de la cerveza, son numerosos los estudios que tratan de esclarecer qué influye en ellos. Sayre-Chavez et al. (2022) han tratado de esclarecer las bases genéticas que contribuyen en el desarrollo del sabor, así como Bettehausen et al (2020), Morrissy et al (2022a), Morrissy et al (2022b) y Windes et al. (2021).

2.4.1. IMPLICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los lípidos representan cerca del 3% de materia seca del grano de cebada y juegan un papel importante en la regulación y/o modulación de varias propiedades químicas y físicas del grano, tanto de cebada como de malta. Aproximadamente un 45% de los lípidos se localizan en el endospermo y en el embrión, por lo que principalmente tienen una función estructural y fisiológica muy importante. Por ejemplo, la capa aleurona contiene lípidos que actúan como fuente de nutrientes que requiere el embrión durante la germinación (Cozzolino y Degner, 2016). Se ha reportado la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos de la cebada, hecho que puede repercutir posteriormente durante el malteado y la elaboración de la cerveza (Kobayashi et al., 1993).

Los lípidos están formados por ácidos orgánicos de cadenas lineales de carbono e hidrógeno llamados ácidos grasos. Éstos, según su naturaleza, se clasifican en saturados, cuando no presentan dobles enlaces, monoinsaturados, si presentan un doble enlace, y poliinsaturados, cuando presentan dos o más dobles enlaces. Los ácidos grasos son un grupo muy amplio, aunque concretamente en la cebada los mayoritarios son el ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (Gordon et al., 2018a). En la **Tabla 2.2** se presentan los ácidos grasos más comunes en este cereal.

Tabla 2.2. Clasificación de los ácidos grasos presentes en la cebada según su naturaleza.

	Ácido graso	Abreviatura
Saturados	Ácido mirístico	C14:0
	Ácido palmítico	C16:0
	Ácido esteárico	C18:0
	Ácido araquídico	C20:0
	Ácido behénico	C22:0
Monoinsaturados	Ácido palmitoleico	C16:1
	Ácido oleico	C18:1
	Ácido gadoleico	C20:1
	Ácido erúcico	C22:1
Poliinsaturados	Ácido linoleico	C18:2
	Ácido linolénico	C18:3

Cerca del 10-12% del contenido total se consume durante el malteado, probablemente por la respiración del grano (Bewley, 1997; Hough et al., 1971), y a pesar de que se produce una degradación rápida en las primeras etapas del proceso por la alta actividad lipolítica (Cozzolino y Degner, 2016; Youssef et al., 2012), se ha observado un aumento del ácido linoléico en la malta final (Bravi et al., 2012). De la misma manera se ha reportado un efecto importante de las condiciones de proceso (Hough et al., 1971), es decir, la degradación lipídica se puede ver potenciada o reducida por las condiciones de remojo, germinación y/o secado-tostado que se apliquen.

Si nos centramos en el proceso de malteado, Cozzolino et al. (2014) reportaron la implicación que tienen los ácidos grasos durante la etapa de remojo, ya que éstos tienen un papel

fundamental en la captación de agua por parte del grano. Asimismo, observaron que mientras el ácido mirístico y oleico tenían un impacto positivo, el ácido esteárico, araquídico y lignocérico influían negativamente en la ganancia de agua por parte del endospermo (Cozzolino et al., 2014). En la misma línea, Bravi et al. (2012) y Özcan et al. (2018) observaron una correlación positiva entre el contenido de ácido oleico y los parámetros de calidad de la malta, al contrario que en presencia del ácido linoleico, palmitoleico y linolénico. Cabe destacar la variabilidad en el contenido de ácidos grasos entre las variedades de cebada, tal y como reportan Bravi et al. (2012) y Evans et al. (2012).

En la misma línea, se ha reportado la implicación del perfil de ácidos grasos sobre la fermentabilidad de los mostos cerveceros (Bravi et al., 2012; Cozzolino et al., 2013; Evans et al., 2012). Los ácidos grasos tienen un papel fundamental en el metabolismo de la levadura, puesto que actúan como precursores en la formación de compuestos que contribuyen en el perfil aromático de la cerveza (Bravi et al., 2012) tal y como se explicará más adelante en este mismo apartado. Cabe destacar que los ácidos grasos insaturados tienen una alta susceptibilidad a ser oxidados, propiciando la formación de compuestos aromáticos no deseados a través de su degradación oxidativa y aportando a la cerveza un carácter de envejecimiento o enranciamiento (Ang y Bamforth, 2014; Bravi et al., 2012).

Asimismo, la proporción entre ácidos grasos insaturados y saturados se ha asociado al fenómeno gushing¹, dónde los ácidos grasos insaturados actúan como supresores del gushing y, contrariamente, los saturados actúan como promotores (Bravi et al., 2012; Vanderhaegen et al., 2006). Asimismo, se ha reportado la implicación de lípidos no oxidados, radicales libres derivados de lípidos y productos de la oxidación lipídica en la formación de aldehídos de Strecker (Gallardo et al., 2008; Vanderhaegen et al., 2006), compuestos que contribuyen en la formación del perfil aromático de la cerveza explicados más adelante en este mismo apartado.

2.4.2. PAPEL DE LOS MINERALES

Principalmente los compuestos inorgánicos presentes en la cerveza proceden del agua que se utiliza para la elaboración de la cerveza y/o de la malta (Poreda et al., 2015). Su efecto puede ser tanto positivo como negativo, dependiendo de su naturaleza y concentración, y aunque contribuyen de forma importante en el sabor del producto final, muchos cerveceros prefieren evitar su contenido dada su actividad prooxidante que fomenta el enranciamiento de la cerveza. Estos compuestos, a lo largo del proceso, precipitan y/o son absorbidos por la levadura (Buiatti, 2009). Los principales compuestos inorgánicos presentes en la cerveza y su rango de concentraciones se muestran en la **Tabla 2.3**.

¹ Gushing: desbordamiento más o menos vigoroso de cerveza al abrir la botella, normalmente debido a un exceso de carbonatación en el producto.

Tabla 2.3. Concentraciones (mg/L) de los principales compuestos inorgánicos presentes en la cerveza (fuente adaptada de Buiatti (2009) y Hough et al. (1971)).

Compuesto inorgánico	mg/L
Bicarbonato	25–50
Calcio	25–120
Carbonato	25–50
Cloruro	120–500
Fosfato	170–600
Magnesio	50–90
Nitrato	13–43
Potasio	200–450
Oxalato	5–30
Sodio	20–350
Sulfato	100–430
Zinc	0.01–1.48

El carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) son dos compuestos inorgánicos indeseados en el mosto cervecero, puesto que su presencia aumenta el pH. Esto se traduce en mostos menos fermentables, dada la alta proporción de dextrinas/maltosa, filtración deficiente y separación entre las proteínas y polifenoles insuficiente (Buiatti, 2009).

Por otro lado, el calcio (Ca^{2+}) es considerado el ion más influyente, puesto que acidifica el mosto cervecero, siendo capaz de reaccionar con fosfatos aportados por la malta. La acidificación del mosto es esencial para la actividad de enzimas amilolíticas y proteolíticas, por tanto, fomenta la sacarificación, lo que incrementa el extracto, y la proteólisis, aumentando la solubilización de la materia nitrogenada. Juega un papel importante desde la etapa de macerado hasta la maduración de la cerveza, aunque un exceso en su contenido puede reducir la extracción de las resinas del lúpulo (Boulton y Quain, 2008; Buiatti, 2009; Montanari et al., 2009). Similarmente, el magnesio (Mg^{2+}) tiene las mismas propiedades, con la particularidad de participar en el metabolismo de la levadura como cofactor de reacciones enzimáticas internas (Buiatti, 2009).

Respecto al sulfato (SO_4^{2-}), tiene un efecto positivo sobre la degradación del almidón y las proteínas, viéndose implicado en la filtración y sedimentación de los posibles turbios. Es un compuesto que en concentraciones medias se percibe como una cerveza seca y crujiente, pero en exceso puede aportar un carácter áspero, salado y laxante (Boulton y Quain, 2008; Buiatti, 2009).

En el caso de los cloruros (Cl^-), por sí mismos no representan ningún problema en cervecería, pero al reaccionar con otros iones puede contribuir en el aroma y sabor del producto final. Cabe destacar que un exceso en su concentración puede llegar a inhibir la fermentación (Boulton y Quain, 2008; Buiatti, 2009). Paralelamente, la presencia de nitratos (NO_3^-) no es considerada indeseable, pero debe tenerse en cuenta su fácil conversión en nitritos (NO_2^-), siendo éstos perjudiciales para la salud y, si su contenido es elevado, la fermentación puede verse ralentizada y provocar un aumento sobre el contenido de diacetilo y pentanodiona final (Buiatti, 2009; Ferreira y Guido, 2018).

Por último, el zinc (Zn^{2+}) tiene un papel importante en el metabolismo de la levadura y en el proceso de fermentación, ya que fomenta la síntesis proteica y, por ende, el crecimiento de la levadura. Un exceso de su contenido puede afectar negativamente a la estabilidad coloidal de la cerveza y aportar un sabor metálico característico a la cerveza resultante (Buiatti, 2009).

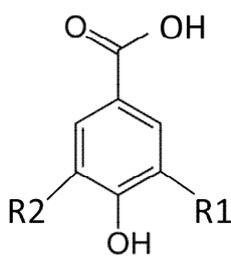
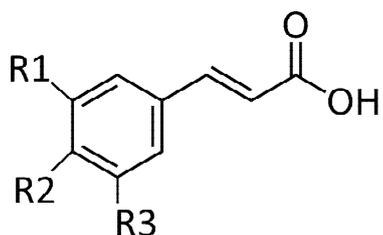
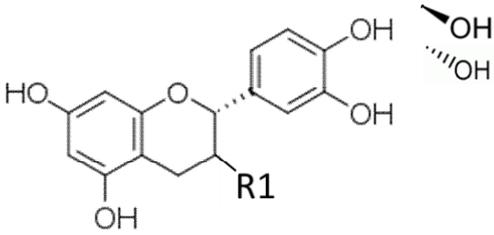
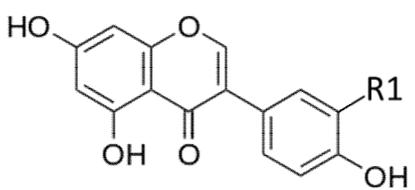
2.4.3. *IMPLICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS*

Los compuestos fenólicos son fitoquímicos presentes en la mayoría de los tejidos vegetales, procedentes del metabolismo secundario de las plantas que, durante su desarrollo, las protegen frente al posible ataque microbiano, la radiación ultravioleta y de las condiciones ambientales extremas (Cohen y Kennedy, 2010). Por ejemplo, Martínez-Subirà et al. (2021a) y Martínez-Subirà et al. (2021b) observaron una modificación en la composición relativa de los compuestos bioactivos tanto en genotipos de cebada desnuda como en genotipos de cebada coloreada. De hecho, los compuestos fenólicos son considerados una parte esencial del sistema de respuesta frente al estrés del cual disponen las plantas (Rao et al., 2018). En particular, la cebada es una fuente importante de compuestos fenólicos que le aporta un poder antioxidante natural (Carvalho et al., 2015), puesto que los fenoles son moléculas muy susceptibles a la oxidación, protegiendo de los procesos oxidativos a las demás moléculas susceptibles.

Los compuestos fenólicos están formados por un anillo de benceno al que se le unen uno o varios grupos hidroxilo (Bhattacharya et al., 2010), por lo que son un grupo de moléculas muy heterogéneo que se clasifican según la base de su esqueleto químico. Las principales familias de compuestos fenólicos presentes en la cebada son los ácidos fenólicos, formados por ácidos hidroxibenzoicos y hidroxicinámicos, los flavan-3-oles y las flavonas glicosiladas. En la **Tabla 2.4** se muestran la estructura principal de las distintas familias fenólicas.

Respecto a la biosíntesis fenólica en la cebada, el precursor es el aminoácido fenilalanina, aunque de manera menos común puede iniciarse también desde el aminoácido tirosina (Cohen y Kennedy, 2010). En la **Figura 2.3** se muestra de manera simplificada la ruta biosintética de las principales familias fenólicas. El aminoácido fenilalanina se convierte en ácido cinámico por medio de la acción de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL), compuesto desde el cual se inician distintas rutas enzimáticas que derivan en los demás compuestos (Cohen y Kennedy, 2010; Martin, 2018). Una característica de los compuestos fenólicos presentes en los cereales es su presencia en forma libre, mayoritariamente flavan-3-oles y flavonas glicosiladas, y en forma ligada a proteínas y/o polisacáridos, como los ácidos fenólicos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos.

Tabla 2.4. Clasificación de las principales familias fenólicas presentes en la cebada. Distinción entre los diferentes compuestos que las forman según el radical (fuente adaptada y ampliada de Rao et al. (2018)).

Estructura familia fenólica	R1	R2	R3	Compuesto fenólico
Ácidos hidroxibenzoicos				
	H	H		<i>Ácido hidroxibenzoico</i>
	H	OCH ₃		<i>Ácido vanílico</i>
	OCH ₃	OCH ₃		<i>Ácido siríngico</i>
	OH	OH		<i>Ácido gálico</i>
Ácidos hidroxicinámicos				
	H	H	H	<i>Ácido cinámico</i>
	H	OH	H	<i>Ácido p-cumárico</i>
	OH	OH	H	<i>Ácido cafeico</i>
	OCH ₃	OH	H	<i>Ácido ferúlico</i>
	OCH ₃	OH	OCH ₃	<i>Ácido sináptico</i>
Flavan-3-oles				
				<i>Catequina</i> <i>Epicatequina</i>
Flavonas				
	H			<i>Apigenina</i> <i>Luteolina</i>

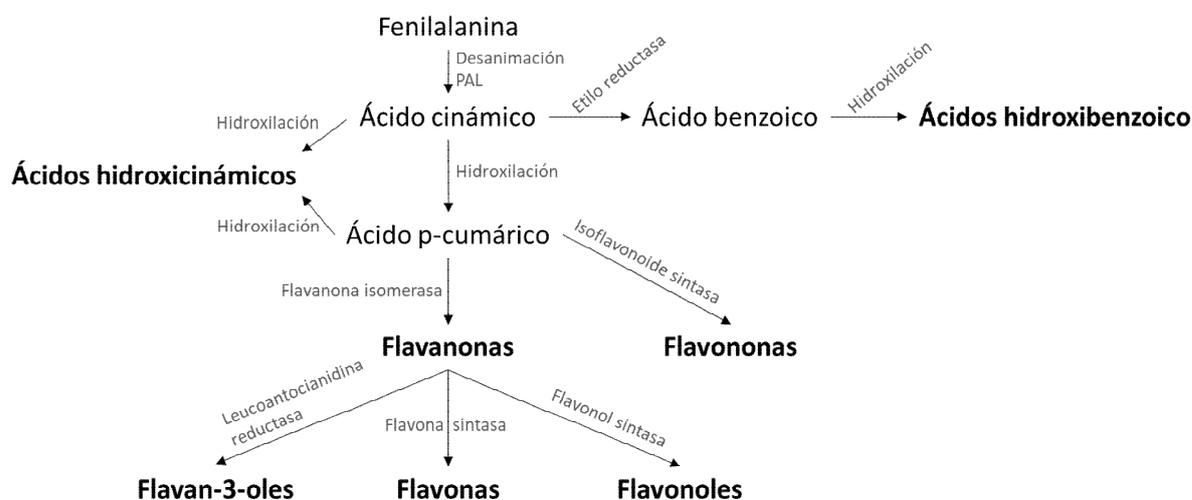


Figura 2.3. Ruta biosintética de las familias mayoritarias de los compuestos fenólicos presentes en la cebada, a partir del aminoácido fenilalanina. PAL: fenilalanina-amonio liasa.

Cohen y Kennedy (2010) destacaron que gran parte de la variación en el contenido fenólico de la cebada viene dada por la implicación de las condiciones ambientales durante el cultivo. La exposición solar, y el incremento de temperatura que conlleva, son factores que se ven positivamente correlacionados con la acumulación fenólica en los granos. La radiación ultravioleta también puede propiciar un aumento significativo de los ácidos hidroxicinámicos y las flavonas, dado que induce una mayor actividad de la enzima PAL. No obstante, puesto que no todas las variedades presentan los mismos fenoles, varios autores han reportado la implicación genotípica (Gamel y Abdel-Aal, 2012; Mpofo et al., 2006; Wannemacher et al., 2018).

Cabe resaltar que la mayoría de los compuestos fenólicos identificados en la cebada también se han identificado en la malta (Carvalho et al., 2016), indicando que la actividad antioxidante detectada en la malta puede ser resultado de los antioxidantes naturales presentes en la cebada (Woffenden et al., 2001). Este hecho es importante, ya que los compuestos antioxidantes de la malta desempeñan un papel fundamental sobre la estabilidad oxidativa y la estabilidad del sabor de la cerveza, ya que pueden actuar como formadores de turbios (Aron y Shellhammer, 2010; Lentz, 2018) y como moléculas que pueden limitar las reacciones causadas por las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Cohen y Kennedy, 2010). Asimismo, se ha observado que el deterioro del sabor de la cerveza depende, entre otros, de la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos que contiene (Walters, 1997). De hecho, se ha reportado que hasta un 80% de los fenoles presentes en la cerveza proceden de la malta de cebada y, el porcentaje restante, del lúpulo (Bvochora, 2005; Goupy et al., 1999; Gupta, 2010).

Se ha observado que cada familia fenólica puede tener una repercusión distinta sobre la cerveza. Por ejemplo, los ácidos hidroxicinámicos se consideran promotores fenólicos del sabor (Cai et al., 2015), pero a su vez pueden propiciar una reducción de la estabilidad de éste (Iyuke et al., 2008; Lentz, 2018). Por otro lado, los flavan-3-oles y las flavonas glicosiladas son conocidos por su implicación en la estabilidad del sabor, por aportar astringencia y por su actividad antioxidante (Aron y Shellhammer, 2010). De la misma manera, también se ha

reportado la acción protectora de los compuestos fenólicos durante la maceración y la cocción del mosto cervecero (Mikyška et al., 2002; Pejin et al., 2009), ambas etapas consideradas determinantes para la estabilidad del sabor de la cerveza (Noel et al., 1999). Una peculiaridad reportada por Luck et al. (1994) fue la astringencia asociada a los fenoles, ya que éstos tienden a interaccionar con el aminoácido prolina de las proteínas presentes en la saliva.

La mayoría de los trabajos que estudian la composición fenólica de la cebada y/o malta, como los autores mencionados en este apartado, se centran en el contenido total de fenoles determinado por medio del método Folin-Ciocalteu, siendo poca la información disponible sobre la variabilidad del perfil fenólico determinado por métodos analíticos que proporcionen información más detallada sobre los compuestos fenólicos individuales. Por ello, son pocos los estudios en detalle sobre el impacto del manejo del cultivo, de la implicación del proceso de malteado o de las condiciones climatológicas sobre el perfil fenólico.

2.4.4. IMPLICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

Las proteínas y sus derivados, como polipéptidos, péptidos y aminoácidos, tienen un papel fundamental en la calidad y estabilidad de la cerveza, puesto que son responsables de la nutrición y desarrollo de las levaduras, además de tener un impacto sobre el color de la cerveza, la formación de la espuma, la formación de turbios y sobre el desarrollo del sabor (Fontana y Buiatti, 2009).

Los aminoácidos son las moléculas de menor tamaño que se agrupan para formar las proteínas. Todos ellos parten de una estructura básica formada por un grupo amino y un grupo carboxilo, unidos a un carbono e hidrógeno central al cual se une un grupo o cadena radical (Figura 2.4). En la Tabla 2.5 se muestra la clasificación de los aminoácidos según el grupo radical y las características que aportan.

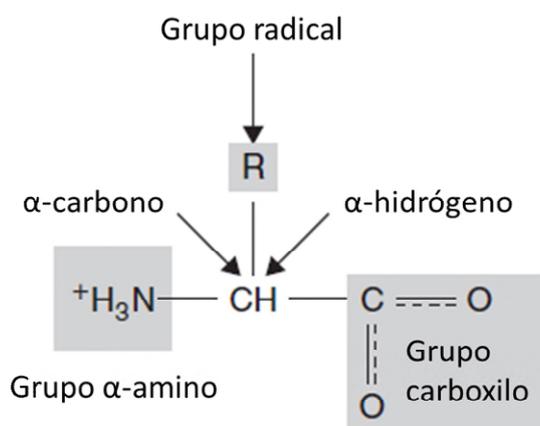


Figura 2.4. Estructura básica de los aminoácidos (fuente adaptada de Fontana y Buiatti (2009)).

Tabla 2.5. Aminoácidos clasificados según las características aportadas por el grupo radical que contienen (fuente adaptada de Fontana y Buiatti, 2009).

Característica del grupo radical	Aminoácidos
Ácido	Ácido aspártico y ácido glutámico
Alifático	Alanina, glicina, isoleucina, leucina, prolina y valina
Amínico	Asparagina y glutamina
Aromático	Fenilalanina, triptófano y tirosina
Básico	Arginina, histidina y lisina
Hidroxilo	Serina y treonina
Sulfuroso	Cistina y metionina

En la cebada, el contenido de compuestos nitrogenados varía según la variedad (Nie et al., 2010), el manejo y el año de cultivo (Agu y Palmer, 2003; Shrestha y Lindsey, 2019). Por ejemplo, una alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo o situaciones de estrés hídrico combinado con altas temperaturas, pueden aumentar el contenido proteico del grano de cebada. A pesar de que un exceso de proteína no interesa en cervecería, cebadas con alto contenido proteico producen mostos con un mayor contenido de nitrógeno soluble, FAN y péptidos, al contrario que las cebadas con un bajo contenido proteico, que resultan en mostos con un extracto rico en carbohidratos (Fontana y Buiatti, 2009). Dado que tanto el nitrógeno como los carbohidratos son imprescindibles en cervecería, se requieren cebadas con un contenido proteico moderado, para así obtener mostos con un extracto equilibrado entre ambas fracciones.

Durante el malteado, las proteínas de la cebada, mayormente presentes en el endospermo, se hidrolizan, por medio de la acción de proteasas, en polipéptidos, péptidos y aminoácidos y, aunque existe una pequeña pérdida durante el proceso, el contenido proteico de la malta es similar al de la cebada (Fontana y Buiatti, 2009). Nie et al. (2010) observaron que durante la germinación el contenido de arginina disminuía, produciendo NH_3 y CO_2 , moléculas que fomentan la formación de prolina. Además, durante el secado-tostado, el contenido de arginina volvía a aumentar dada su síntesis por medio del ácido aspártico y la citrulina, precursor sintetizado a partir del glutamato y la glutamina. Por lo que durante el proceso de malteado se producen cambios considerables sobre el perfil de aminoácidos final de la malta.

Si nos centramos en la elaboración de cerveza, la degradación de las proteínas continua durante la etapa de macerado (Fix, 2000), obteniéndose mostos ricos en aminoácidos libres necesarios que promoverán el crecimiento de la levadura y asegurarán una correcta fermentación (Gómez y Edney, 2011). Durante la etapa de fermentación, los aminoácidos son la principal fuente de nutrientes de la levadura (Heggart et al., 1999). Pueden clasificarse según su absorción como se lista en la **Tabla 2.6**, junto al rango de concentraciones típico en cerveza. El grupo A es absorbido rápidamente, durante las primeras 20h de fermentación, mientras que el grupo B es utilizado lentamente. En cambio, el grupo C no es absorbido por la levadura hasta que no se ha utilizado completamente el grupo A. Como peculiaridad, el grupo D no suele ser utilizado por la levadura puesto que no tiene grupo amino y no puede participar en las reacciones de transaminación, aunque si se dan condiciones anaeróbicas

puede ser utilizado lentamente (Dekonick et al., 2012; Fontana y Buiatti, 2009). En condiciones normales de fermentación, la levadura consume alrededor del 33.5% de los aminoácidos presentes en el mosto, mientras que un 16.5% es asimilado y excretados de nuevo en el mosto (Fix, 2000). Vesely et al. (2004) reportaron un mayor crecimiento de la levadura y un mayor descenso de aminoácidos al incrementar la temperatura de fermentación, por lo que la fermentación es una etapa que requiere un control exhaustivo con tal de obtener los resultados deseados.

Tabla 2.6. Clasificación de los aminoácidos según su absorción y uso por la levadura, así como su rango típico de concentración en cerveza (fuente adaptada de Fontana y Buiatti, 2009).

Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
Absorción rápida	mg/L	Absorción intermedia	mg/L	Absorción lenta	mg/L	No absorción o pequeña	mg/L
Ácido aspártico	16.7–82.4	Histidina	16.1–46.3	Alanina	28.2–206	Prolina	242–762
Ácido glutámico	17.3–76.3	Isoleucina	11.6–75.0	Fenilalanina	9.50–38.0		
Arginina	24.6–292	Leucina	23.5–159	Glicina	10.8–50.9		
Asparagina	1.00–15.7	Metionina	5.00–9.60	Tirosina	13.9–96.2		
Glutamina	5.80–17.5	Valina	21.6–150	Triptófano	4.50–19.9		
Lisina	16.4–47.1						
Serina	9.30–29.6						
Treonina	7.10–18.6						

Debe existir un equilibrio en las concentraciones de los diferentes aminoácidos, puesto que cada uno desempeña un papel importante en el metabolismo de la levadura. Por ejemplo, niveles bajos de lisina, histidina, arginina y leucina pueden causar cambios importantes en el metabolismo del nitrógeno, afectando la calidad final de la cerveza (Meilgaard, 1976). De la misma forma, debe existir un contenido suficiente de valina, glicina y tirosina, puesto que son considerados aminoácidos críticos por ser la principal fuente de esqueletos de carbono, u oxo-ácidos, para las levaduras. En la **Figura 2.5** se representa la síntesis de aminoácidos en el interior de las células de la levadura, dónde a partir de la desaminación de un aminoácido se obtiene un oxo-ácido, molécula que será receptora de un nuevo grupo amino para resultar en un nuevo aminoácido.

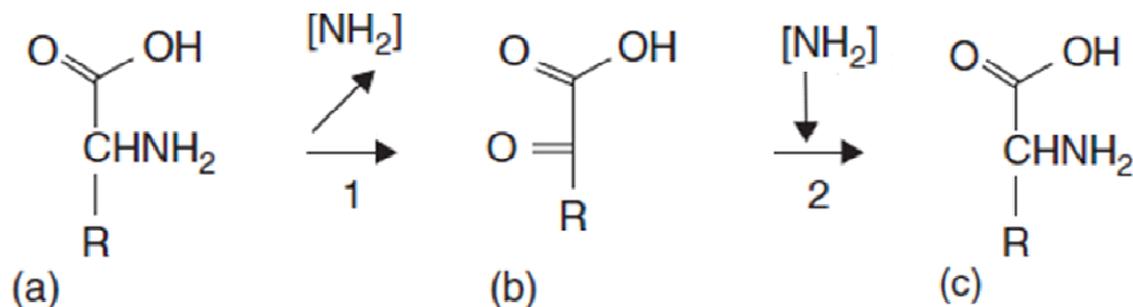


Figura 2.5. Proceso de síntesis endógena de aminoácidos por parte de la levadura. 1: acción de la enzima transaminasa, se obtiene un oxo-ácido (b) por transferencia del grupo amino (NH₂) del aminoácido (a) de origen; 2: acción de las transaminasas, síntesis de un nuevo aminoácido (c) por transferencia del grupo amino; R: grupo radical de cualquier aminoácido (fuente adaptada de Fontana y Buiatti (2009)).

La importancia de los aminoácidos ha sido estudiada por numerosos autores. Ferreira y Guido (2018) y Jones y Pierce (1964) han reportado la importancia de los aminoácidos isoleucina, valina, fenilalanina, glicina, alanina, tirosina, lisina, histidina, arginina y leucina en el mosto cervecero, ya que cambios en sus niveles puede afectar al metabolismo del nitrógeno. Almeida et al. (2004) observaron un efecto negativo sobre el sabor cuando se obtenían mosto con bajos niveles de nitrógeno. Concretamente si se da una deficiencia del aminoácido valina, la levadura se verá obligada a sintetizarlo *de novo*² y se producirá una acumulación de acetolactato, compuesto que produce diacetilo y que se correlaciona con defectos en el sabor de la cerveza (Pollock, 1981). Por otro lado, un aumento de las concentraciones de aminoácidos que contienen un grupo sulfuro, como es el caso de la cistina y metionina, propician la producción de compuestos volátiles sulfurosos por parte de la levadura que tendrán una implicación negativa sobre el sabor de la cerveza si se dan en exceso (Wainwright, 1971).

Otro de los papeles de los aminoácidos es su influencia en la calidad organoléptica de la cerveza. Por un lado, los aminoácidos intervienen en las reacciones de Maillard durante el secado-tostado de la malta y el cocimiento del mosto cervecero, generando melanoidinas que aportan color. Charalambous (1981) observó que la reacción de mayor importancia sobre el desarrollo de color se da durante el tostado de la malta entre el aminoácido prolina y el azúcar maltosa, originando maltol. Por tanto, el contenido de prolina en la malta y el mosto cervecero afectará positivamente al desarrollo de color de la cerveza final. Por otro lado, los compuestos nitrogenados pueden combinarse con polifenoles y formar complejos responsables de turbios en la cerveza, que no tan solo son percibidos como un defecto por parte de los consumidores, sino que también acortan la vida útil del producto (Fontana y Buiatti, 2009).

² *de novo*: síntesis de moléculas complejas a partir de moléculas simples.

Cabe destacar que cerca del 80% de los compuestos aromáticos de la cerveza se originan del metabolismo de la levadura durante la fermentación (Ferreira y Guido, 2018), donde los aminoácidos intervienen en la formación de alcoholes superiores y ésteres (Fontana y Buiatti, 2009), así como aldehídos a partir de la degradación de Strecker o de los compuestos originados en las reacciones de Maillard (Ferreira y Guido, 2018). Las implicaciones sobre las propiedades organolépticas de estos compuestos quedan expuestas en el apartado 2.5.3.

A modo resumen, en la **Figura 2.6** se observa cómo, desde la malta hasta la cerveza embotella, los aminoácidos intervienen en la formación de numerosos compuestos que aportan sabor, aroma y color a la cerveza resultante, así como influyen en su calidad. Por tanto, la presencia de aminoácidos en el mosto cervecero y en la cerveza depende del contenido de partida de la malta como materia prima y de las condiciones de proceso empleadas para elaborarla (Fontana y Buiatti, 2009). Por ello es importante conocer las variables que pueden inducir variaciones en su contenido.

MALTEADO, MACERADO Y COCIMIENTO

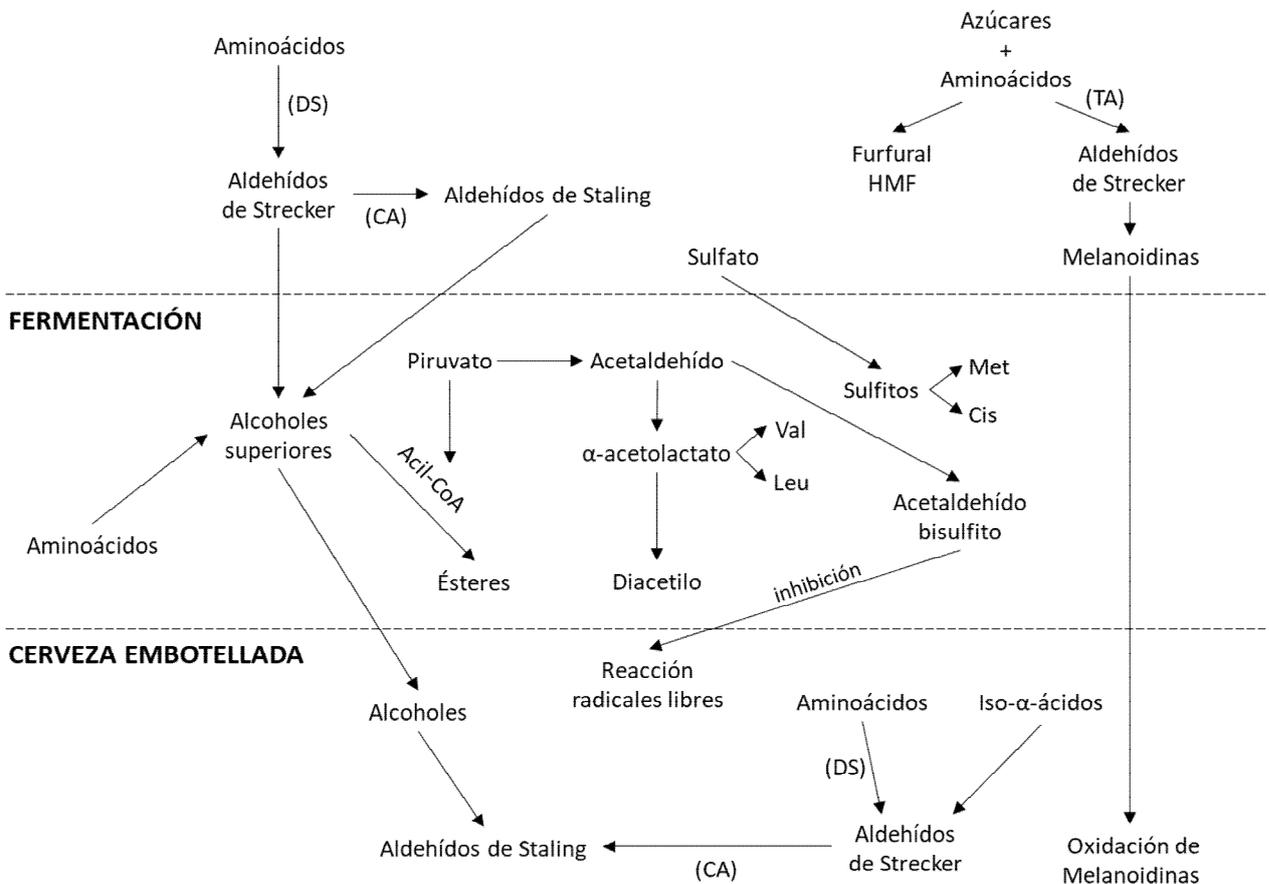


Figura 2.6. Esquema a modo resumen de la implicación de los aminoácidos en el desarrollo de compuestos aromáticos, desde el malteado hasta la cerveza embotellada. DS: degradación de Strecker; CA: condensación aldólica; TA: transposición de Amadori; Met: metionina; Cis: cistina; Val: valina; Leu: leucina; HMF: aldehído hidroximetilfurfural (fuente adaptada de Ferreira y Guido (2018)).

2.4.5. COMPUESTOS AROMÁTICOS VOLÁTILES

En la cerveza se han identificado más de 200 compuestos que intervienen en el sabor, varios de ellos son compuestos resultantes del metabolismo de la levadura como los alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos y compuestos sulfurados (James y Stahl, 2014).

2.4.5.1 ALCOHOLES SUPERIORES

Los alcoholes superiores son compuestos volátiles producto del metabolismo secundario de la levadura (Loviso y Libkind, 2019). En la cerveza se pueden encontrar aproximadamente 40 alcoholes superiores distintos que se dividen en dos grupos: alcoholes alifáticos, los cuales aportan aroma alcohólico y a disolvente, y alcoholes aromáticos, pueden aportar desde sabores dulces a desagradables (Ferreira y Guido, 2018). Su síntesis se da a partir de la incorporación de aminoácidos a la levadura y al metabolismo de éstos, ya sea por medio de la vía catabólica Ehrlich o por la biosíntesis de aminoácidos mediante la incorporación de los oxo-ácidos a la vía Ehrlich (Loviso y Libkind, 2019).

En la **Figura 2.7** se han representado las principales rutas de síntesis de los alcoholes superiores durante el metabolismo de la levadura. Como se observa, ciertos aminoácidos son incorporados a la célula por medio de proteínas transportadoras presentes en la membrana plasmática. Una vez en el interior, pueden ser catabolizados por distintas enzimas aminotransferasas que iniciarán la vía Ehrlich, donde participarán enzimas transaminasas, descarboxilasas y alcohol deshidrogenasas (Loviso y Libkind, 2019). A esta ruta también se pueden añadir aminoácidos y oxo-ácidos sintetizados *de novo* en el interior de la célula (Hammond, 1993). El modo por el cual estos compuestos generados se liberan al mosto es aún desconocido, aunque todo indica que sería por difusión pasiva a través de la membrana plasmática (Lipinski et al., 2001).

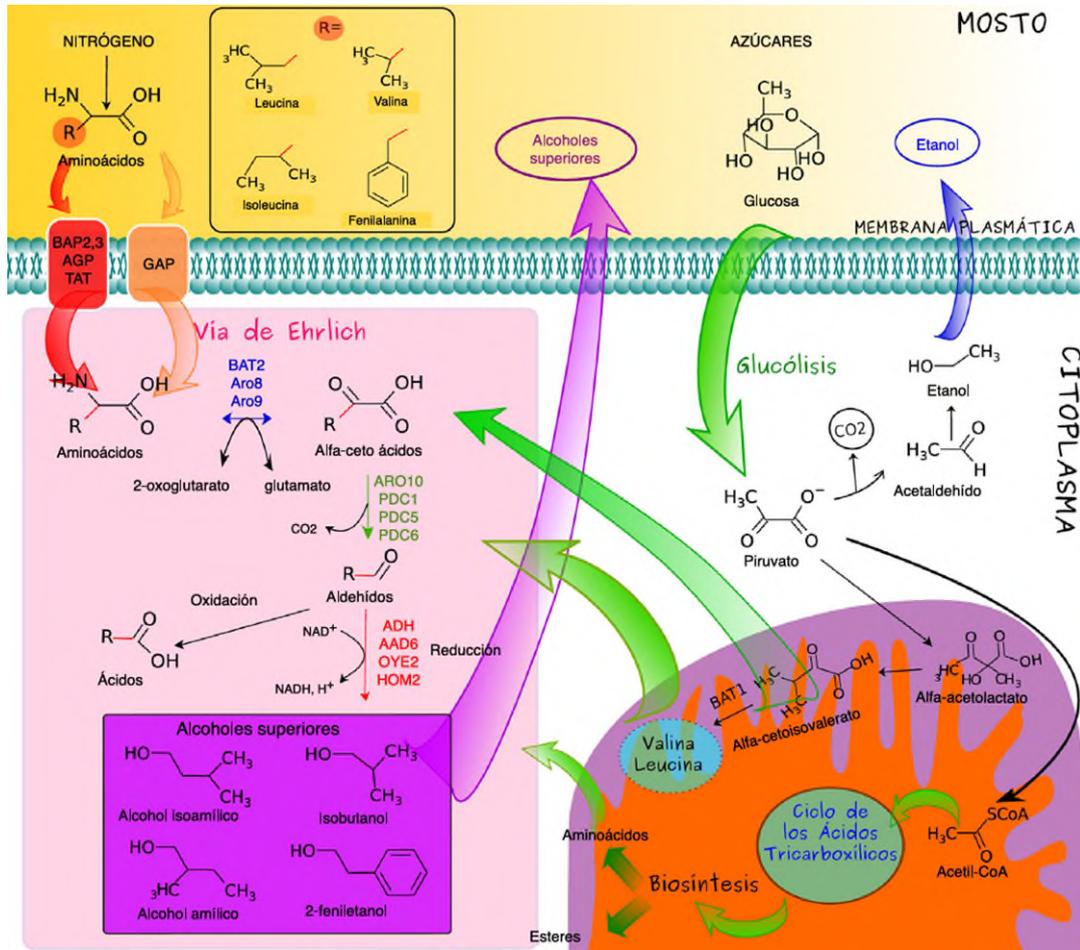


Figura 2.7. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de alcoholes superiores por parte de la levadura. BAP2,3, AGP, TAT y GAP: proteínas transportadoras de aminoácidos en la membrana plasmática; flecha azul: acción de enzimas aminotransferasas; flecha verde: acción de enzimas descarboxilasas; flecha roja: acción de enzimas deshidrogenasas (fuente de Loviso y Libkind (2019)).

Es necesario comprender los factores que se ven involucrados en la síntesis de alcoholes superiores, porque a pesar de haberse detectado una implicación positiva y/o negativa sobre el sabor dependiendo de su concentración, lo más probable es que aporten un efecto negativo sobre éste (Loviso y Libkind, 2019; Olaniran et al., 2017). Concentraciones por encima de los 300 mg/L en cerveza pueden generar un sabor a disolvente, creando una sensación desagradable de calentamiento en boca (Hirst y Richter, 2016). En la **Tabla 2.7** se han relacionado los alcoholes superiores con mayor repercusión con el aminoácido de origen y el aroma/sabor que aporta. Por lo que, mostos con concentraciones altas de estos aminoácidos, posiblemente generen cervezas con altas concentraciones de sus respectivos alcoholes superiores (James y Stahl, 2014). Otros factores que influyen son la presencia de oxígeno, niveles altos de ácidos grasos insaturados, temperaturas levemente elevadas o mostos con un extracto de nutrientes alto. Todos estos factores pueden estimular el crecimiento de la levadura y, por ende, aumentar el metabolismo de los aminoácidos y la biosíntesis de alcoholes superiores, entre otros compuestos volátiles (Lodolo et al., 2008; Loviso y Libkind, 2019).

Tabla 2.7. Relación entre los principales alcoholes superiores y su aminoácido de origen, así como el rango de concentración (mg/L) y aroma/sabor que aportan a la cerveza (fuente adaptada de Buiatti (2009), James y Stahl (2014) y Pires et al. (2014)).

Aminoácido	Alcohol superior	mg/L	Aroma/sabor
Alanina	Etanol	20,000–80,000	Alcohol
Fenilalanina	2-Feniletanol	8.00–35.0	Rosa, perfume
Isoleucina	Alcohol amilo	50.0–70.0	Alcohol, vino
	2-metilbutanol	8.00–30.0	Alcohol
Leucina	Alcohol isoamilo	50.0–65.0	Astringente, solvente
	3-metilbutanol	30.0–70.0	Pungente, solvente
Metionina	Metionol	0.001–0.003	Vegetal cocido
Tirosina	Tirosol	3.00–40.0	Astringente
Treonina	Propanol	4.00–17.0	Alcohol
Triptófano	Triptofol	0.40–5.40	Almendras
Valina	2-metilpropanal	4.00–57.0	Alcohol
	Isobutanol	4.00–57.0	Solvente

Cabe destacar que los alcoholes superiores no solo tienen una implicación sobre el aroma y sabor, sino que a través de su biosíntesis se generan otros compuestos como los ésteres, considerados también un grupo con gran impacto sobre la calidad organoléptica de la cerveza (Ferreira y Guido, 2018).

2.5.5.2 ÉSTERES

Los ésteres son el grupo más amplio de compuestos involucrados en el aroma y el sabor. En general son compuestos deseados en la cerveza final, aunque su exceso puede producir sensaciones desagradables en boca (Guido et al., 2004). Se producen durante la fermentación primaria por condensación química enzimática de los ácidos orgánicos y alcoholes (Pires et al., 2014). Más concretamente, su síntesis se encuentra altamente asociada al metabolismo de los lípidos (Loviso y Libkind, 2018). En la **Figura 2.8** podemos observar cómo los ésteres son sintetizados en el citoplasma de las células de la levadura por medio de enzimas éster sintasas y el cosustrato acil-CoA. En presencia de oxígeno el acil-CoA reaccionará preferiblemente con etanol, formando ésteres de etilo. En cambio, en ausencia de oxígeno, las moléculas de acetil-CoA reaccionarán con alcoholes superiores o etanol, formando ésteres de acetato (Loviso y Libkind, 2018; Procopio et al., 2011). Dado el carácter lipofílico de los ésteres, pueden difundir a través de la membrana plasmática y ser liberados al mosto cervecero (Loviso y Libkind, 2018). En la **Tabla 2.8** se muestran los ésteres de mayor repercusión sobre las características organolépticas de la cerveza, así como el rango de concentración típica en cerveza y el aroma/sabor al cual se asocian.

Teniendo en cuenta que la síntesis de ésteres se ve asociada al metabolismo lipídico, el contenido de lípidos y ácidos grasos en el mosto puede afectar a la concentración de ésteres en la cerveza final (He et al., 2014). Saerens et al. (2008) observó una disminución de la síntesis de ésteres frente un aumento de los niveles de ácidos grasos insaturados. Por otro lado, la formación de ésteres se puede reducir al aumentar la oxigenación del mosto, puesto que frente un exceso de oxígeno se ve aumentado el crecimiento de las células de levadura y, por tanto, las moléculas de acetil-CoA se destinan prioritariamente hacia el crecimiento celular y la síntesis de lípidos (Guido et al., 2004).

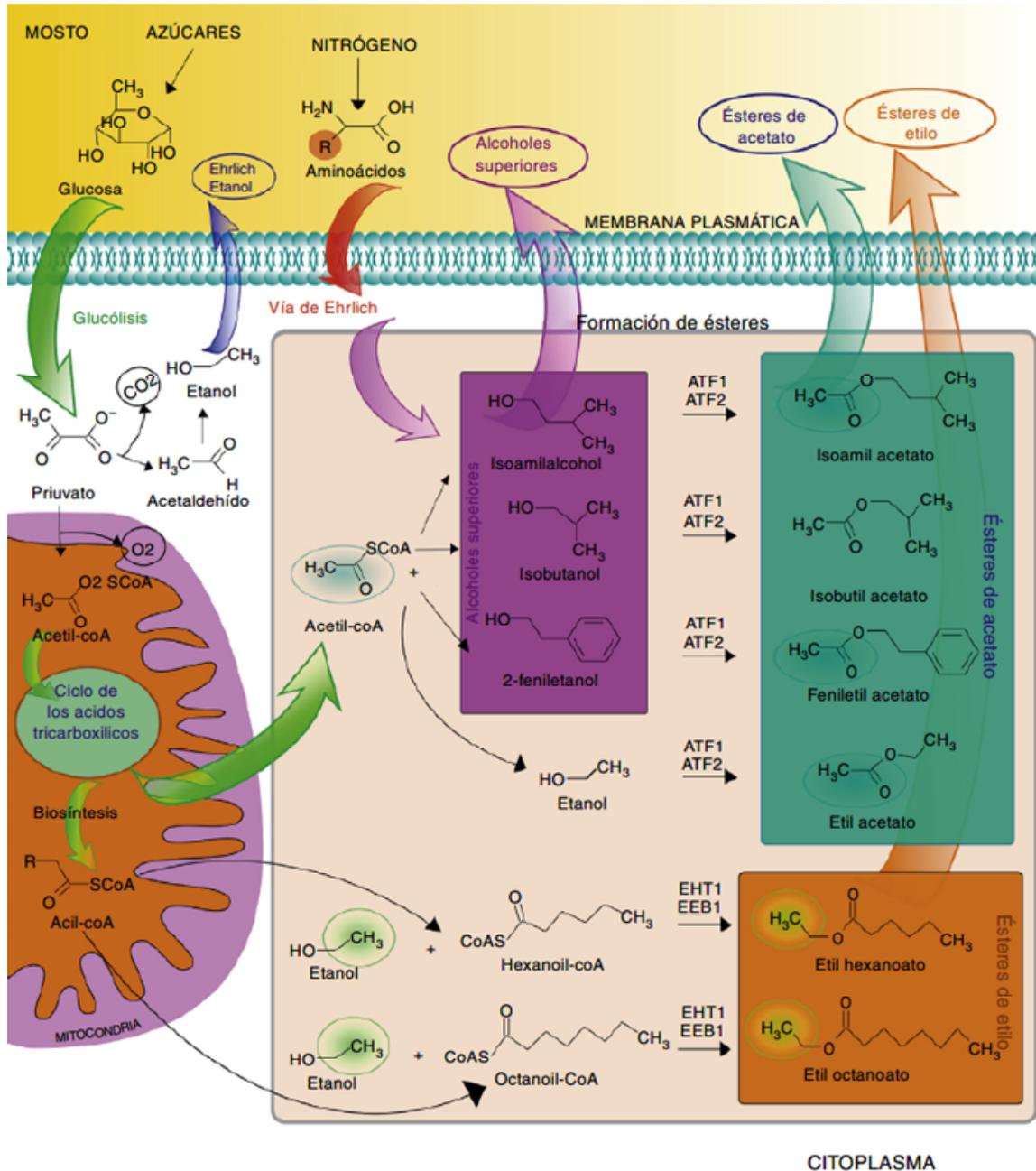


Figura 2.8. Esquema de las principales rutas de biosíntesis de ésteres por parte de la levadura (fuente de Loviso y Libkind (2018)).

La composición del mosto juega un papel clave e influye directamente sobre la formación de estos compuestos. La cantidad y tipología de azúcares (Younis y Stewart, 1998), los niveles de nitrógeno (Thompson-Witrick y Pitts, 2020), la temperatura de fermentación (Saerens et al., 2008) y el dióxido de carbono disuelto (Titica et al., 2000) son ejemplo de factores con repercusión directa.

Tabla 2.8. Ésteres con mayor impacto sobre el aroma y sabor de la cerveza, así como su rango de concentraciones en cerveza (fuente adaptada de Loviso y Libkind (2018), Olaniran et al. (2017) y Pires et al. (2014)).

Éster	mg/L	Descripción aromática
Acetato etilo	8.00–30.0	Solvente, afrutado
Acetato feniletilo	0.10–0.70	Rosas, miel, manzana
Acetato isoamilo	0.30–3.80	Banana, manzana, solvente
Acetato isobutilo	0.01–0.50	Afrutado
Caproato etilo	0.40–2.80	Manzana ácida
Caprilato etilo	0.01–0.15	Manzana ácida
Hexanoato etilo	0.05–0.21	Manzana, anisado
Octanoato etilo	0.04–0.53	Manzana, pera, banana, floral, afrutado

Los ésteres, a pesar de ser unos compuestos volátiles que aportan características organolépticas interesantes a la cerveza, son moléculas que pueden tener un efecto sinérgico entre ellos e influir negativamente en la percepción sensorial del producto, por ello es importante mantener sus niveles dentro de unos límites de confianza (Verstrepen et al., 2003). Conocer qué variables pueden provocar desequilibrios en sus concentraciones puede permitir elaborar un producto con propiedades organolépticas equilibradas y estables.

2.5.5.3 OTROS COMPUESTOS

Existen otros compuestos con implicación sobre las características organolépticas de la cerveza, como por ejemplo los compuestos carbonílicos, las cetonas vecinales y los compuestos sulfurados.

Por un lado, los compuestos carbonílicos, o aldehídos, están presentes en concentraciones relativamente bajas y se forman durante la elaboración del mosto cervecero como consecuencia de las reacciones de Maillard y de la oxidación lipídica, además forman parte de la vía anabólica y catabólica para la síntesis de los alcoholes superiores durante la fermentación (Kobayasi et al., 2008; Olaniran et al., 2017). El mayor compuesto carbonílico presenta en la cerveza es el acetaldehído, molécula intermediaria en la formación de etanol y acetato (Olaniran et al., 2017).

Respecto las cetonas vecinales (VDK), se forman durante la ruta anabólica de biosíntesis de los aminoácidos isoleucina y valina durante la fermentación. Se ha observado que mostos con un alto contenido de FAN, pueden propiciar la formación de VDK y verse afectada la estabilidad del sabor de la cerveza resultante (Krogerus y Gibson, 2013). La eliminación de estos compuestos puede darse al final de la fermentación, ya que son reabsorbidos y reducidos por

parte de la levadura (Olaniran et al., 2107). Pero también pueden sintetizarse durante la etapa de maduración de la cerveza (Ferreira y Guido, 2018).

Por último, los compuestos sulfurosos, los cuales se forman a partir de iones sulfato, sulfito y sulfuro disponibles en el mosto cervecero (James y Stahl, 2014), son esenciales durante el metabolismo de la levadura para la formación de aminoácidos, proteínas y coenzimas (Ferreira y Guido, 2018). Por tanto, su formación se da durante la fermentación a través del metabolismo de la levadura (Ferreira y Guido, 2018). Organolépticamente, los consumidores son muy sensibles a la presencia de estos compuestos, puesto que aportan aromas y sabores indeseables, hecho que propicia que en cervecería sea preferible trabajar con bajas concentraciones.

En la **Tabla 2.9** se muestran los principales compuestos carbonílicos, cetonas vecinales y compuestos sulfurosos comentados anteriormente, así como el rango de concentración típica en la cerveza y el aroma/sabor que aportan.

Tabla 2.9. Otros compuestos con implicación en el aroma y sabor de la cerveza, rango de concentración y aroma/sabor que aportan (fuente adaptada de Ferreira y Guido (2018) y Olaniran et al. (2017)).

Compuesto	mg/L	Aroma/sabor
Acetaldehído	10.0–20.0	Herbáceo
Diacetilo	0.10–0.40	Mantequilla
Pentanodiona	0.15–1.00	Miel, caramelo
Sulfito	1.00–10.0	Pungente
Sulfuro de hidrógeno	0.001–0.008	Huevo podrido
Sulfuro de dimetilo (DMS)	0.001–0.030	Vegetales cocidos

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

La **hipótesis** de partida de esta Tesis doctoral es que la variedad de cebada, la zona de cultivo y el manejo de éste, influyen en las propiedades del grano de cebada, la calidad de la malta de cebada y del mosto cervecero, así como en los compuestos aromáticos de la cerveza resultante.

Esta Tesis doctoral forma parte del programa de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, destinado a estudiar la influencia agroclimática desde la cebada hasta la cerveza final. Para alcanzar esta meta, se definieron los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Desarrollar y evaluar un método alternativo de micro-malteado que simule con mayor precisión la calidad de la malta obtenida a escala industrial.
- II. Evaluar la efectividad de un nuevo método para la elaboración de cerveza a pequeña escala.
- III. Evaluar el efecto de la fertilización nitrogenada sobre los parámetros que intervienen en el aroma y sabor de la cerveza.
- IV. Determinar y caracterizar los efectos genotípicos, ambientales e industriales sobre los compuestos aromáticos de la cerveza.

También se definieron los siguientes **objetivos secundarios**:

- I. Determinar el perfil fenólico de las muestras de cebada y sus maltas como compuestos implicados en la formación de aromas en la cerveza.
- II. Determinar el perfil de aminoácidos de las muestras de cebada y sus maltas como moléculas imprescindibles para la fermentación del mosto y formación de aromas en la cerveza.
- III. Determinar el perfil de compuestos aromáticos de las muestras de mosto cervecero y cerveza final.

PLAN DE TRABAJO



4. PLAN DE TRABAJO

Las diferentes actividades y su organización a lo largo de los cuatro años académicos fue la siguiente:

2019 – 2020	2020 – 2021	2021 – 2022	2022 – 2023
Actividad 1 Ensayos agronómicos de 6 variedades en 4 localidades	Actividad 1 Ensayos agronómicos de 6 variedades en 4 localidades		
Actividad 2 Ensayos de fertilización de 6 variedades bajo 2 condiciones nitrogenadas en 1 localidad	Actividad 2 Ensayos de fertilización de 6 variedades bajo 2 condiciones nitrogenadas en 1 localidad		
Actividad 3 Evaluación método alternativo de micro-malteado			
Actividad 4 Micro-malteado de la primera campaña de cultivo	Actividad 4 Micro-malteado de la segunda campaña de cultivo		
	Actividad 5 Evaluación método PicoBrew para la elaboración de cerveza a pequeña escala		
	Actividad 6 Elaboración de cerveza con muestras de la primera campaña de cultivo	Actividad 9 Elaboración de cerveza con muestras de la segunda campaña de cultivo	
	Actividad 7 Análisis fisicoquímicos de cebadas	Actividad 10 Análisis fisicoquímicos de malta	
		Actividad 11 Análisis fisicoquímicos de cervezas	
	Actividad 8 Tratamiento estadístico de datos	Actividad 12 Tratamiento estadístico de datos, análisis e interpretación de resultados y redacción de documentos	Actividad 12 Tratamiento estadístico de datos, análisis e interpretación de resultados y redacción de documentos

MATERIALES Y MÉTODOS



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1. CEBADA

Se utilizaron seis variedades de cebada de primavera, de dos carreras y de uso comercial en maltería: Basic (20110588, Ramón Camarasa S.L.), Pewter (20000894, Ramón Camarasa), Planet (20141230, Ramón Camarasa S.L.), Shakira (20061253, Ramón Camarasa S.L.), Shuffle (20102219, Agricultores unidos S.A.) y Traveler (20110589, Ramón Camarasa S.L.).

Las muestras de cebada, una vez cosechadas, fueron limpiadas y calibradas (> 2.5 mm) con una limpiadora de cereal SLN Rationel (Pfeuffer, Kitzingen, Alemania) en las instalaciones de Semillas Batlle (Bell-lloc d'Urgell, Catalunya, España) (<https://semillasbatlle.com/>). Éstas se conservaron etiquetadas según variedad × localidad × año en una cámara de frío a 4° C y a oscuras hasta su uso. Se reservaron 500 g envasados al vacío para los análisis fisicoquímicos.

5.1.2. ENSAYOS

Se realizaron dos ensayos de cultivo: uno con el fin de evaluar agronómicamente las variedades de cebada y la repercusión sobre la calidad maltera y cervecera, y otro para evaluar la implicación del tratamiento nitrogenado sobre la calidad.

5.1.2.1. EVALUACIÓN AGRONÓMICA

Cada variedad se cultivó en cuatro localidades del Valle del Ebro: Bell-lloc d'Urgell (Lleida, Catalunya, España), Sádaba (Zaragoza, Aragón, España), Saganta (Huesca, Aragón, España) y Sariñena (Huesca, Aragón, España). Los cultivos se realizaron durante dos años consecutivos: 2017-2018 y 2018-2019.

La dosis de siembra en todas las zonas de cultivo fue de 350 semillas/m² mediante una sembradora convencional. Las malas hierbas, enfermedades e insectos se controlaron, en caso de ser necesario, mediante la pulverización de herbicidas, fungicidas e insecticidas según las recomendaciones de sus fabricantes. Los tamaños de las parcelas y las fechas de siembra quedan recogidos en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Tamaños de las parcelas y fechas de siembra de cada año de cultivo y zona de cultivo estudiada.

Zona de cultivo	Tamaño parcelas	Fecha de siembra 2017-2018	Fecha de siembra 2018-2019
Bell-lloc d'Urgell	10 m × 1.2 m	28/11/2017	20/12/2018
Sádaba	10 m × 1.5 m	14/11/2017	27/12/2018
Saganta	20 m × 6 m	05/01/2018	29/01/2019
Sariñena	12.5 m × 1.2 m	21/12/2017	28/11/2018

Puesto que en cada zona de cultivo el manejo fue distinto, se va a considerar Bell-lloc d'Urgell como cultivo de regadío, Sádaba como cultivo de secano húmedo fresco, y por último Saganta y Sariñena como cultivos de secano.

5.1.2.2. *TRATAMIENTO NITROGENADO*

En la localidad de Bell-lloc d'Urgell, se llevó a cabo un ensayo con dos condiciones diferentes de fertilización con nitrógeno: N₀ (0 kg/ha) y N₁₅₀ (150 kg/ha). La fertilización nitrogenada se realizó con urea (nitrógeno 46%) en la fase de elongación del tallo (DC 31, Zadoks et al. 1974). El contenido inicial de nitrógeno en el suelo fue de 9.3 ppm en 2018 y de 20.6 ppm en 2019 a aproximadamente 1 m de profundidad y se aplicó una irrigación de aproximadamente 60 mm durante la pre-antesis en ambos años de cultivo. Los tratamientos se dispusieron en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Los granos de estas tres réplicas se agruparon para realizar de forma unificada tanto los análisis químicos como el micro-malteado.

5.1.3. *CONDICIONES CLIMATOLÓGICAS*

Se han registrado los valores de temperatura mensual media (° C), radiación mensual media (MJ/m²) y precipitación mensual (mm), siendo la suma diaria para cada mes, entre los meses de noviembre y junio de 2017-2018, para la primera campaña de estudio, y 2018-2019 para la segunda. Para los cultivos de Bell-lloc d'Urgell se consultaron los datos diarios en la base de datos AEMET OpenData de la estación meteorológica de Lleida. Los datos de la estación meteorológica de Sádaba, para los cultivos de Sádaba, de la estación meteorológica de Tamarite de Litera, para los cultivos de Saganta y de la estación meteorológica de Sariñena, para los cultivos de Sariñena, fueron proporcionados por la Oficina del Regante, (Sociedad Aragonesa de Gestión Agroambiental, S.L.U. (SARGA)). Los datos quedan recogidos en la **Figura 10.1 – 10.3** en el apartado Anejo.

5.1.4. *ESQUEMA DE MUESTRAS*

Con el fin de facilitar la comprensión del diseño de esta Tesis, en la **Figura 5.1** se presenta el siguiente esquema de muestras:

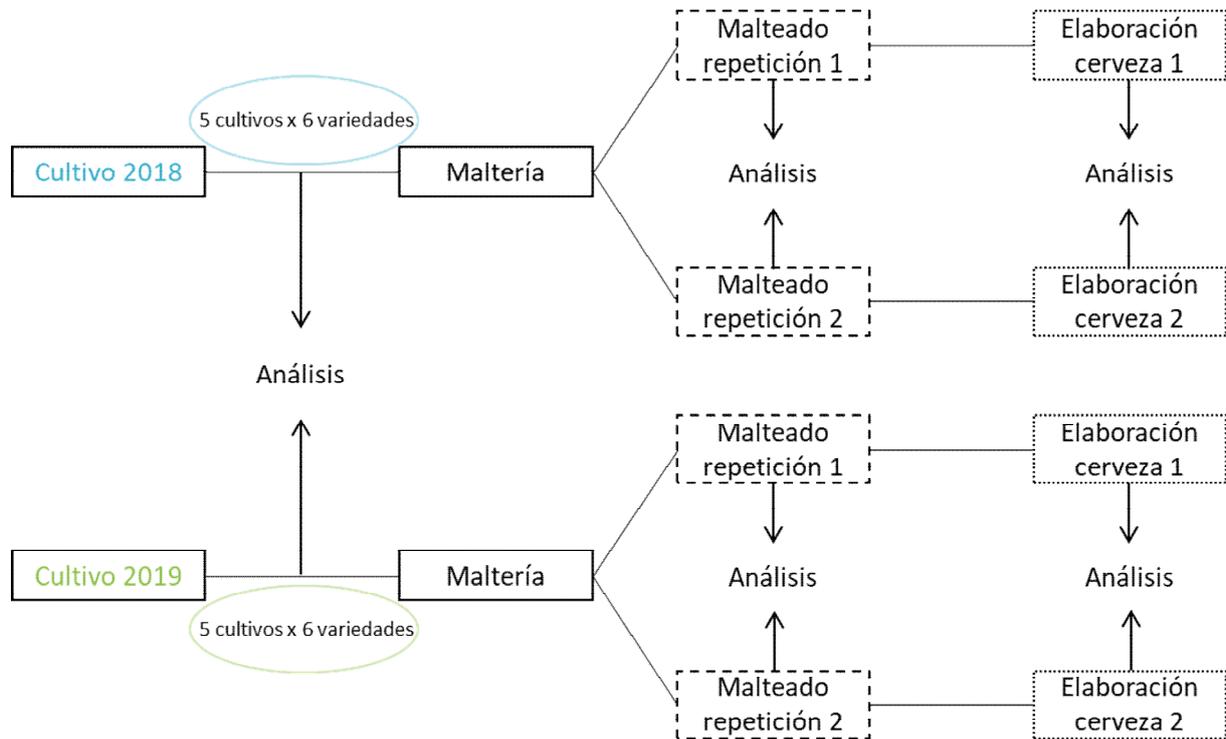


Figura 5.1. Esquema de las muestras obtenidas en cada año de cultivo estudiado y puntos de análisis.

5.2. OBTENCIÓN DE LA MALTA

5.2.1. MALTEADO A ESCALA INDUSTRIAL

El malteado a escala industrial se llevó a cabo en las instalaciones de la Maltería La Moravia. Los principales equipos son 10 tanques de remojo troncocónicos de 46 t de capacidad y 6 cajas de germinación tipo saladín de 50 × 9 × 1.5 m, donde se realiza tanto la germinación como el secado-tostado (**Figura 5.2**). Una vez secada la malta, se realizó la desgerminación por fricción utilizando el equipo Schmidt-Seeger MES63-400.

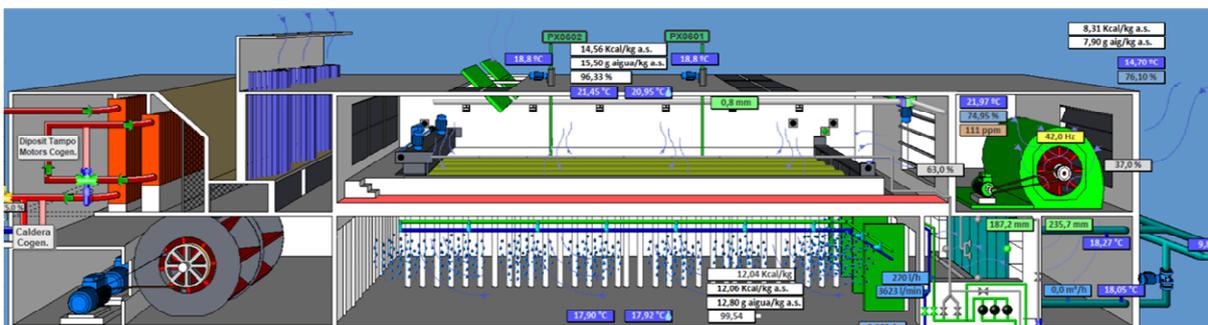


Figura 5.2. Instalaciones de la Maltería La Moravia (Bell-lloc d'Urgell, Lleida, Catalunya, España).

El remojo se realiza bajo dos condiciones, con agua y seco. Durante el periodo con agua, la cebada se mantiene sumergida en agua en las tinas de remojo con aireación vigorosa, lo que provoca un borboteo constante, tal y como se aprecia en la **Figura 5.2**. Durante el periodo seco se retira el agua y se aspiran los gases por la parte inferior del cono de las tinas, extrayendo así el dióxido de carbono que produce la cebada durante la respiración. Alcanzada

la humedad próxima al 40% se traslada el grano a la caja de germinación, en donde se inyecta aire húmedo a la temperatura deseada por la parte inferior de la caja, atravesando todo el lecho de malta verde para asegurar un correcto aporte de oxígeno y un ajuste de temperatura y humedad. Además, las cajas de germinación cuentan con unos removedores de tipo helicoidal que remueven la malta verde para que no se apelmace. Estos removedores tardan 2 horas en ir de un extremo a otro de la caja de germinación y se realizan removidos, aproximadamente, cada 8 horas. Cuando el grano ha germinado se detiene su actividad biológica mediante el secado-tostado, inyectando aire caliente por la parte inferior desde el final de la sala, atravesando todo el lecho de malta verde para asegurar la deshidratación y el desarrollo de productos de interés. En la **Figura 5.3** se presenta un esquema de las cajas de germinación y los flujos de aire según si es la etapa de germinación o secado-tostado.

Durante la germinación



Durante el secado-tostado

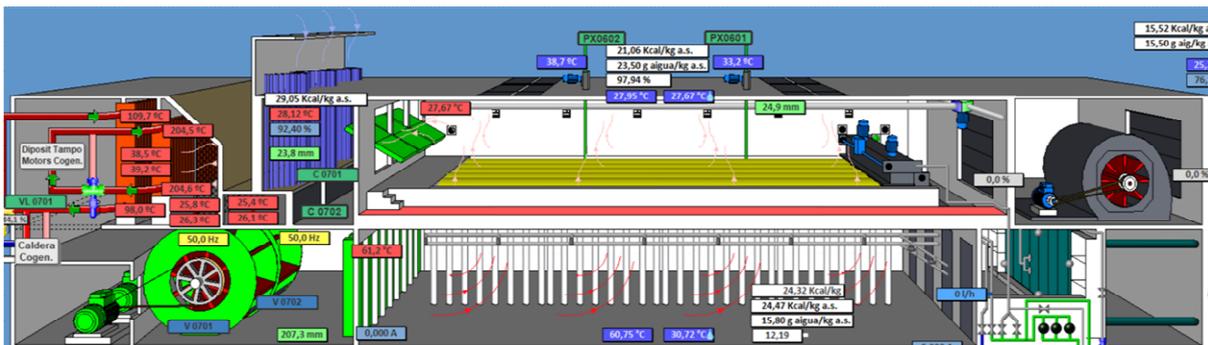


Figura 5.3. SCADA de las cajas de germinación de la Maltería La Moravia. En el esquema superior se ve representado el flujo de aire durante la germinación, inyectando aire humectado desde la parte inferior del inicio de la caja. En el esquema inferior representa el secado-tostado, dónde la inyección de aire caliente seco se da por la parte inferior del final de la caja (imágenes cortesía de Maltería La Moravia).

En 2018 se realizó un estudio preliminar para evaluar la viabilidad del método, comparando los tres métodos de malteado descritos en este trabajo (apartado 5.2.1, 5.2.2 y 5.2.3). En ese caso las condiciones del malteado fueron las descritas en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Condiciones del malteado industrial realizado en 2018 en las instalaciones de la Maltería La Moravia.

Remojo	Germinación	Secado-tostado
16 h a 15° C (6 h en agua, 9 h en seco y 1 h en agua)	112 h 15° C	21.5 h (1 h a 50° C, 3 h a 55° C, 11 h a 62° C, 2 h a 65° C, 2 h a 72° C y 2.5 h a 85° C)

h: horas.

5.2.2. MICRO-MALTEADO A ESCALA PLANTA PILOTO

Se utilizaron 100 g de cebada limpia y calibrada (> 2.5 mm) y se empleó un equipo Seeger de 1961, situado en la Maltería La Moravia, que constaba de 3 equipos: equipo nº 1 para el remojo, equipo nº 2 para la germinación y equipo nº 3 para el secado-tostado. Las condiciones de malteado se describen en la **Tabla 5.3**. En la **Figura 5.4** se muestran los equipos, así como su la pantalla de control y configuración de las condiciones de cada equipo. Las muestras de malta se desgerminaron a mano.

Tabla 5.3. Condiciones de micro-malteado en los equipos de la planta piloto realizado en 2018.

Remojo	Germinación	Secado-tostado
26 h a 15° C (11 h en agua, 2 h en seco, 7 h en agua, 2 h en seco, 2 h en agua y 2 h en seco)	120 h 15° C	24 h (3 h a 50° C, 16 h a 60° C, 2 h a 68° C y 3 h a 88° C)

h: horas.

**Figura 5.4.** Equipo de micro-malteado a escala planta piloto y SCADA de control situada en las instalaciones de la Maltería La Moravia.

5.2.3. MICRO-MALTEADO POR MEDIO DE BOLSAS DE MALLA

De cada combinación variedad × localidad × año se realizaron dos réplicas de malteado, cada una en una caja de germinación distinta. Se necesitaron 4 kg de cebada de cada muestra y bolsas de 42 × 60 cm de monofilamento de polietileno de color amarillo con cordones para anudar. Como se observa en la **Figura 5.5**, las bolsas se sumergieron en los tanques de remojo junto al lote industrial y, a continuación, se enterraron en la caja de germinación para germinar y realizar el secado-tostado. Las muestras de malta final se desgerminaron a mano, se envasaron al vacío y se guardaron en una cámara a 4° C hasta su utilización. Se reservaron 500 g de cada muestra, en bolsas al vacío, para los análisis fisicoquímicos.

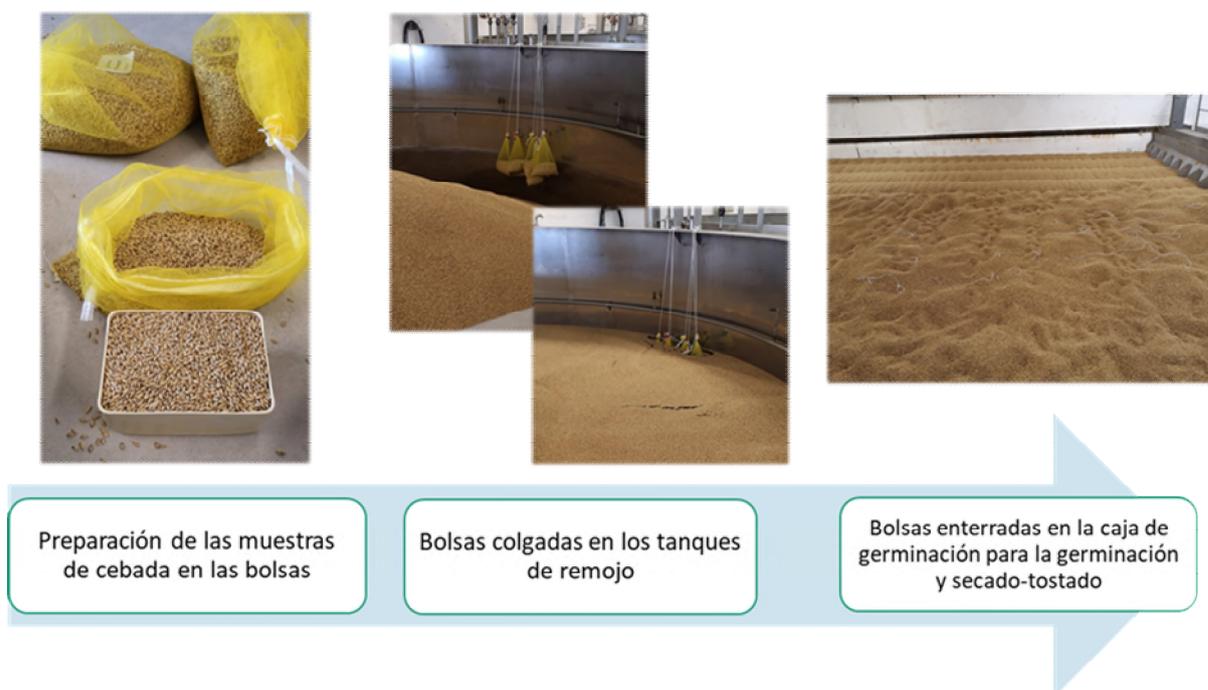


Figura 5.5. Micro-malteado en bolsas de malla en las instalaciones industriales de la Maltería La Moravia.

Para evitar al máximo posibles errores propiciados por la disposición de las bolsas en las cajas de germinación, el micro-malteado se llevó a cabo en un diseño de cuadrado latino con tres repeticiones en el estudio desarrollado en 2018 y en un diseño de bloques al azar con dos repeticiones en los estudios de 2019 y 2020, disponiendo cada réplica en una caja de germinación distinta. Se aleatorizó la situación de las variedades a lo largo de la caja, y las localidades a lo ancho. Las posiciones de enterramiento en 2018 quedan representadas en la **Figura 5.6**, así como las del micro-malteado en 2019 (**Figura 5.7**) y las del 2020 (**Figura 5.8**). Cabe destacar, que al enterrar las bolsas en la caja de germinación se debía tener en cuenta los removidos programados, ya que era necesario desenterrar las bolsas previamente a su paso, para no perder la muestra, y enterrarlas de nuevo. Cada 8 horas se desenterraban las bolsas de un extremo de la caja y se enterraban en el otro, preservando el orden establecido para cada variedad. Este procedimiento se realizó un total de 15 veces en cada caja utilizada. En la **Figura 5.7** se ha mostrado a modo de ejemplo el movimiento de las bolsas tras cada paso del removedor.

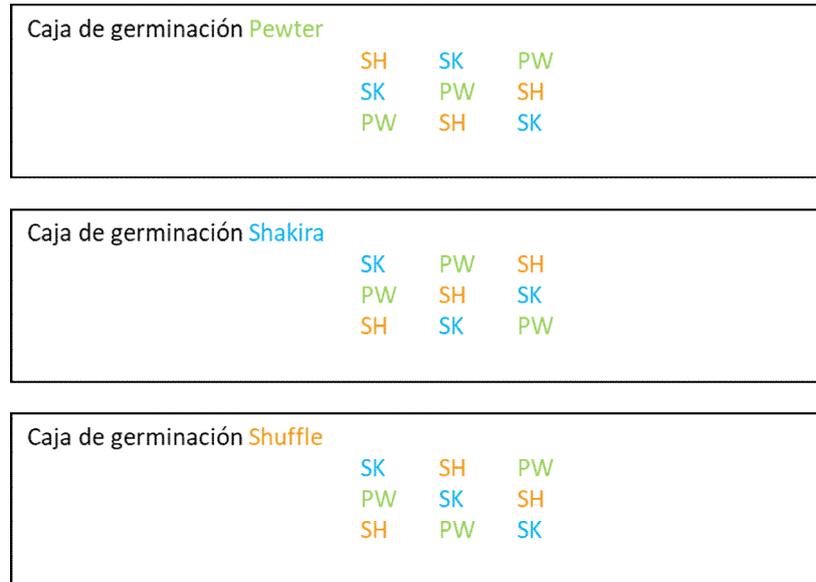


Figura 5.6. Disposición de las bolsas de malla en 2018 durante la germinación y secado-tostado. PW: Pewter; SK: Shakira; SH: Shuffle. Cada caja de germinación hace referencia a una réplica de malteado, donde cada variedad tuvo tres repeticiones.

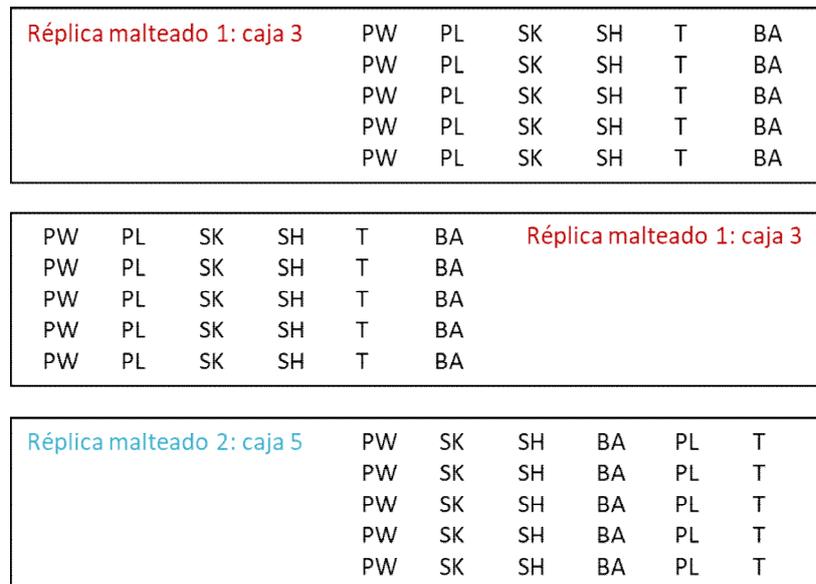


Figura 5.7. Disposición de las bolsas de malla en 2019 durante la germinación y secado-tostado. En la primera y segunda imagen de la réplica malteado 1, se representa el movimiento de las bolsas de malla tras cada removido. Cada caja de germinación hace referencia a una réplica de malteado. Las localidades se disponían a lo ancho para cada variedad. BA: Basic; PW: Pewter; PL: Planet; SK: Shakira; SH: Shuffle; T: Traveler.

Réplica malteado 1: caja 2	BA	PW	PL	T	SH	SK
	BA	PW	PL	T	SH	SK
	BA	PW	PL	T	SH	SK
	BA	PW	PL	T	SH	SK
	BA	PW	PL	T	SH	SK
Réplica malteado 2: caja 3	SK	SH	T	PW	BA	PL
	SK	SH	T	PW	BA	PL
	SK	SH	T	PW	BA	PL
	SK	SH	T	PW	BA	PL
	SK	SH	T	PW	BA	PL

Figura 5.8. Disposición de las bolsas de malla en 2020 durante la germinación y secado-tostado. Cada caja de germinación hace referencia a una réplica de malteado. Las localidades se disponían a lo ancho para cada variedad. BA: Basic; PW: Pewter; PL: Planet; SK: Shakira; SH: Shuffle; T: Traveler.

Al utilizarse las instalaciones y los lotes industriales de la Maltería La Moravia, las condiciones de malteado fueron las aplicadas en el instante de realizar el micro-malteado (**Tabla 5.4**).

Tabla 5.4. Condiciones de micro-malteado mediante bolsas de malla para las muestras de cebada de los dos años de cultivo estudiados. Las muestras de 2018 se maltearon en 2019 y las muestras de 2019 se maltearon en 2020.

	Réplicas	Remojo	Germinación	Secado-tostado
Muestras cultivo 2018 (malteado en julio 2019)	Malteado 1: caja 3	18 h a 15° C (4 h en agua, 13 h en seco y 1 h en agua)	99 h 18° C	20 h (2 h a 55° C, 10.5 h a 62° C, 2.5 h a 65° C, 2.5 h a 72° C y 2.5 h a 85° C)
	Malteado 2: caja 5			
Muestras cultivo 2019 (malteado en abril 2020)	Malteado 1: caja 2	20 h a 15° C (4 h en agua, 15 h en seco y 1 h en agua)	112 h a 18° C	23 h (1.5 h a 50° C, 1.5 h a 55° C, 13.5 h a 62° C, 2.5 h a 65° C, 1.5 h a 72° C y 2.5 h a 85° C)
	Malteado 2: caja 3			

h: horas.

5.3. ELABORACIÓN DE CERVEZA

Las elaboraciones de cerveza se realizaron entre noviembre de 2020 y febrero de 2021 en el laboratorio de Agrotecnio en el campus de ETSEA en la Universidad de Lleida. Dado el gran número de muestras, se seleccionaron las 4 variedades de cebada con mayor interés a nivel industrial: Basic, Pewter, Planet y Shakira. De cada malteado realizado para la combinación año × localidad × variedad se realizó una elaboración única, por lo que cada combinación malteado × PicoBrew hace referencia a una repetición del proceso. La distribución de las elaboraciones queda recogida en la **Tabla 5.5**, para las muestras de 2018, y **Tabla 5.6**, para las muestras de 2019, mostradas a continuación.

Tabla 5.5. Equipo PicoBrew, 1 o 2, empleado para cada elaboración de cerveza según muestra (localidad × variedad × malteado) del año 2018.

Localidad	Variedad	Malteado 1	Malteado 2
Bell-lloc N ₀	Basic	2	1
	Pewter	1	1
	Planet	2	2
	Shakira	1	2
Bell-lloc N ₁₅₀	Basic	2	1
	Pewter	2	1
	Planet	2	2
	Shakira	2	1
Sádaba	Basic	1	2
	Pewter	1	1
	Planet	2	1
	Shakira	1	2
Saganta	Basic	1	s.m.
	Pewter	1	s.m.
	Planet	1	s.m.
	Shakira	2	s.m.
Sariñena	Basic	2	2
	Pewter	1	1
	Planet	1	1
	Shakira	1	2

s.m.: sin muestra.

Como se observa en la **Tabla 5.5**, para las muestras de cebada de 2018 no se realizó el segundo malteado de la localidad Saganta puesto que no se dispuso de suficiente muestra de partida y, por ende, no se pudo elaborar la correspondiente cerveza.

Tabla 5.6. Equipo PicoBrew, 1 o 2, empleado para cada elaboración de cerveza según muestra (localidad × variedad × malteado) del año 2019.

Localidad	Variedad	Malteado 1	Malteado 2
Bell-lloc N ₀	Basic	2	1
	Pewter	2	1
	Planet	1	1
	Shakira	1	1
Bell-lloc N ₁₅₀	Basic	2	1
	Pewter	1	1
	Planet	1	2
	Shakira	2	1
Sádaba	Basic	s.m.	s.m.
	Pewter	1	2
	Planet	1	2
	Shakira	1	2
Saganta	Basic	2	2
	Pewter	2	2
	Planet	2	2
	Shakira	2	1
Sariñena	Basic	1	2
	Pewter	2	1
	Planet	1	1
	Shakira	2	1

s.m.: sin muestra.

Asimismo, en la **Tabla 5.6** se muestra una ausencia de la variedad Basic en la localidad de Sádaba, dado que se produjo un error en la asignación de la semilla durante el cultivo de ella. Tras realizar una prueba genética, resultó ser cebada Planet, por lo que se decidió no incluir los resultados.

5.3.1. OBTENCIÓN DEL MOSTO CERVECERO

Para la elaboración de cerveza a pequeña escala de la cerveza a partir de las muestras de malta de cebada obtenidas, se utilizaron dos equipos PicoBrew Z series (PicoBrew Inc., Seattle, Washington, Estados Unidos) con la finalidad de poder realizar dos elaboraciones por día.

Los equipos PicoBrew constan de un barril tipo Cornelius de 19 L y una unidad central, en la que están los compartimentos para la malta, lúpulo y adjuntos, un circuito de intercambio de calor y la CPU, que controla las consignas de temperatura y tiempo establecidas para la elaboración. El sistema se controla mediante una aplicación en la que se programa una receta. El mosto circula en circuito cerrado a través de dos conducciones, una de entrada y una de salida, entre la unidad y el barril. En la etapa de maceración el agua situada en el barril entra por la conducción de entrada al intercambiador de calor del equipo, en donde alcanza la temperatura establecida en la receta; posteriormente, el agua caliente circula sobre el lecho de malta triturada, infundándola, y retorna al barril. El proceso de maceración es continuo y tiene la duración y la programación de temperaturas establecida en la receta. Finalizada la etapa de maceración se inicia el proceso de ebullición; el mosto obtenido es calentado a una

temperatura próxima a 100° C y circula entre el barril y los compartimentos de lúpulo el tiempo programado. Al final del proceso, todo el mosto cervecero queda retenido en el barril y en el soporte tan solo queda el bagazo de malta y lúpulo.

Para cada elaboración de cerveza se utilizaron 3.4 kg de malta de cebada molturada con un molino Ras® Mill (Romer labs, inc., Missouri, Estados Unidos) y se depositó en el soporte de la PicoBrew Z. Se utilizaron 4 g de extracto de lúpulo Herkules de HVG (Hopfenverwertungsgenossenschaft e.G., Germany). Cada elaboración parte de 13 L de agua desmineralizada depositados en el barril. El montaje del equipo queda plasmado en la **Figura 5.9**.

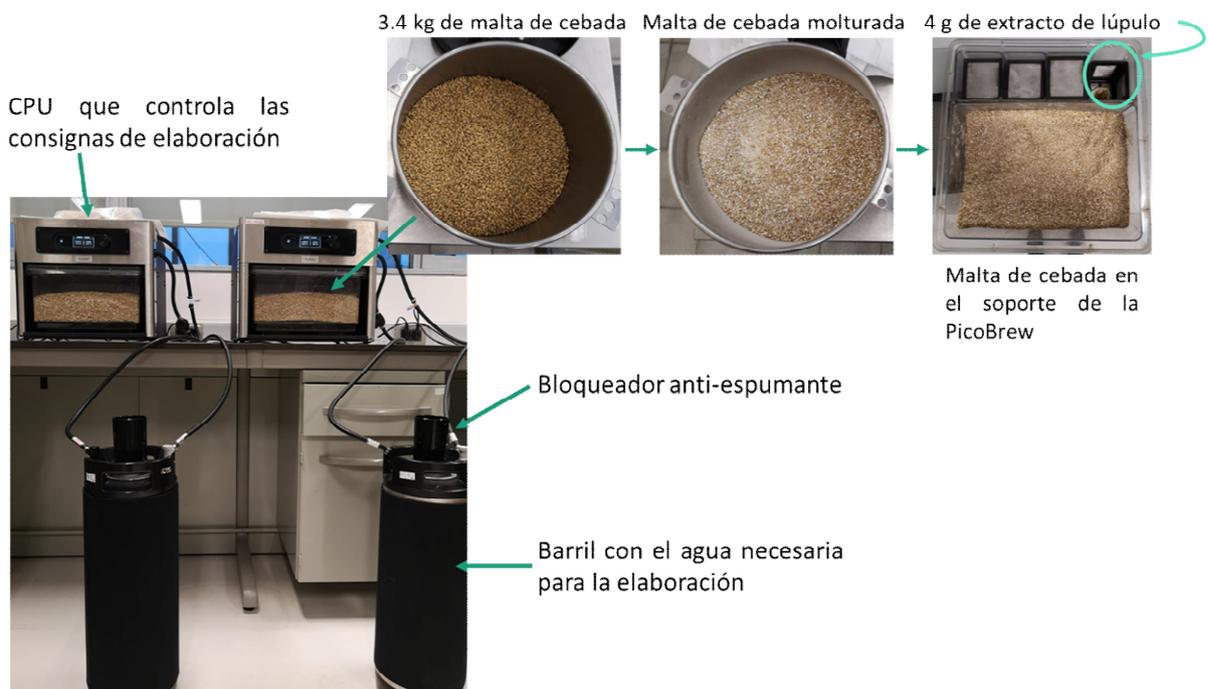


Figura 5.9. Equipos PicoBrew Z y preparación de la muestra para la elaboración de cerveza a pequeña escala.

La receta de elaboración que se siguió tenía como objetivo obtener una cerveza final con un color de 8.6 EBC, amargor de 26 IBU, 5.4% de alcohol (v/v), 2.6° P de extracto aparente y 13° P de extracto primitivo. Las condiciones para la elaboración de los mostos cerveceros quedan recogidas en la **Tabla 5.7** y la gráfica de temperaturas del proceso en la **Figura 5.10**. Se obtuvieron 9.6 L de mosto cervecero finales que se enfriaron hasta 12° C. Desde el montaje de los equipos hasta finalizar el proceso de elaboración, se necesitaron 6 horas aproximadamente y se requería cerca de 1 hora para enfriar el mosto y poder realizar su inoculación.

Tabla 5.7. Tiempo y temperatura de cada etapa de las elaboraciones de mosto cervecero en ambos equipos PicoBrew Z.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Macerado 1	45° C	25 minutos
Incremento temperatura		15 minutos
Macerado 2	60° C	15 minutos
Incremento temperatura		5 minutos
Macerado 3	65° C	20 minutos
Incremento temperatura		7 minutos
Macerado 4	72° C	15 minutos
Incremento temperatura		6 minutos
Macerado 5	78° C	5 minutos
Ebullición sin lúpulo	97° C	15 minutos
Ebullición con lúpulo	97° C	75 minutos

**Figura 5.10.** Gráfica de temperaturas del proceso de maceración y ebullición para la elaboración de las cervezas.

5.3.2. OBTENCIÓN DE LA CERVEZA FINAL

El mosto cervecero, enfriado anteriormente, se inoculó con 5.75 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* Saflager W-34/70 (Fermentis, Lesaffre, France) previamente rehidratada. La fermentación se realizó a una temperatura controlada de 12° C en una cámara de frío. Una vez finalizada, aproximadamente al cabo de 14-16 días, la levadura se retiró por decantación, dejando reposar la muestra a 4° C durante dos días previos a su embotellado.

De cada elaboración se embotellaron un total de 8 botellas de 1 L. El proceso de embotellado se realizó en una campana de flujo laminar Telstar™ AV-30/70 (Terrassa, Barcelona, España) para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada del producto, en el laboratorio de Agrotecnio en el campus de la ETSEA en la Universitat de Lleida.

La carbonatación de las muestras de cerveza embotellada se llevó a cabo una segunda fermentación en botella, añadiendo 3 pastillas de carbonatación Mangrove Jack's (Albania, Australia) y dejando reposar unos 7 días más a 12° C.

5.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

5.4.1. PARÁMETROS DE CALIDAD EN CEBADA

- Humedad (método EBC 3.2):

Las muestras de cebada se molturaron por medio de un molino Buhler-Miah Universal DLFU a 0.2 mm, se pesaron 5 g de la harina en una báscula de precisión SCALTEC SBC 31 (SCALTEC, Madrid, España) y se secaron en una estufa Digitronic (J.P. Selecta, Barcelona, España) a 105° C durante 3 horas. El cálculo de la pérdida de masa durante el secado de la muestra fue el siguiente:

$$\text{Humedad (\% m/m)} = \frac{\text{peso inicial (g)} - \text{peso final (g)}}{\text{peso inicial (g)}} \times 100$$

- Proteína total (método EBC 3.3.1):

A partir de 1.5 g de harina de cebada, los compuestos nitrogenados se digirieron con ácido sulfúrico 98% a 420° C en un digestor Labtec™ Line (Foss, Barcelona, España) en presencia de un catalizador de sulfato de amonio. Posteriormente se realizó una destilación con una disolución de ácido bórico a 20 g/L en exceso en un Kjeltec™ 8200 (Foss, Barcelona, España), obteniendo un producto alcalino con hidróxido sódico. El producto se analizó mediante el TitraLab AT1000 Series (HACH, Barcelona, España) con ácido clorhídrico 0.1 M (T). La fórmula para su cálculo fue la siguiente:

$$\text{Proteína total (\% m/m)} = \left(\frac{T \times 14}{\text{muestra (g)} \times (100 - \text{humedad})} \times 100 \right) \times 6.25$$

5.4.2. DETERMINACIÓN β -GLUCANOS EN CEBADA

En las muestras de cebada se analizó el contenido de β -glucanos (%) por medio del método analítico EBC 3.10.1, mediante el kit β -glucan Assay Kit (Mixed Linkage) de Megazyme (Escocia, Reino Unido). Las determinaciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Antioxidants de ETSEA en la Universidad de Lleida.

Las muestras se molturaron a 0.5 mm por medio del equipo Cyclotec 1093™ (Foss, Barcelona, España). Con tal de realizar la extracción de β -glucanos, a 100 mg de harina de cebada se le añadieron 0.2 mL de etanol acuoso (50% v/v) y 4 mL de tampón fosfato sódico (20 mM, pH 6.5). La mezcla se incubó 1 minuto en agua a 100° C, se mezcló vigorosamente y se volvió a incubar durante 2 minutos más. Con tal de bajar temperatura, las muestras se atemperaron a 50° C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 0.2 mL de liquenasa y se incubaron a 50° C durante 1 hora en un baño termostático con agitación. Seguidamente, se añadieron 5 mL de tampón acetato de sodio (200 mM, pH 4.0) y se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm.

Para la colorimetría, se alicuotaron 20 μL de sobrenadante a los cuales se añadieron 20 μL de β -glucosidasa y 20 μL de tampón acetato sódico (50 mM, pH 4.0). Las muestras se agitaron durante 10 minutos a 45° C. Seguidamente, se añadió 210 μL del reactivo GOPOD y se agitaron durante 20 minutos a 45° C. La lectura se realizó por medio de un espectrofotómetro de micro-placas Multiskan Go (Thermo Scientific, Barcelona, España) a 510 nm frente a un blanco de muestra y un blanco de reactivo. Se realizó una recta de calibrado ($y = ax \pm b$). Con tal de obtener la concentración, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\beta\text{-glucanos (\%)} = \frac{abs_{510} - b}{a} \times \frac{11.4 \text{ mL}}{\text{peso (mg)}} \times \frac{100}{(100 - \text{humedad})} \times \frac{162}{180} \times 100$$

5.4.3. DETERMINACIÓN ÁCIDOS GRASOS EN CEBADA

La extracción y determinación del perfil de ácidos grasos en las muestras de cebada se realizó acorde al método descrito por Gordon et al. (2018b) en el laboratorio de análisis sensorial y fisicoquímico de los alimentos de los Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Lleida en el campus de la ETSEA.

Se realizó una extracción líquido-sólido suspendiendo 2 g de harina de cebada con 8 mL de n-hexano 96% (Scharlab, Barcelona, España) y se agitaron durante 10 minutos en un baño de ultrasonido Branson Ultrasonics™ (Barcelona, España). Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente y en posición vertical hasta obtener una separación de dos fases. Posteriormente, el sobrenadante se resuspendió con 0.3 mL de potasa metanólica 2 N, se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se dejaron reposar los tubos en posición vertical hasta obtener de nuevo una separación de dos fases. El sobrenadante se filtró con filtros de nylon 0.45 μm en un vial ámbar para cromatografía de gases.

El extracto de las muestras y las rectas de calibración se cuantificaron por medio de cromatografía de gases con un equipo Agilent 5890 Serie II equipado con detector de ionización de llama (Agilent Technologies, Barcelona, España) y una columna analítica SP-2330 (Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). La proporción de cada ácido graso determinado se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido (\%)} = \frac{\text{área ácido graso}}{\text{suma áreas}} \times 100$$

5.4.4. PARÁMETROS DE CALIDAD EN MALTA

La calidad de la malta se evaluó por métodos mecánicos y a partir de la elaboración de un mosto Congreso, que se preparó en condiciones estandarizadas (método EBC 4.5.1). Las muestras de malta se molturaron en un molino Buhler-Miah Universal DLFU a 0.2 mm y se elaboró el mosto Congreso según el protocolo EBC en un baño Lochner (Labor + Technik, Berching, Alemania). Todos los análisis se realizaron en el laboratorio de la Maltería La Moravia.

Se analizaron los siguientes parámetros de calidad:

- Humedad (método EBC 4.2):

Se pesaron 5 g de harina de malta en una báscula de precisión SCALTEC SBC 31 (SCALTEC, Madrid, España) y se secaron en una estufa Digitronic (J.P. Selecta, Barcelona, España) a 105° C durante 3 horas. Se calculó la pérdida de masa durante el secado de la muestra:

$$\text{Humedad (\% m/m)} = \frac{\text{peso inicial (g)} - \text{peso final (g)}}{\text{peso inicial (g)}} \times 100$$

- Friabilidad (método EBC 4.15):

Para tener conocimiento del grado de modificación y de la posible presencia de zonas no modificadas del grano de malta, se utilizó un friabilímetro Pfeuffer GMBH (Kitzingen, Alemania) y un tamiz Glasbläserei (Instituts Gärungsgewerbe, Berlin, Alemania). La fracción de malta que no quedó triturada, con un tamaño > 2.5 mm, se pesó (A). La friabilidad se calcula como:

$$\text{Friabilidad (\%)} = 100 - (2 \times A \text{ (g)})$$

- pH (método EBC 8.17):

Se utilizó un pH meter Basic 20 (Crison, Barcelona, España).

- Sobrecolor (método EBC 4.19):

El mosto Congreso se lleva a ebullición en una placa calefactora (J.P. Selecta, Barcelona, España) con reflujo durante 2 h. A continuación, se realizó la lectura espectrofotométrica de la absorbancia (abs) a 430 nm mediante Heλios α (Thermo electron corporation, Barcelona, España) El sobrecolor se expresa en unidades EBC (European Brewery Convention) de la siguiente forma:

$$\text{Sobrecolor (EBC)} = 25 \times \text{abs}_{430}$$

- Extracto (método EBC 4.5.1):

Se determinó a partir de la medida de la gravedad específica (P) del mosto Congreso con un densímetro Hartong Malt (Ludwig Schneider, Alemania) a una temperatura de 20° C. El extracto se calcula como:

$$\text{Extracto (\%)} = \frac{P \times (\text{Humedad} + 800)}{100 - P}$$

- Proteína total (método EBC 4.3.1):

Como en las muestras de cebada, se realizó una digestión con ácido sulfúrico 98% a 420° C en un digestor Labtec™ Line (Foss, Barcelona, España) en presencia de catalizador de sulfato de amonio. Seguidamente se destiló con ácido bórico 20 g/L en un equipo Kjeltect™ 8200 (Foss, Barcelona, España). El resultante se analizó

mediante el TitraLab AT1000 Series (HACH, Barcelona, España) con ácido clorhídrico 0.1 M (T). Se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$Proteína\ total\ (\% m/m) = \left(\frac{T \times 14}{muestra\ (g) \times (100 - humedad)} \times 100 \right) \times 6.25$$

- Proteína soluble del mosto congreso (método EBC 4.9.1):

Se lleva a cabo una digestión en dos etapas, primero a 300° C, junto ácido sulfúrico 98%, y posteriormente a 420° C en presencia de catalizador de sulfato de amonio. La destilación y análisis se realizó siguiendo el método descrito anteriormente en la proteína total. El cálculo de la proteína soluble es el siguiente:

$$Proteína\ soluble\ (\% m/m) = \left(\frac{\left(\frac{T \times 14}{muestra\ (mL)} \right) \times extracto\ (\%)}{10000 \times extracto\ \left(\frac{g}{100\ mL} \right)} \right) \times 6.25$$

- Índice Kolbach (KI) (método EBC 4.9.1):

A partir de los valores de proteína total y proteína soluble, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$KI = \frac{Proteína\ soluble \times 100}{Proteína\ total}$$

- Poder diastásico (WK/dm) (método EBC 4.12.1):

Para valorar la carga enzimática capaz de degradar el almidón, se realiza una extracción de las enzimas de la malta con agua a 40° C en un baño Lochner (Labor + Technik, Berching, Alemania). Seguidamente se incuba una solución estándar de almidón en tampón acetato pH 4.3 junto con el extracto enzimático de la malta, para que se produzca la hidrólisis del almidón. A continuación, se analiza la cantidad de azúcares reductores que han sido liberados por las enzimas de la malta (M) y del blanco de reactivo (B) mediante titulación iodométrica.

El poder diastásico se expresa como los gramos de maltosa que se producen bajo condiciones estándar por 100 g de malta, denominado Windisch-Kolbach (WK), mediante la siguiente expresión:

$$Poder\ diastásico\ (WK/dm) = \frac{(34.2 \times (B\ (mL) - M\ (mL))) \times 100}{100 - humedad}$$

- Aminonitrógeno libre (FAN) (método EBC 4.10):

Se usó un método colorimétrico para la estimación del contenido en aminoácidos, amonio y grupos amínicos terminales de péptidos y proteínas. Se calentaron las muestras de mosto congreso durante 16 minutos en presencia del reactivo ninhidrina a pH 6.7 y, posteriormente, se atemperaron en un baño termostático

Digit-Cool (J.P. Selecta, Barcelona, España). Se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm de las muestras frente un blanco de reactivo y un blanco de muestra en un espectrofotómetro HeLiios α (Thermo electron corporation, Barcelona, España). El cálculo fue el siguiente:

$$FAN (mg/L) = \frac{abs_{570}muestra \times 2 \times dilución}{abs_{570}reactivo}$$

- Viscosidad (método EBC 4.8):

Se utilizó un AMVn Automated Micro Viscometer (Anton Paar, Barcelona, España), el cálculo tiene en cuenta el tiempo en segundo del recorrido de la bola (t), la densidad de la bola (a), la densidad específica del mosto (b) y la constante del equipo (K):

$$Viscosidad (mPa/s) = t \times (a - b) \times K$$

- Atenuación límite (método EBC 4.11.1):

La atenuación límite se determina con el fin de conocer la fermentabilidad del mosto para la posterior elaboración de cerveza. Primeramente, se determinó la densidad original del mosto congreso hervido y filtrado previamente a ser inoculado con levadura (E_i). A continuación, tras dejarlo fermentar durante 24 h en agitación continua, se filtró de nuevo y se midió la densidad (E_f). El resultado se obtuvo por medio de la siguiente fórmula:

$$Atenuación\ límite\ (\%) = \frac{(E_i - E_f)}{E_i} \times 100$$

5.4.5. DETERMINACIÓN DE β -GLUCANOS EN MALTA

Para las muestras de malta se utilizó el método analítico EBC 4.16.1, mediante el kit β -glucan Assay Kit (Mixed Linkage) de Megazyme (Escocia, Reino Unido). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Antioxidants de ETSEA en la Universidad de Lleida.

Previo al análisis, las muestras de malta de cebada se molturaron a 0.5 mm por medio del equipo Cyclotec 1093™ (Foss, Barcelona, España). Con tal de realizar la extracción de β -glucanos, a 200 mg de harina de malta de cebada se le añadieron 5 mL de etanol acuoso (50% v/v) y las muestras se incubaron 5 minutos en agua a 100° C. La mezcla se agitó vigorosamente y se añadieron otros 5 mL de etanol acuoso (50% v/v). Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 10 mL de etanol acuoso (50% v/v), agitando vigorosamente la mezcla y centrifugándola de nuevo 10 minutos a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió con 0.2 mL de etanol acuoso (50% v/v) y se añadieron 4 mL de tampón fosfato sódico (20 mM, pH 6.5). Se añadieron 0.2 mL de liquenasa a las muestras y se incubaron 1 hora a 50° C en un baño termostático con agitación. Seguidamente, se añadieron 2 mL tampón acetato sódico (200 mM, pH 4.0) y se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm.

Para la colorimetría, el método fue el mismo que en las muestras de cebada. A 20 μL de sobrenadante se añadieron 20 μL de β -glucosidasa y 20 μL de tampón acetato sódico (50 mM, pH 4.0). Las muestras se agitaron durante 10 minutos a 45° C. Seguidamente, se añadió 210 μL del reactivo GOPOD y se agitaron durante 20 minutos a 45° C. La lectura se realizó mediante un espectrofotómetro de micro-placas Multiskan Go (Thermo Scientific, Barcelona, España) a 510 nm frente a un blanco de muestra y un blanco de reactivo. Se realizó una recta de calibrado ($y = ax \pm b$). Con tal de obtener la concentración, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\beta\text{-glucanos (\%)} = \frac{abs_{510} - b}{a} \times \frac{6.4 \text{ mL}}{\text{peso (mg)}} \times \frac{100}{(100 - \text{humedad})} \times \frac{162}{180} \times 100$$

5.4.6. PERFIL FENÓLICO

La extracción y caracterización del perfil fenólico de las muestras de cebada y malta de cebada se realizó acorde al método descrito por Martínez et al. (2018). Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Antioxidants de ETSEA en la Universidad de Lleida.

Para la extracción de la fracción libre, se pesaron 150 mg de harina de cebada y/o malta de cebada y se le añadió 1 mL de una solución de 79.5% metanol, 19.5% agua Milli Q y 1% de ácido fórmico. Las muestras se mezclaron 30 segundos por medio del sonicador SLPe Digital (Branson, Barcelona, España) y se centrifugaron 10 minutos a 9000 rpm. Este proceso se repitió un total de tres veces, agrupando los sobrenadantes de las extracciones. Se filtró con filtros PVDF 0.22 μm en viales de cromatografía líquida y se realizó su análisis.

Con tal de extraer la fracción ligada, se añadieron 6 mL de hidróxido sódico (2 M) al residuo obtenido tras la extracción de la fracción ligada y se dejaron reposar 12 horas a temperatura ambiente para someter las muestras a una hidrólisis alcalina. A continuación, las muestras se sonicaron durante 1 minuto y se centrifugaron 10 minutos a 9000 rpm. Se separó el sobrenadante y se acidificó con ácido clorhídrico (37% p/p) hasta un pH de 2. Las muestras se centrifugaron de nuevo 10 minutos a 9000 rpm. A 350 μL del sobrenadante se le añadieron 350 μL de ácido fosfórico y se volvieron a centrifugar 10 minutos a 9000 rpm. Para su limpieza, y posterior análisis, las muestras se sometieron a μSPE (extracción en fase sólida).

Se realizaron las rectas de calibración ($y = ax \pm b$) para los patrones de ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido p-OHBenzoico, ácido sinápico, ácido siringico, ácido vanílico, apigenina-o-glucósido, catequina, dímero B2, luteolina-o-glucósido y siringaldehído, todos ellos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Los extractos fenólicos, tanto la fracción libre como la ligada, y las rectas de calibración se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de masas en tándem (UPLC MS/MS) con una Columna analítica AcQuity BEH C18 equipada con una AcQuity BEH C18 VanGuard™ Pre-Columna de Waters (Barcelona, España) y se realizó el cálculo de la concentración (mg/kg peso seco) de cada compuesto fenólico con la curva del patrón correspondiente, o el más afín, por medio del área:

$$\text{Concentración (mg/kg)} = \frac{\left(\frac{\text{área} - a}{b}\right) \times 0.0001}{\text{muestra (mg)}} \times \frac{6}{2.5} \times \frac{1}{0.1129} \times 1000$$

Se han clasificado los compuestos fenólicos en tres grandes familias: ácidos fenólicos, que incluyen los ácidos hidroxibenzoicos (HBA) e hidroxicinámicos (ácido cinámico (CinA), cumárico (CouA), cafeico (CafA) y ferúlico (FerA), así como sus derivados); flavan-3-oles, donde se incluye el monómero de catequina (Cat) y sus oligómeros (Olig) (dímeros y trímeros); flavonas glicosiladas, incluyendo las luteolinas (Lut) y apigeninas (Api), así como sus derivados.

5.4.7. PARÁMETROS DE CALIDAD EN MOSTO CERVECERO

De cada elaboración se prepararon dos muestras de 50 mL en Falcon, previamente a ser inoculado con levadura, y se guardaron a -80° C. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio Central del Grupo Damm dónde se determinaron los siguientes parámetros:

- Amargor (IBU) (método EBC 8.8):

Las muestras de mosto cervecero se acidificaron con iso-octano y, posterior a ser centrifugadas, se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro DR 5000 (HACH, Barcelona, España) del sobrenadante a 275 nm. El resultado se expresa en IBU (International Bitterness Unit) calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Amargor (IBU)} = 100 \times \text{abs}_{275}$$

- Aminonitrógeno libre (FAN) (método EBC 8.10.1):

Las muestras desgasificadas se calentaron durante 16 minutos en presencia de ninhidrina a pH 6.7. Una vez atemperadas, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro DR 5000 (HACH, Barcelona, España) tanto de las muestras como del reactivo frente a un blanco. La concentración se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{FAN (mg/L)} = \frac{\text{abs}_{570} \text{muestra} \times 2 \times \text{dilución}}{\text{abs}_{570} \text{reactivo}}$$

- β -glucanos (método EBC 8.13.2):

En el caso de las muestras de mosto cervecero, para su determinación se utilizó un método fluorimétrico. Se basa en determinar los complejos formados entre los β -glucanos de las muestras y el fluorocromo (blanco de calco flúor M2r de Sigma, Barcelona, España) usando un cromatógrafo HPLC 1100 (Agilent Technologies, Barcelona, España) a 425 nm. Se calculó la concentración a partir de la fluorescencia (F) de la muestra:

$$\beta\text{-glucanos (mg/L)} = \frac{(a \times F) + b}{1000}$$

- °Balling (método EBC 8.2.2):

Se determinó la gravedad específica por medio de un densímetro digital (Mettler Toledo, Barcelona, España) a una temperatura de 20° C. El resultado se expresa en grado Plato (° P).

- Calcio y magnesio (método EBC 8.18):

Seguidamente a la dilución de las muestras, se determinó el contenido por medio de un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente Agilent 5110 Expert (Agilent Technologies, Barcelona, España) a 423 nm. A partir de la intercepción de la absorbancia con la curva de calibración (c) se calculó la concentración:

$$\text{Concentración (mg/L)} = c \times 100$$

- Aniones cloruros, fosfatos, nitratos, oxalatos y sulfatos (método EBC 9.36):

Se determinó su contenido por medio de cromatografía iónica con un equipo Dionex ICS3000 (ThermoFischer Scientific, Barcelona, España) de las muestras diluidas. A partir de la pendiente de la recta de calibrado (m) y el área (R) determinada, las concentraciones de los aniones se calcularon de la siguiente forma:

$$\text{Anión (mg/L)} = \left(R \times \frac{1}{m} \right) \times \text{dilución}$$

- Color (método EBC 8.5).

Se determinó por colorimetría mediante la lectura de la absorbancia se realizó a 430 nm en un espectrofotómetro DR 5000 (HACH, Barcelona, España) de las muestras previamente desgasificadas. El resultado se expresa en unidades EBC mediante la siguiente expresión:

$$\text{Color (EBC)} = 25 \times \text{abs}_{430}$$

- Diacetilo (método EBC 9.24.2):

Su determinación se llevó a cabo por cromatografía de gases. Las muestras se alicuotaron, se saturaron con sulfato de amonio y se les añadió un patrón interno de 2,3-hexanodiona. Durante 40 minutos se calentaron a 35° C. El sobrenadante se inyectó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890-A equipado con una columna capilar HP-5 y un detector de captura de electrones (Agilent Technologies, Barcelona, España). A partir del área integrada de la muestra y del patrón interno, se realizó la fórmula siguiente:

$$\text{Diacetilo (}\mu\text{g/L)} = \frac{\text{área diacetilo}}{\text{área patrón interno}} \times \text{dilución}$$

- pH (método EBC 8.17):

Se empleó un pH metro con precisión de 0.01 unidades (Mettler Toledo, Barcelona, España).

- Zinc (método EBC 8.11):

Las muestras fueron desgasificadas por ultrasonidos previamente a determinar por espectrofotometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente con el equipo Agilent 5110 Expert equipado con bomba peristáltica de 5 canales y sistema AVS (Agilent Technologies, Barcelona, España) a 214 nm. A partir de la intercepción de la absorbancia con la curva de calibración (c) se calcula la concentración:

$$\text{Zinc } (\mu\text{g/L}) = c \times \frac{50}{49}$$

5.4.8. PARÁMETROS DE CALIDAD EN CERVEZA

Se reservaron en una cámara de frío a 4° C 2 botellas de 1 L de cada elaboración hasta poder ser analizadas en el Laboratorio Central del Grupo Damm, dónde se determinaron los siguientes parámetros:

- Densidad (método EBC 9.43.1):

Las muestras se desgasificaron y fueron destiladas aplicando calor directo. Se realizó la medición de la gravedad específica del residuo con un densímetro digital (Mettler Toledo, Barcelona España). El resultado se ha expresado en g/mL.

- Extracto aparente (método EBC 9.4):

Se calculó a través de la gravedad específica del residuo (SG_{EA}) con la siguiente fórmula:

$$\text{Extracto aparente } (^\circ P) = -460.234 + (662.649 \times SG_{EA}) - (202.414 \times SG_{EA}^2)$$

- Extracto primitivo (método EBC 9.4):

Se calculó a través del contenido en alcohol (% m/m) y el extracto real (E_R) con la siguiente fórmula:

$$\text{Extracto primitivo } (\% p/p) = \frac{(2.0665 \times A) + E_R}{100 + (1.0665 \times A)} \times 100$$

- Extracto real (método EBC 9.4):

Se calculó a través de la gravedad específica de la cerveza filtrada (SG_{ER}), determinada con un densímetro digital (Mettler Toledo, Barcelona, España), con la siguiente fórmula:

$$\text{Extracto real (\%)} = -460.234 + (662.649 \times SG_{ER}) - (202.414 \times SG_{ER}^2)$$

- Grado alcohólico (método EBC 9.2.4):

El grado alcohólico se determinó a partir del contenido en etanol. Una vez desgasificadas las muestras, se inyectaron directamente en un cromatógrafo de gases Agilent 7890-A con detector FID y controlador electrónico de presión y columna HP-FFAP (Agilent Technologies, Barcelona, España). Por medio del área de la muestra y del patrón interno se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Alcohol (\% v/v)} = \frac{\text{área etanol}}{\text{área patrón interno}}$$

- Amargor (método EBC 9.8):

Las muestras desgasificadas se acidificaron con iso-octano y, posterior a ser centrifugadas, se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro DR 5000 (HACH, Barcelona, España) del sobrenadante a 275 nm:

$$\text{Amargor (IBU)} = 50 \times \text{abs}_{275}$$

- Aminonitrógeno libre (FAN) (método EBC 9.10.1):

Se desgasificaron las muestras y se calentaron durante 16 minutos en presencia de ninhidrina a pH 6.7. Una vez atemperadas, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro DR 5000 (HACH, Barcelona, España). Las muestras se analizaron frente a un blanco de reactivo y un blanco de muestra. La concentración se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{FAN (mg/L)} = \frac{\text{abs}_{570} \text{muestra} \times 2 \times \text{dilución}}{\text{abs}_{570} \text{reactivo}}$$

- Atenuación real (RDF) (método EBC 9.7):

La atenuación real indica la cantidad de extracto que ha sido fermentado. Se calcula a partir del contenido de alcohol (A) (% v/v) y del extracto real (E_R) (% Plato) con la siguiente fórmula:

$$\text{RDF (\%)} = 100 \times \frac{2.0665 \times A}{(2.0665 \times A) + E_R}$$

- β -glucanos (método EBC 8.13.2):

Se añadió fluorocromo (blanco de calco flúor M2r de Sigma, Barcelona, España) a las muestras desgasificadas. Se determinó la fluorescencia de los complejos formados al reaccionar con los β -glucanos por medio de cromatografía líquida de alta eficacia con un HPLC 1100 (Agilent Technologies, Barcelona, España) a 425 nm. Se calculó la concentración a partir de la fluorescencia (F) de la muestra:

$$\beta\text{-glucanos (mg/L)} = \frac{(a \times F) + b}{1000}$$

- Color (método EBC 9.6):

La lectura de la absorbancia se realizó a 430 nm en un espectrofotómetro DR 5000 (HACH, Barcelona, España). El cálculo que se realizó fue el siguiente:

$$\text{Color (EBC)} = 25 \times \text{abs}_{430}$$

- Diacetilo (método EBC 9.24.2):

Las muestras desgasificadas se alicuotaron, se saturaron con sulfato de amonio y se les añadió un patrón interno de 2.3-hexanodiona. Durante 40 minutos se calentaron a 35° C. El sobrenadante se inyectó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890-A, equipado con una columna capilar HP-5 y un detector de captura de electrones (Agilent Technologies, Barcelona, España). A partir del área integrada de la muestra y del patrón interno, se realizó la fórmula siguiente:

$$\text{Diacetilo } (\mu\text{g/L}) = \frac{\text{área diacetilo}}{\text{área patrón interno}} \times \text{dilución}$$

- Sulfuro de dimetilo (DMS) (Yang and Schwarz, 1998):

Se usó un tratamiento alcalino térmico con tal de transformar el precursor del DMS en DMS libre y DMS total que se determinó mediante cromatografía de gases con un cromatógrafo Agilent 7890-A con detector FID, controlador electrónico de presión y columna capilar HP-FFAP (Agilent Technologies, Barcelona, España). La diferencia entre el DMS libre y el DMS total resulta en el contenido del precursor S-metilmetionina:

$$\text{DMS } (\mu\text{g/L}) = \text{DMS total} - \text{DMS libre}$$

- pH (método EBC 9.35):

Las muestras desgasificadas se midieron en un pH metro con precisión de 0.01 unidades (Mettler Toledo, Barcelona, España).

- Sulfuro (método EBC 9.25.3):

Se midió el color producido por la reacción entre el sulfuroso y la p-rosanilia, en presencia de formaldehído, por medio del espectrofotómetro UV/Vis DR 5000 (HACH, Barcelona, España). Se multiplicó la lectura de absorbancia a 550 nm por un factor de conversión (F) obtenido en el gráfico de la colorimetría:

$$\text{Sulfuro (mg/L)} = F \times \text{abs}_{550}$$

5.4.9. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

Para el análisis del perfil de aminoácidos en mosto cervecero y cerveza desgasificada, se utilizó el método descrito por Henderson y Brooks (2010) por medio de cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta utilizando el equipo HPLC 1100 equipado con la columna AdvanceBio AAA (Agilent Technologies, Barcelona, España) en el Laboratorio Central del Grupo Damm.

Los aminoácidos determinados fueron: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), cistina (Cis), fenilalanina (Fen), glutamina (Gln), glicina (Gli), histidina (His), hidroxiprolina (Hip), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis), metionina (Met), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Tre), triptófano (Trp), tirosina (Tir) y valina (Val). El resultado se ha expresado en mg/L.

5.4.10. PERFIL DE COMPUESTOS AROMÁTICOS VOLÁTILES

Se caracterizaron los compuestos aromáticos volátiles en las muestras de cerveza, previamente desgasificadas y ajustadas a 7.5% de etanol con agua y etanol. Se siguió el método EBC 9.39, utilizando cromatografía de gases con el equipo Agilent 7890-A, con detector FID, columna capilar HP-FFAP, controlador electrónico de presión y el auto-muestreador de espacio de cabeza 7697A (Agilent Technologies, Barcelona, España) en las instalaciones del Laboratorio Central del Grupo Damm.

Se detectó la siguiente fracción volátil: acetaldehído (mg/L), ácido b-feniletanol (mg/L), acetato de etilo (mg/L), acetato isoamilo (mg/L), acetato isobutilo (mg/L), alcoholes totales (mg/L), butirato etilo (mg/L), β -feniletanol (mg/L), caprato de etilo (mg/L), caprilato etilo (mg/L), caproato etilo (mg/L), ésteres totales (mg/L), isoamílicos (mg/L), isobutanol (mg/L), pentanodiona (μ g/L) y propionato etilo (mg/L). Se calculó la relación entre los alcoholes y los ésteres totales.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se han realizado las medias de las determinaciones analíticas de los parámetros estudiados, presentándose los resultados junto el error estándar de la diferencia (SED). Dado el gran número de variables a analizar, y con tal de limitar el error tipo I, se ha considerado estadísticamente significativo el valor $p \leq 0.01$.

Todos los análisis estadísticos tales como análisis de varianza (ANOVA), análisis de contraste, diagramas de barras y gráficos de las medias de mínimos cuadrados, se realizaron con el

paquete estadístico JMP®Pro16 (SAS institute Inc., Cary NC). El análisis de los componentes principales (PCA) se realizó mediante el programa SC-Biplot.

Cabe destacar que, para el análisis de las maltas, se ha realizado la media de las réplicas de malteado para cada combinación variedad × localidad, exceptuando en los análisis de los mostos cerveceros y cervezas del apartado 6.3.2, donde se han tratado los resultados individualmente para cada combinación malteado × PicoBrew, bajo la variable “Repetición industrial”.

Dada la amplitud del proyecto, cada ensayo ha requerido un modelo estadístico distinto y, con tal de facilitar la comprensión, éstos se exponen específicamente en las tablas de resultados de cada apartado de Resultados y discusión. Los modelos que se proponen, así como su interpretación, se basan en lo descrito por Bustos-Korts et al. (2018).

El cálculo de la heredabilidad en sentido amplio (H^2) para los parámetros de calidad de cebada, malta, mosto cervecero y cerveza se ha realizado según los cálculos descritos por Barriga et al. (1983) y Rutger et al. (1966):

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{(\sigma_g^2 + \left(\frac{\sigma_{ga}^2}{l}\right) + \left(\frac{\text{residuo}}{\text{rep} \times l}\right))}$$

Dónde:

σ_g : componente de varianza del genotipo

σ_{ga} : componente de varianza de la interacción entre el genotipo y el ambiente

l: localidades por años de estudio

rep: repeticiones

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO DE MICRO-MALTEADO

Con el objetivo de obtener malta de cebada a pequeña escala más representativa del proceso industrial, se propone un método alternativo de micro-malteado por medio de bolsas de malla enterradas en el lote industrial utilizando las instalaciones de la Maltería La Moravia. Para evaluar la eficacia y repetitividad del método alternativo, se llevaron a cabo dos experimentos: el primero trató de analizar la influencia de la posición de las bolsas de malla en la caja de germinación y comparar tres tipos de malteado (malteado industrial, un método conocido de micro-malteado a escala planta piloto y el método alternativo de micro-malteado por medio de bolsas de malla); el segundo experimento pretendió evaluar la eficacia del método propuesto de micro-malteado utilizando un mayor número de muestras, empleando un mayor número de variedades de cebada cultivadas en distintas localidades con el objetivo de evaluar la capacidad de discernir los efectos ambientales de los genotípicos.

Este capítulo ha sido publicado en la revista *Journal of the American Society of Brewing Chemists* bajo el título *Small Mesh-Bags within Industrial Malting Batches as a Simple Non-Expensive Alternative MicroMalting Technique* (ver apartado Anejo).

6.1.1. COMPARATIVA ENTRE EL MALTEADO A ESCALA INDUSTRIAL, EL MICRO-MALTEADO EN PLANTA PILOTO Y EL MICRO-MALTEADO EN BOLSAS DE MALLA

Se utilizaron tres variedades de cebada comercial (Pewter, Shakira y Shuffle) bajo las condiciones de malteado descritas en el apartado 5.2.1 (para el malteado industrial y el micro-malteado en bolsas de malla) y 5.2.2 (para la planta piloto) de Materiales y métodos. Dada la posibilidad de existir interacción alelopática entre el genotipo del lote industrial y el utilizado en las bolsas de malla (Kremer y Ben-Hammoude, 2009), el diseño que se utilizó fue el descrito en la **Figura 5.6** del apartado 5.2.3 de Materiales y métodos.

En la **Tabla 6.1** se presentan los valores medios y el error estándar de la diferencia (SED) de los parámetros analíticos analizados en las maltas malteadas en bolsas de malla, según genotipo industrial de la caja de germinación utilizada.

Tabla 6.1. Medias y error estándar de la diferencia (SED) de los parámetros de calidad analizados en las muestras de malta resultantes de las tres réplicas de las bolsas de malla enterradas en cada caja de germinación.

Genotipo en bolsa	Genotipo industrial	PT	Extracto	Viscosidad	PS	IK	FAN	PD	Friabilidad	pH	SC
Pewter	Pewter	10.83	80.54	1.47	4.33	40.0	151	225	87.40	5.96	6.80
	Shakira	10.87	80.42	1.47	4.32	39.7	158	231	88.73	5.98	6.40
	Shuffle	10.78	80.46	1.46	4.44	41.1	165	247	88.87	5.98	6.57
Shakira	Pewter	10.82	80.63	1.49	4.32	39.9	155	261	83.40	5.92	6.77
	Shakira	10.89	80.18	1.48	4.24	38.9	150	247	85.73	5.93	6.00
	Shuffle	10.98	80.51	1.48	4.22	38.5	151	251	85.00	5.91	5.77
Shuffle	Pewter	10.81	80.34	1.47	4.05	37.4	148	280	84.00	5.95	6.30
	Shakira	10.99	79.89	1.47	4.01	36.6	148	285	86.20	5.99	6.50
	Shuffle	10.98	79.71	1.48	4.01	36.5	141	274	84.53	5.98	5.37
SED		0.07	0.28	0.01	0.08	0.81	7	12	0.68	0.02	0.45

PT: proteína total (%); PS: proteína soluble (%); IK: índice Kolbach; FAN: aminonitrógeno libre (mg/Kg); PD: poder diastásico (WK/dm); SC: sobrecolor (EBC).

Al realizar el análisis de varianza, recogido en la **Tabla 6.2**, no se detectó ninguna interacción alelopática significativa para los parámetros de calidad de la malta analizados. Así como tampoco, ningún efecto significativo de la posición en la que se enterraron las bolsas de malla sobre los parámetros de calidad de la malta, excepto para el PD. Este hecho puede darse por la estructura de la caja de germinación, puesto que hay zonas donde se propicia una mayor humedad y temperatura durante la germinación, exponiendo al grano de malta verde a unas condiciones que favorecen el crecimiento y el proceso metabólico interno, produciéndose más enzimas amilasas (Hough et al., 1971; Joshi, 2018).

Tabla 6.2. Valores *p* del ANOVA de los parámetros de calidad de las muestras malteadas en bolsas de malla enterradas en distintas posiciones en la caja de germinación y de distinto genotipo al lote industrial.

	GL	PT	Extracto	Visc.	PS	IK	FAN	PD	Friab.	pH	SC
Posición X	2	0.5763	0.4807	0.1574	0.0471	0.0425	0.2832	0.0096	0.2051	0.9393	0.2859
Posición Y	2	0.3712	0.3333	0.8514	0.7572	0.7155	0.9192	0.0092	0.8130	0.9930	0.3138
Genotipo en bolsa	2	0.2753	0.0867	0.0017	<0.0001	0.0001	0.1041	<0.0001	<0.0001	0.0185	0.3227
Genotipo industrial	2	0.2392	0.3082	0.5365	0.7001	0.4637	0.9922	0.8798	0.0116	0.4024	0.1646
Interacción	4	0.4869	0.7977	0.5370	0.6558	0.4376	0.5511	0.2116	0.7266	0.9206	0.5726

X e Y: efecto de la posición de la bolsa en el lote industrial; Genotipo industrial: influencia potencial del genotipo de la caja de germinación industrial sobre el genotipo utilizado en la bolsa; Interacción: genotipo en bolsa × genotipo industrial; GL: grados de libertad; PT: proteína total; Visc.: viscosidad; PS: proteína soluble; IK: índice Kolbach; FAN: aminonitrógeno libre; PD: poder diastásico; Friab.: friabilidad; SC: sobrecolor.

Un hecho destacable, son las diferencias significativas entre los genotipos estudiados para los parámetros analíticos de la malta (**Tabla 6.2**), tales como la viscosidad, PS, IK, PD y friabilidad. Esta observación nos indica que el método alternativo de micro-malteado propuesto es válido, puesto que nos permite diferenciar entre genotipos. Aunque para verificar el método, se compararon el método industrial con un micro-malteado conocido en planta piloto y el método alternativo en bolsas de malla. En la **Tabla 6.3** se recogen los valores medios para los

parámetros de calidad de las maltas obtenidas en cada tipo de malteado. Podemos ver como en planta piloto se sobreestiman ligeramente los valores de extracto, PS, IK, FAN, pH y SC, puesto que son levemente superiores a los obtenidos a escala industrial y en las bolsas de malla. Por el contrario, por medio de las bolsas de malla se obtuvieron valores ligeramente más bajos de viscosidad respecto al lote industrial. Paralelamente, si observamos el contenido de proteína total, el obtenido en el malteado en planta piloto y por medio de las bolsas de malla es significativamente menor al obtenido a escala industrial. Cabe destacar que, en cervecería, dos de los parámetros con mayor importancia son el FAN y el PD, el primero por ser fuente de nutrientes para la levadura durante la fermentación y el segundo por asegurar un contenido adecuado de enzimas (Henry y McLean, 1984). En este caso, los resultados sugieren que por medio de la planta piloto obtendríamos maltas de baja calidad para elaborar cerveza, puesto que el parámetro FAN quedaría sobreestimado y el PD infraestimado respecto al lote industrial.

Tabla 6.3. Medias y error estándar de la diferencia (SED) de los parámetros de calidad analizados en las muestras de malta, de las tres variedades de cebada, dependiendo del tipo de malteado empleado.

Tipo de malteado	Genotipo	PT	Extracto	Viscosidad	PS	IK	FAN	PD	Friabilidad	pH	SC
Bolsas	Pewter	10.83	80.48	1.46	4.36	40.3	158	234	88.33	5.97	6.59
	Shakira	10.90	80.44	1.48	4.26	39.1	152	253	84.71	5.92	6.18
	Shuffle	10.93	79.98	1.47	4.02	36.8	146	280	84.91	5.97	6.05
Industrial	Pewter	11.22	79.52	1.52	4.50	40.1	176	242	83.60	5.95	7.20
	Shakira	11.11	80.00	1.53	4.38	39.5	164	260	84.00	5.97	5.80
	Shuffle	11.48	80.15	1.53	4.27	37.2	161	274	83.40	5.95	5.80
PP	Pewter	10.75	82.36	1.46	5.26	48.9	229	219	n.d.	5.83	12.0
	Shakira	10.93	82.26	1.60	5.49	50.3	230	240	n.d.	5.80	12.6
SED		0.13	0.46	0.01	0.12	1.35	11	19	1.38	0.33	0.79

PP: planta piloto; PT: proteína total (%); PS: proteína soluble (%); IK: índice Kolbach; FAN: aminonitrógeno libre (mg/Kg); PD: poder diastásico (WK/dm); SC: sobrecolor (EBC); n.d.: no determinado.

Con tal de clarificar las diferencias entre los tres tipos de malteado, se realizó un análisis de contrastes entre ellos (**Tabla 6.4**). Observamos que la escala industrial presenta menos diferencias significativas con el micro-malteado en bolsas de malla que con el realizado en la planta piloto. Si nos centramos en el contraste entre el micro-malteado en bolsas de malla y la escala industrial, se detectaron diferencias significativas para los valores de PT, friabilidad y viscosidad. Los dos primeros mantienen una relación inversamente proporcional, es decir, a mayor contenido de proteína menor es la friabilidad del grano, coincidiendo con lo descrito por Huerta Zurita et al. (2018), puesto que como se observa en la **Tabla 6.3**, la malta obtenida a escala industrial tiene un mayor contenido de proteína total. Por otro lado, en el caso de la viscosidad, el hecho que los valores más bajos se den en el micro-malteado en bolsas de malla puede venir dado por la situación de las bolsas de malla en la caja de germinación durante el secado-tostado. Las bolsas de malla quedan enterradas en la parte más superficial del lecho de malta en la caja de germinación, exponiéndose así a temperaturas ligeramente superiores durante estas etapas respecto la totalidad del lote industrial. Guido et al. (2007) también observaron diferencias en los parámetros analíticos de la malta según si provenían de la parte

superior o inferior de la caja de germinación. Skendi y Papageorgiou (2018) también observaron un descenso de la viscosidad al aumentar la temperatura que se aplicaba durante el secado-tostado. Otra explicación posible, como describe Bathgate (1983), podría ser por la relación indirectamente proporcional que existe entre la viscosidad y la friabilidad: a mayor friabilidad y modificación del grano, menor viscosidad. Como se observa en la **Tabla 6.3**, las maltas obtenidas por medio del micro-malteado en bolsas de malla tienden levemente a tener una mayor friabilidad respecto las muestras del lote industrial.

En el caso del contraste entre el micro-malteado en planta piloto y el realizado en bolsas de malla, se observan diferencias significativas para los parámetros extracto, viscosidad, PS, IK, FAN, pH y SC. Se observan las mismas diferencias, exceptuando el extracto, si analizamos el contraste entre la planta piloto y la escala industrial. Es decir, nuestras muestras de malta han resultado con una peor calidad al realizar el proceso de malteado en planta piloto respecto los otros dos métodos estudiados.

Tabla 6.4. Valores *p* del análisis de contraste entre los tres tipos de malteado para los parámetros de calidad de las maltas obtenidas.

Contraste	PT	Extracto	Visc.	PS	IK	FAN	PD	Friab.	pH	SC
Industrial vs. Bolsas	<0.0001	0.1595	<0.0001	0.0342	0.8269	0.0296	0.8043	0.0100	0.9570	0.9879
Industrial vs. PP	0.0197	<0.0001	0.5433	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2659		0.0002	<0.0001
Bolsas vs. PP	0.8251	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.3212		<0.0001	<0.0001

PP: planta piloto; PT: proteína total; Visc.: viscosidad; PS: proteína soluble; IK: índice Kolbach; FAN: aminonitrógeno libre; PD: poder diastásico; Friab.: friabilidad; SC: sobrecolor.

Para entender la variabilidad en los parámetros de calidad de la malta dependiendo del tipo de malteado empleado, se realizó el análisis de los componentes principales (PCA). Como podemos observar en la **Figura 6.1**, los dos primeros ejes (PCA1 y PCA2) explican el 91.61% de la varianza total. El primer eje, el cual explica cerca del 75% de la variabilidad, discrimina claramente los métodos de malteado, viéndose la planta piloto totalmente al lado opuesto de los otros dos tipos estudiados. Además, se observa como los parámetros de calidad extracto, viscosidad, SP, IK, FAN y SC están más relacionados con el malteado en planta piloto, coincidiendo con los resultados expuestos en la **Tabla 6.3**. Por lo que respecta al segundo eje, que explica cerca del 16% de la varianza total, podemos ver como los perfiles varietales relativos son los mismos independientemente del tipo de malteado.

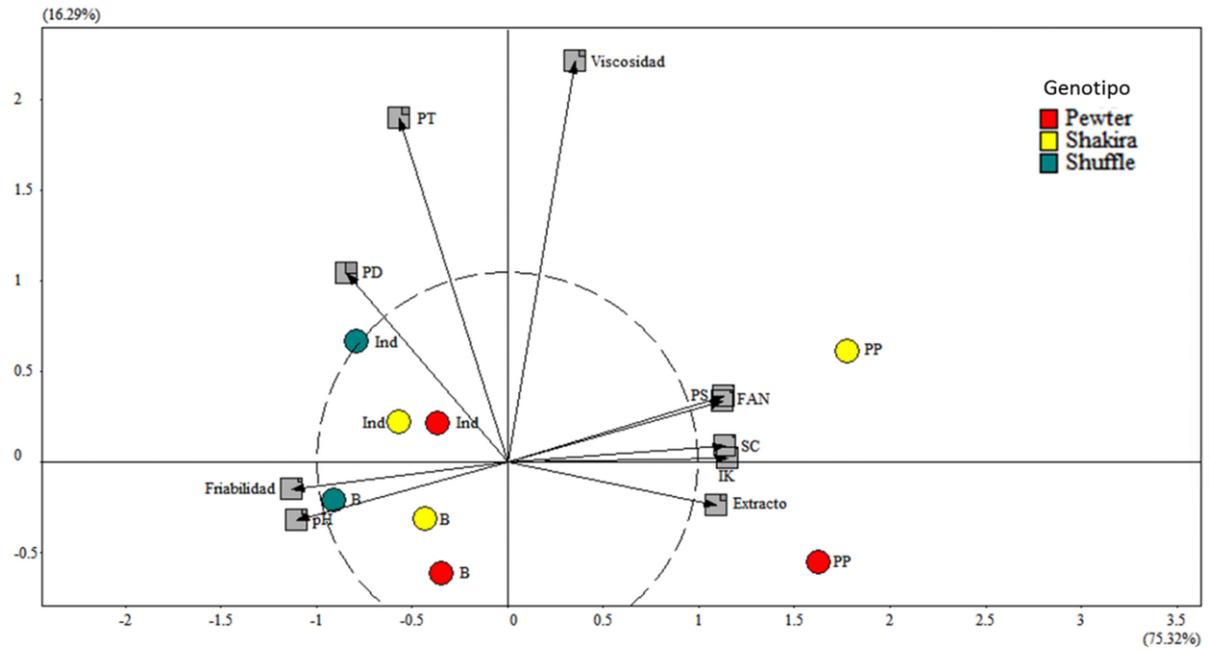


Figura 6.1. Resultado del PCA para los parámetros de calidad de la malta obtenida en cada tipo de malteado para los tres genotipos estudiados. El color de los círculos identifica el genotipo. Ind: malteado industrial; PP: micro-malteado en planta piloto; B: micro-malteado en bolsas de malla; PT: proteína total; PS: proteína soluble; IK: índice Kolbach; FAN: aminonitrógeno libre; PD: poder diastásico; SC: sobrecolor.

6.1.2. EVALUACIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO DE MICRO-MALTEADO POR MEDIO DE BOLSAS DE MALLA

Para este experimento se emplearon seis variedades comerciales de cebada (Basic, Pewter, Planet, Shakira, Shuffle y Traveler) malteadas bajo las condiciones descritas en el apartado 5.2.3 y el diseño dibujado en la **Figura 5.7** y **5.8** de Materiales y métodos.

Con tal de conocer la importancia relativa del genotipo frente al efecto ambiental sobre los parámetros de calidad de la malta, se calculó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) o repetibilidad (Rutger et al., 1966). En la **Tabla 6.5** se muestra la estimación de los componentes de varianza genotipo, ambiente y su interacción ($G \times A$) según un modelo completamente aleatorio, así como la estimación de la heredabilidad, para las muestras de malta obtenidas en bolsas de malla. El componente genético fue especialmente relevante para PS, IK, FAN, PD, pH y SC, con valores de H^2 de 0.91, 0.76, 0.77, 0.84, 0.83 y 0.81 respectivamente. Por tanto, en nuestras muestras, estos parámetros tuvieron una baja influencia ambiental, coincidiendo con Eagles et al. (1995) y Rutger et al. (1966). De manera contraria, la proteína total y la friabilidad presentaron una H^2 baja, 0.38 y 0.31 respectivamente, mostrando una alta influencia ambiental. Respecto el extracto y la viscosidad, los valores de H^2 fueron 0.59 y 0.56 respectivamente, por lo que podemos considerar que el efecto ambiental y genotípico ha resultado ser similar. Estos resultados indican que el método alternativo de micro-malteado por medio de bolsas de malla nos permite detectar diferencias entre genotipos y zonas de cultivo.

Para este proyecto era de vital importancia detectar las diferencias genotípicas entre las muestras malteadas por medio de las bolsas de malla. Para ello se realizó una comparación estadística entre los valores medios de los genotipos malteados en bolsas de malla y los valores medios de un conjunto de lotes industriales malteados durante el mismo periodo y de los mismos genotipos estudiados. En la **Tabla 6.6** podemos observar que por medio del micro-malteado en bolsas de malla se puede detectar un efecto varietal significativo sobre los parámetros PS, IK, FAN, PD y SC, sin tener un efecto significativo de la interacción entre el genotipo y el tipo de malteado (genotipo \times tipo). Es decir, la diferencia genotípica no se ve sesgada por el tipo de malteado empleado, puesto que las diferencias genotípicas son las mismas malteando a escala industrial o bien a pequeña escala mediante bolsas de malla.

Los resultados sugieren que el malteado mediante bolsas de malla es un método que no interfiere en la calidad de los lotes industriales y que se puede considerar viable. Además, las cantidades que contienen las bolsas de malla son extremadamente mínimas comparadas con el lote industrial, puesto que las bolsas de malla contienen unos pocos kg frente a las 200 t del lote industrial.

Tabla 6.5. Repetitividad (H^2) y estimaciones de los componentes de varianza aleatorios de las muestras de malta de seis genotipos de cebada cultivados en cinco ambientes distintos.

Random effect	PT	Extracto	Viscosidad	PS	IK	FAN	PD	Friabilidad	pH	SC
H^2	0.38	0.59	0.56	0.91	0.76	0.77	0.84	0.31	0.83	0.81
Genotipo	0.19	0.29	0.00	0.13	7.28	106	881	8.37	0.00	0.34
Ambiente	3.04	1.85	0.01	0.11	19.50	136	1055	162	0.01	0.63
Genotipo x Ambiente	0.34*	0.51*	0.00	0.02	0.96	-62.50	130	-3.04	0.00	-0.07
Residuo	0.13	0.36	0.00	0.04	5.67	354	1200	53	0.00	0.35

H^2 : repetitividad; PT: proteína total; PS: proteína soluble; IK: índice Kolbach; FAN: amino nitrógeno libre; PD: poder diastásico; SC: sobrecolor. *: valor $p \leq 0.01$.

Tabla 6.6. Significancia del genotipo y análisis de los componentes de varianza para los parámetros de calidad de la malta usando la prueba de probabilidad de relación con un grado de libertad (χ^2) para la interacción entre el genotipo y el tipo de malteado (Industrial vs. Bolsas de malta).

Término aleatorio	Extracto		Viscosidad		PS		IK		FAN		PD		Friabilidad		pH		SC			
	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value	χ^2	p-value		
Genotipo	4.42	0.04	3.27	0.07	2.62	0.11	19.86	<0.0001	14.65	0.0001	13.88	0.0002	12.86	0.0003	1.50	0.22	0.08	0.78	6.52	0.01
Genotipo x Tipo	0.08	0.78	0.16	0.69	0.52	0.47	0.92	0.34	1.04	0.31	0.06	0.81	2.14	0.14	0.01	0.92	1.32	0.25	0.72	0.40

PT: proteína total; PS: proteína soluble; IK: índice Kolbach; FAN: amino nitrógeno libre; PD: poder diastásico; SC: sobrecolor.

6.2. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE UN MÉTODO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA A PEQUEÑA ESCALA

Con el objetivo de elaborar cerveza a partir de las muestras experimentales de cebada malteada y dado el gran número de muestras que incluía esta Tesis, se dispuso de dos equipos PicoBrew Z series (PicoBrew Inc., Seattle, Washington, Estados Unidos) para poder realizar dos elaboraciones paralelamente en un mismo día. Por ello resultó importante evaluar si las elaboraciones obtenidas en ambos equipos eran comparables entre ellas y verificar si el proceso de elaboración era reproducible.

Se utilizaron las variedades Basic y Shakira de 2018 y Basic y Pewter de 2019, todas ellas cultivadas en Bell-lloc d'Urgell. En el apartado 5.3 de Materiales y métodos queda recogido el método de elaboración de mosto cervecero.

Los valores de los parámetros analíticos determinados en los mostos cerveceros quedan recogidos en la **Tabla 6.7** y la **Tabla 6.8**. Como se observa, existe variación entre equipo PicoBrew para un mismo genotipo, mostrando la existencia de variabilidad entre los dos equipos. Cabe resaltar que esta variabilidad se podría solucionar realizando elaboraciones a partir de muestras testigo en ambos equipos, lo que nos podría permitir conocer las desviaciones con tal de aplicar una posible corrección. Sin embargo, este hecho sería un inconveniente si las diferencias fueran significativas, ya que la intención es poder elaborar un gran número de muestras de manera aleatoria entre ambos equipos y poder comparar las muestras de mostos y cervezas obtenidas.

Para analizar las variables implicadas en la posible variabilidad entre equipos y muestras, se realizó el ANOVA para los parámetros analíticos. En la **Tabla 6.9** se observa un efecto estadísticamente significativo de la variable año sobre el contenido de β -glucanos, presuntamente indicando que mediante el equipo PicoBrew se puede llegar a discernir entre años de cultivo. Puesto que con el valor $p \leq 0.01$ se observan pocas diferencias, en la **Tabla 6.9** se ha resaltado en cursiva aquellos valores entre 0.05 y 0.01. Se puede ver un efecto significativamente bajo del año sobre los sulfatos, ácido aspártico y prolina, así como del equipo PicoBrew empleado sobre los °Balling y el contenido de β -glucanos. La variable variedad en año (Variedad [Año]) forma parte del modelo puesto que se han analizado mostos de variedades distintas según el año, resultando levemente significativa sobre el contenido de β -glucanos.

Tabla 6.7. Resultados de los parámetros de calidad de los mostos elaborados a partir de las muestras del año 2018. Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	Basic		Shakira		SED
	Malteado 1	Malteado 2	Malteado 1	Malteado 2	
	PicoBrew 2	PicoBrew 1	PicoBrew 1	PicoBrew 2	
Amargos (IBU)	71	47	40	28	15
β-glucanos (mg/L)	45	88	105	43	18
°Balling (° P)	13.9	12.5	13.0	14.3	0.4
Calcio (mg/L)	36	25	34	32	4
Cloruros (mg/L)	242	269	258	240	32
Color (EBC)	12	10	11	10	1
FAN (mg/L)	167	162	151	187	14
Fosfatos (mg/L)	644	700	608	663	67
Magnesio (mg/L)	69.8	62.3	65.1	72.9	4.6
Nitratos (mg/L)	2.0	0.3	2.2	2.1	0.6
Oxalatos (mg/L)	3.4	5.9	n.d.	3.1	2.1
pH	5.90	6.01	6.03	5.98	0.07
Sulfatos (mg/L)	115	82	120	118	12
Zinc (mg/L)	281	214	256	310	20
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>					
Ácido aspártico	32	64	58	70	17
Ácido glutámico	34	76	78	83	18
Alanina	49	92	93	109	21
Arginina	50	75	91	126	19
Asparagina	104	162	201	251	32
Cistina	7	n.d.	12	12	6
Fenilalanina	52	89	89	120	21
Glicina	21	39	40	46	8
Glutamina	399	265	715	986	178
Hidroxiprolina	32	59	35	36	14
Histidina	25	41	44	56	8
Isoleucina	29	57	47	64	14
Leucina	54	92	90	119	21
Lisina	35	61	64	85	14
Metionina	12	24	21	27	9
Prolina	297	207	328	407	105
Serina	32	53	56	71	11
Tirosina	41	71	70	95	17
Treonina	29	49	54	69	11
Triptófano	22	43	41	50	11
Valina	52	89	84	109	20

n.d.: no determinado.

Tabla 6.8. Resultados de los parámetros de calidad de los mostos elaborados a partir de las muestras del año 2019. Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	Basic		Pewter		SED
	Malteado 1	Malteado 2	Malteado 1	Malteado 2	
	PicoBrew 2	PicoBrew 1	PicoBrew 2	PicoBrew 1	
Amargos (IBU)	42	37	35	61	15
β-glucanos (mg/L)	88	189	192	244	18
°Balling (° P)	13.4	12.8	13.1	11.0	0.4
Calcio (mg/L)	39	37	30	31	4
Cloruros (mg/L)	342	288	313	254	32
Color (EBC)	12	9	8	8	1
FAN (mg/L)	150	141	174	128	14
Fosfatos (mg/L)	638	572	734	557	67
Magnesio (mg/L)	75.3	79.2	73.4	62.4	4.6
Nitratos (mg/L)	2.2	2.0	2.0	2.0	0.6
Oxalatos (mg/L)	6.0	1.7	6.2	3.6	2.1
pH	5.98	6.06	6.18	6.08	0.07
Sulfatos (mg/L)	161	131	154	121	12
Zinc (mg/L)	307	302	318	293	20
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>					
Ácido aspártico	80	122	87	105	17
Ácido glutámico	81	78	79	64	18
Alanina	93	86	97	76	21
Arginina	82	70	88	59	19
Asparagina	231	216	256	243	32
Cistina	n.d.	n.d.	17	n.d.	6
Fenilalanina	90	81	87	66	21
Glicina	39	37	41	33	8
Glutamina	629	948	868	814	178
Hidroxiprolina	31	41	54	35	14
Histidina	45	46	43	38	8
Isoleucina	46	41	45	36	14
Leucina	88	81	83	65	21
Lisina	57	64	61	55	14
Metionina	17	16	20	n.d.	9
Prolina	493	716	714	793	105
Serina	57	53	50	42	11
Tirosina	73	66	72	55	17
Treonina	52	47	50	40	11
Triptófano	43	39	50	39	11
Valina	89	80	85	68	20

n.d.: no determinado.

Tabla 6.9. Valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de los mostos elaborados en dos equipos PicoBrew a partir de muestras de cebada malteada procedente de dos años de cultivo consecutivos.

	Año		Picobrew	Variedad [Año]
	GL	1	1	2
Amargos		0.8155	0.8484	0.3547
β -glucanos		0.0035	<i>0.0150</i>	<i>0.0485</i>
$^{\circ}$ Balling		0.0754	<i>0.0219</i>	0.1705
Calcio		0.4586	0.4428	0.2912
Cloruros		0.1333	0.5129	0.6529
Color		0.1912	0.2652	0.4001
FAN		0.1632	0.0971	0.8870
Fosfatos		0.5945	0.2944	0.7439
Magnesio		0.2196	0.1847	0.2524
Nitratos		0.4124	0.3638	0.3677
Oxalatos		0.4581	0.3003	0.4168
pH		0.1344	0.5075	0.3242
Sulfatos		<i>0.0318</i>	0.0733	0.3327
Zinc		0.0658	0.0741	0.3355
<i>Aminoácidos</i>				
Ácido aspártico		<i>0.0363</i>	0.1872	0.6451
Ácido glutámico		0.5846	0.7331	0.4360
Alanina		0.8881	0.9875	0.4418
Arginina		0.4838	0.4144	0.1981
Asparagina		0.0865	0.8395	0.1237
Cistina		0.4481	0.2325	0.2546
Fenilalanina		0.6945	0.7163	0.3778
Glicina		0.8775	0.9385	0.4154
Glutamina		0.1747	0.7996	0.1328
Hidroxiprolina		0.9810	0.6896	0.6685
Histidina		0.8175	1.0000	0.2570
Isoleucina		0.5171	0.9444	0.6898
Leucina		0.5642	0.8032	0.3974
Lisina		0.8539	0.8900	0.3090
Metionina		0.3258	0.6103	0.6760
Prolina		<i>0.0155</i>	0.6841	0.3336
Serina		0.7706	0.8604	0.2662
Tirosina		0.8355	0.7220	0.4030
Treonina		0.7253	0.7688	0.2604
Triptófano		0.6471	0.9256	0.5172
Valina		0.8428	0.8173	0.4764

GL: grados de libertad; Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Las variables seleccionadas para llevar a cabo el análisis del PCA han sido aquellas que han resultado con un valor de $p \leq 0.05$ tras el ANOVA (**Tabla 6.9**), dado que tan solo se ha obtenido un parámetro con valores de $p \leq 0.01$. En la **Figura 6.2** se muestra el análisis multivariante dónde se puede observar que el 66.69% de la variabilidad total entre las muestras quedaría explicado en el PCA1 y el 24.71% por el PCA2. Si nos centramos en el PCA1, se observa claramente como las muestras del año 2019 se sitúan a la derecha del eje principal, mientras que las de 2018 quedan a la izquierda, asociándose principalmente a los parámetros °Balling y sulfatos. Referente al PCA2, se pueden diferenciar los equipos PicoBrew, dibujándose en la parte superior del eje principal el equipo 2 y en la parte inferior el equipo 1. Esta variabilidad para estar asociada principalmente al contenido de β -glucanos, sulfatos y °Balling.

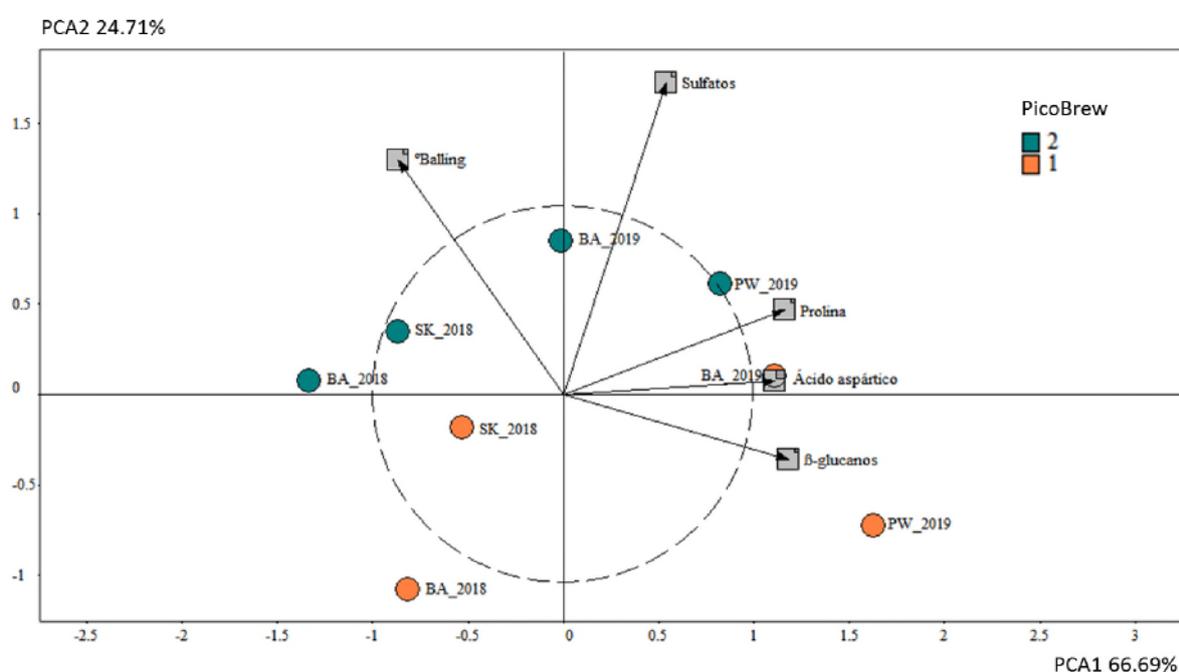


Figura 6.2. Resultado del PCA para los parámetros de calidad significativos de los mostos elaborados. El color de los círculos identifica el equipo PicoBrew. BA: basic; PW: pewter; SK: shakira.

En la **Tabla 6.10** se muestran los resultados del ANOVA de los ejes del PCA con tal de determinar la magnitud de las asociaciones observadas en la **Figura 6.2**. La única variable que se puede asociar significativamente a la variabilidad observada en el PCA1 es el año. Por otro lado, las variables PicoBrew se pueden asociar significativamente de forma leve ($p \leq 0.05$) tanto a la variabilidad del PCA1 como a la del PCA2. Cabe resaltar, que al analizar los parámetros de manera conjunta no se ha detectado ningún efecto significativo de la variedad que pueda explicar la variabilidad entre las muestras estudiadas.

Tabla 6.10. Valores p del ANOVA de los ejes de los componentes principales uno y dos (PCA1 y PCA2) del PCA para los mostos elaborados.

	GL	PCA1	PCA2
Año	1	<i>0.0019</i>	0.1083
PicoBrew	1	<i>0.0271</i>	<i>0.0145</i>
Variedad [Año]	2	0.1079	0.1230

GL: grados de libertad. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Utilizar dos equipos PicoBrew simultáneamente resulta interesante, puesto que permite realizar dos elaboraciones de mosto cervecero paralelamente, reduciendo el tiempo que se requirió para elaborar todas las muestras necesarias para esta Tesis. Pero es cierto que se ha comprobado cierta discrepancia entre elaboraciones que partían de muestras de malta que, aparentemente, debían haber resultado en mostos muy similares. Sin embargo, mediante este método de elaboración se puede detectar diferencias entre años, y esta variable no tan solo viene dada por las condiciones ambientales, sino que también recoge las diferencias en el proceso de malteado que fueron distintas entre años (apartado 5.2.3 de Materiales y métodos). Por ello, y puesto que se ha elaborado mosto a partir de cada réplica de malteado en un solo equipo, la variabilidad atribuida al equipo PicoBrew incluye también un efecto del malteado.

Los resultados de esta parte del trabajo nos advierten de la necesidad de tratar el equipo PicoBrew y la réplica de malteado como una variable conjunta, ya que ambos factores nos muestran la variabilidad de la repetición industrial. Es decir, la variabilidad del proceso industrial puede venir dada por las distintas variables del propio proceso de malteado o bien por las diferencias detectadas entre los dos equipos PicoBrew empleados.

6.3. IMPLICACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN CON NITRÓGENO

Con el fin de conocer con mayor profundidad y detalle la implicación de la fertilización con nitrógeno sobre los compuestos aromáticos de la cerveza, se ha estudiado su efecto sobre compuestos relacionados e implicados en el aroma y sabor final, tanto en cebada y malta como en mosto cervecero y cerveza. Para ambas partes de este estudio, el manejo del cultivo queda descrito en el apartado 5.1.2.2, las condiciones de malteado en el apartado 5.2.3 y todo lo referente a la elaboración de cervezas en el apartado 5.3, todos en Materiales y métodos.

6.3.1. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON NITRÓGENO SOBRE EL PERFIL FENÓLICO DE CEBADA Y MALTA

Se utilizaron seis variedades de cebada (Basic, Pewter, Planet, Shakira, Shuffle y Taveler), cultivadas bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno (N_0 y N_{150}), en la localidad de Bell-lloc d'Urgell (Lleida, Catalunya, España) durante dos campañas consecutivas (2017-2018 y 2018-2019).

Con tal de evaluar la eficacia de la fertilización con nitrógeno aplicada sobre los cultivos de cebada, se analizó por medio de la determinación del contenido de proteína total, cuyas concentraciones medias y error estándar de la diferencia se muestran en **Tabla 6.11**, así como los valores p del ANOVA. Analizando los resultados, se observa como las diferencias en el contenido proteico tan solo se veían influenciadas significativamente (valor $p \leq 0.01$) por la aplicación de nitrógeno, es decir, la proteína total del grano de cebada era mayor en las muestras cultivadas bajo fertilización con nitrógeno, hecho que coincide con los resultados obtenido por Marconi et al. (2011) y Oscarsson et al. (1998), entre otros. Por lo que, tras considerar eficaz la fertilización con nitrógeno, se evaluó el perfil fenólico de las muestras de cebada y sus correspondientes maltas.

Tabla 6.11. Concentración media de proteína total (% m/m) y error estándar de la diferencia (SED), así como valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de las seis variedades de cebada cultivadas bajo dos condiciones nitrogenadas distintas durante dos años.

		2018	2019	SED
N ₀	Basic	9.31	9.10	0.15
	Pewter	9.37	9.63	0.18
	Planet	9.01	9.29	0.20
	Shakira	9.43	10.88	1.03
	Shuffle	8.96	10.09	0.80
	Traveler	9.54	9.73	0.13
N ₁₅₀	Basic	10.08	10.23	0.11
	Pewter	10.75	11.15	0.28
	Planet	9.29	9.20	0.06
	Shakira	10.54	11.49	0.67
	Shuffle	10.20	9.91	0.21
	Traveler	10.30	10.52	0.16
Modelo fijo		GL	Valor p	
Año (A)		1	<i>0.0358</i>	
Nitrógeno (N)		1	0.0019	
Genotipo (G)		5	<i>0.0155</i>	
A × N		1	0.3091	
A × G		5	0.2520	
N × G		5	0.2343	

A: año; N: nitrógeno; G: genotipo; GL: grados de libertad. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A × N × G) se ha utilizado como término error. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Primeramente, se estudió la fracción fenólica de las muestras de cebada, las concentraciones (mg/kg peso seco) para cada compuesto detectado quedan recogidas en las **Tablas 6.12 a 6.15**. En los genotipos de cebada estudiados, las familias mayoritarias han resultado ser los ácidos fenólicos y los flavan-3-oles, mientras que las flavonas glicosiladas han sido un grupo minoritario. En ambos años de estudio parece ser que el mayor contenido de fenoles totales se ha dado en las cebadas cultivadas bajo fertilización nitrogenada (N₁₅₀), sobre todo en el año 2018, en el cual se aprecian diferencias más marcadas entre tratamientos nitrogenados. De la misma manera, podemos apreciar que las muestras del año 2018 resultaron con un mayor contenido fenólico que las muestras del 2019.

Si observamos el comportamiento de los genotipos estudiados, parece ser que en 2018 la variedad con mayor contenido fenólico total fue la variedad Traveler N₁₅₀ y la de menor contenido Shuffle N₀. En cambio, en 2019 la variedad con un mayor contenido fue Planet N₁₅₀ y la de menor Traveler N₁₅₀. Por lo que, a grandes rasgos, parece ser que existen diferencias en el comportamiento entre variedades frente al año de cultivo y la aplicación nitrogenada.

Tabla 6.12. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el primer año (2018) sin fertilización con nitrógeno (N₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).

	N ₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	1554	1851	1743	1712	1630	1769	94
Ácidos hidroxibenzoicos	51.3	55.2	54.6	53.4	48.1	55.6	2.8
Ácido hidroxibenzoico	14.3	15.4	15.1	13.8	14.6	15.1	0.6
Ácido dihidroxibenzoico	5.69	2.49	5.67	5.65	2.44	4.12	0.59
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Ácido siríngico	11.1	11.7	11.7	11.2	10.5	11.5	0.4
Siringaldehído	6.8	8.3	8.1	7.6	7.3	8.5	0.5
Ácido vanílico	13.4	17.4	14.1	15.1	13.3	16.4	1.4
Ácidos hidroxicinámicos	1502	1796	1688	1659	1582	1714	92
Ácido cinámico	2.32	2.36	2.39	2.32	2.32	2.33	0.03
Ácido cumárico	427	476	567	567	485	476	54
Ácido cafeico y derivados	14.8	13.6	11.5	12.1	14.6	11.8	1.4
Ácido cafeico y derivados	14.8	11.3	9.2	9.8	14.6	9.5	1.3
Cafeoil hexosa	n.d.	2.3	2.2	2.2	n.d.	2.3	0.3
Ácido ferúlico y derivados	1058	1304	1108	1077	1080	1224	64
Ácido ferúlico y derivados	730	877	706	745	770	796	50
Ácido isoferúlico	191	257	262	185	178	262	12
Feruloil pentosa	0.25	0.11	0.10	0.13	0.29	0.14	0.02
Ácido diferúlico	92	116	99	101	89	116	8
Ácido triferúlico	6.99	7.64	5.47	6.80	7.28	7.46	0.40
Ácido diferúlico DC	13.7	15.1	13.5	15.5	14.9	15.8	2.2
Ácido sinápico	11.0	11.7	10.0	11.3	9.2	10.5	1.0
Sinapoil hexosa	12.3	18.8	11.1	11.9	11.3	16.0	1.9
Flavan-3-oles	699	651	665	622	590	600	21
<i>Catequina y derivados</i>	260	236	258	217	218	219	10
Catequina	111	91	99	69	80	57	5
Epicatequina	3.98	9.98	10.70	n.d.	n.d.	5.99	0.55
Glucósido de catequina	108	104	112	113	108	126	5
C-C-GC/GC-C-C	19.6	17.5	19.4	16.3	15.0	15.9	1.1
C-GC-C	17.9	14.0	16.2	18.7	14.5	14.7	1.5
<i>Oligómeros</i>	439	415	407	405	372	381	13
Dímero procianidina	176	165	174	178	169	176	6
Dímero prodelfinidina	236	221	207	201	175	171	7
Diglucósido de procianidina	6.6	11.5	10.2	7.3	10.5	15.7	0.5
Trímer procianidina	13.2	11.8	12.8	15.1	14.5	15.0	0.6
Trímer prodelfinidina	6.45	4.76	3.71	4.21	3.50	3.66	0.39
Flavonas glicosiladas	17.8	22.9	16.9	16.9	15.4	16.3	0.4
<i>Luteolina y derivados</i>	15.0	18.1	13.9	13.2	12.9	13.2	0.3
Glucósido de luteolina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Isoorientina	2.69	2.86	2.77	2.76	2.61	2.74	0.03
Glucósido de isoscoparina	9.3	10.3	7.9	7.4	7.5	7.8	0.3
Rutinósido de isoscoparina	2.83	4.49	2.98	2.64	2.64	2.59	0.05
Glucósido feruloil isoorientina	0.13	0.48	0.19	0.39	0.19	0.14	0.03
<i>Apigenina y derivados</i>	2.86	4.76	3.04	3.68	2.44	3.05	0.16
Glucósido de apigenina	1.71	2.59	2.05	2.26	1.68	2.04	0.15
Glucósido de isovitexina	0.22	0.27	0.09	0.20	0.10	0.12	0.03
Rutinósido de isovitexina	0.39	0.47	0.50	0.34	0.33	0.29	0.05
Glucósido feruloil isovitexina	0.36	1.05	0.21	0.65	0.20	0.51	0.03
Glucósido sinapoil isovitexina	0.17	0.38	0.19	0.23	0.13	0.09	0.02
FENOLES TOTALES	2270	2525	2424	2351	2236	2386	98

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Tabla 6.13. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el primer año (2018) bajo fertilización con nitrógeno (N₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).

	N ₁₅₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	2203	2157	2444	2062	2817	2960	94
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	59.8	62.5	67.3	53.0	67.5	77.2	2.8
Ácido hidroxibenzoico	17.4	17.5	19.1	16.4	18.5	20.7	0.6
Ácido dihidroxibenzoico	2.64	2.63	4.25	2.65	5.71	5.93	0.59
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Ácido siríngico	12.3	12.4	12.9	12.0	12.7	13.2	0.4
Siringaldehído	10.7	8.7	10.1	6.6	9.5	12.0	0.5
Ácido vanílico	16.7	21.3	21.0	15.3	21.0	25.3	1.4
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	2144	2095	2376	2009	2749	2883	92
Ácido cinámico	2.47	2.34	2.39	2.42	2.38	2.44	0.03
Ácido cumárico	511	414	932	711	1093	945	54
Ácido cafeico y derivados	23.4	29.1	18.8	16.2	27.7	23.3	1.4
Ácido cafeico y derivados	18.6	24.4	16.4	13.8	23.0	18.6	1.3
Cafeoil hexosa	4.8	4.7	2.4	2.5	4.7	4.7	0.3
Ácido ferúlico y derivados	1607	1649	1424	1280	1627	1912	64
Ácido ferúlico y derivados	1100	1118	905	905	1129	1174	50
Ácido isoferúlico	303	316	302	219	270	455	12
Feruloil pentosa	0.22	0.16	0.35	0.23	0.52	0.49	0.02
Ácido diferúlico	152	161	161	111	169	205	8
Ácido triferúlico	4.35	5.20	9.68	4.53	8.71	8.99	0.40
Ácido diferúlico DC	13.6	18.1	17.7	13.5	19.6	22.3	2.2
Ácido sinápico	14.7	12.0	14.2	9.9	11.3	22.7	1.0
Sinapoil hexosa	18.3	19.3	13.8	17.0	17.9	23.8	1.9
Flavan-3-oles	611	674	688	645	727	628	21
<i>Catequina y derivados</i>	245	229	260	235	273	221	10
Catequina	124	84	94	83	103	68	5
Epicatequina	n.d.	n.d.	5.52	6.56	7.36	7.95	0.55
Glucósido de catequina	92	112	125	113	127	112	5
C-C-GC/GC-C-C	14.6	18.1	18.0	16.6	18.2	17.9	1.1
C-GC-C	14.6	14.0	17.3	15.9	17.1	14.4	1.5
<i>Oligómeros</i>	366	445	427	409	454	407	13
Dímero procianidina	145	171	188	179	200	189	6
Dímero prodelfinidina	197	239	207	198	213	178	7
Diglucósido de procianidina	9.2	17.6	13.5	13.4	21.8	21.3	0.5
Trímer procianidina	10.0	10.4	13.5	14.0	14.6	14.9	0.6
Trímer prodelfinidina	4.78	6.09	4.99	4.88	4.25	3.42	0.39
Flavonas glicosiladas	15.5	23.2	17.7	18.3	18.1	19.3	0.4
<i>Luteolina y derivados</i>	13.1	18.4	13.9	14.6	13.8	15.2	0.3
Glucósido de luteolina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Isoorientina	n.d.	2.88	2.67	2.78	2.62	2.64	0.03
Glucósido de isoscoparina	8.4	10.5	8.1	8.9	8.3	7.9	0.3
Rutinósido de isoscoparina	4.62	4.44	2.96	2.62	2.68	4.39	0.05
Glucósido feruloil isoorientina	0.09	0.58	0.23	0.33	0.24	0.16	0.03
<i>Apigenina y derivados</i>	2.42	4.79	3.80	3.65	4.21	4.16	0.16
Glucósido de apigenina	1.59	2.47	2.79	2.35	3.35	3.02	0.15
Glucósido de isovitexina	0.16	0.33	0.12	0.16	0.10	0.17	0.03
Rutinósido de isovitexina	0.32	0.60	0.53	0.40	0.43	0.38	0.05
Glucósido feruloil isovitexina	0.24	1.06	0.21	0.55	0.20	0.48	0.03
Glucósido sinapoil isovitexina	0.11	0.33	0.14	0.20	0.13	0.11	0.02
FENOLES TOTALES	2830	2854	3149	2725	3562	3607	98

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Tabla 6.14. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el segundo año (2019) sin fertilización con nitrógeno (N₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).

	N ₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	1240	1231	1321	1127	1104	1323	94
Ácidos hidroxibenzoicos	55.2	54.0	58.9	52.1	45.0	59.4	2.8
Ácido hidroxibenzoico	13.9	12.7	17.4	11.7	12.1	14.5	0.6
Ácido dihidroxibenzoico	5.50	5.57	5.53	5.48	5.48	5.53	0.59
Ácido gálico	3.65	3.53	3.95	3.71	3.64	3.49	0.07
Ácido siríngico	10.4	9.9	10.5	10.2	8.9	11.0	0.4
Siringaldehído	6.45	6.61	6.92	6.41	4.99	7.62	0.46
Ácido vanílico	15.3	15.7	14.6	14.6	9.8	17.2	1.4
Ácidos hidroxicinámicos	1185	1177	1262	1075	1059	1263	92
Ácido cinámico	5.28	5.30	5.25	5.29	5.23	5.32	0.03
Ácido cumárico	353	295	457	251	316	352	54
Ácido cafeico y derivados	13.4	15.6	8.4	7.2	12.6	14.5	1.4
Ácido cafeico	11.3	11.2	8.4	7.2	8.4	11.4	1.3
Cafeoil hexosa	2.1	4.4	n.d.	n.d.	4.2	3.1	0.3
Ácido ferúlico y derivados	813	861	791	812	725	891	64
Ácido ferúlico	514	539	501	497	443	550	50
Ácido isoferúlico	188	207	179	204	170	208	12
Feruloil pentosa	0.08	0.24	0.25	0.11	0.31	0.25	0.02
Ácido diferúlico	63	66	66	66	66	75	8
Ácido triferúlico	5.56	5.52	5.21	5.98	7.66	7.12	0.40
Ácido diferúlico DC	18.3	16.8	17.8	18.6	17.9	21.8	2.2
Ácido sinápico	11.6	13.2	11.5	9.6	10.5	15.0	1.0
Sinapoil hexosa	12.3	14.0	11.3	11.0	9.2	15.0	1.9
Flavan-3-oles	537	497	623	532	454	534	21
<i>Catequina y derivados</i>	208	175	223	183	165	195	10
Catequina	77	69	74	54	56	55	5
Epicatequina	6.94	5.95	n.d.	n.d.	n.d.	6.09	0.55
Glucósido de catequina	109	87	125	111	96	113	5
C-C-GC/GC-C-C	6.4	5.6	12.4	10.0	6.5	9.9	1.1
C-GC-C	8.4	7.4	11.3	8.6	7.3	10.4	1.5
<i>Oligómeros</i>	329	322	400	349	289	339	13
Dímero procianidina	143	128	169	159	132	158	6
Dímero prodelfinidina	168	173	204	166	139	154	7
Diglucósido de procianidina	7.0	9.2	10.1	6.1	6.9	11.3	0.5
Trímer procianidina	7.9	7.6	11.7	13.0	7.9	12.8	0.6
Trímer prodelfinidina	3.29	3.97	4.39	4.02	3.16	2.54	0.39
Flavonas glicosiladas	23.1	20.2	23.1	22.4	18.2	17.9	0.4
<i>Luteolina y derivados</i>	19.6	15.2	18.9	18.9	15.2	14.0	0.3
Glucósido de luteolina	1.62	n.d.	2.46	2.42	1.61	n.d.	0.01
Isoorientina	4.30	2.62	2.80	2.82	2.48	2.58	0.03
Glucósido de isoscoparina	8.82	9.51	8.64	8.85	8.16	7.05	0.27
Rutinósido de isoscoparina	4.68	2.72	4.79	4.39	2.75	4.20	0.05
Glucósido feruloil isoorientina	0.18	0.33	0.19	0.40	0.21	0.19	0.03
<i>Apigenina y derivados</i>	3.49	4.97	4.24	3.49	3.01	3.91	0.16
Glucósido de apigenina	2.58	3.36	3.04	2.38	2.25	3.02	0.15
Glucósido de isovitexina	0.18	0.29	0.15	0.19	0.16	0.13	0.03
Rutinósido de isovitexina	0.43	0.49	0.68	0.26	0.37	0.35	0.05
Glucósido feruloil isovitexina	0.19	0.64	0.20	0.46	0.13	0.31	0.03
Glucósido sinapoil isovitexina	0.11	0.20	0.17	0.21	0.10	0.09	0.02
FENOLES TOTALES	1800	1748	1966	1681	1576	1875	98

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Tabla 6.15. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de cebada cultivadas durante el segundo año (2019) bajo fertilización con nitrógeno (N₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y el error estándar de la diferencia (SED) (n=3).

	N ₁₅₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	1239	1602	1714	1395	1553	1075	94
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	58.4	63.7	65.6	58.5	59.1	52.1	2.8
Ácido hidroxibenzoico	17.4	17.5	19.3	15.9	17.5	13.2	0.6
Ácido dihidroxibenzoico	5.47	5.57	5.60	5.49	5.61	3.87	0.59
Ácido gálico	3.77	3.85	3.87	3.84	3.79	3.61	0.07
Ácido siríngico	10.9	11.1	11.5	10.7	10.5	10.2	0.4
Siringaldehído	6.65	7.28	8.00	7.14	7.05	6.89	0.46
Ácido vanílico	14.2	18.3	17.4	15.5	14.6	14.3	1.4
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	1181	1538	1649	1337	1494	1023	92
Ácido cinámico	5.24	5.34	5.33	5.35	5.27	5.43	0.03
Ácido cumárico	399	430	692	370	560	179	54
Ácido cafeico y derivados	11.9	11.9	13.5	10.9	11.3	7.36	1.4
Ácido cafeico y derivados	7.64	7.61	9.15	6.68	6.98	4.17	1.34
Cafeoil hexosa	4.30	4.29	4.33	4.24	4.35	3.19	0.3
Ácido ferúlico y derivados	765	1091	938	951	917	832	64
Ácido ferúlico y derivados	496	705	585	603	568	536	50
Ácido isoferúlico	162	242	219	224	209	181	12
Feruloil pentosa	0.25	0.17	0.46	0.22	0.41	0.13	0.02
Ácido diferúlico	62	89	81	75	89	73	8
Ácido triferúlico	5.38	7.75	7.01	6.92	8.53	6.09	0.40
Ácido diferúlico DC	15.0	21.9	20.0	18.5	20.1	10.6	2.2
Ácido sinápico	13.5	13.7	13.5	13.1	12.5	13.2	1.0
Sinapoil hexosa	11.6	11.0	11.7	10.8	9.7	11.5	1.9
Flavan-3-oles	398	436	431	391	356	384	21
<i>Catequina y derivados</i>	160	173	166	144	142	132	10
Catequina	67	74	63	51	55	39	5
Epicatequina	n.d.	5.93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.55
Glucósido de catequina	84	83	93	85	79	86	5
C-C-GC/GC-C-C	5.3	5.0	5.0	3.2	3.8	3.4	1.1
C-GC-C	4.5	4.8	4.9	5.3	3.7	4.4	1.5
<i>Oligómeros</i>	238	263	265	247	215	252	13
Dímero procianidina	105	108	122	118	105	118	6
Dímero prodelfinidina	119	138	126	115	96	112	7
Diglucósido de procianidina	7.1	10.5	7.7	6.1	7.2	13.5	0.5
Trímer procianidina	4.7	4.6	6.5	6.5	4.9	6.4	0.6
Trímer prodelfinidina	1.68	2.55	2.12	1.82	1.46	1.85	0.39
Flavonas glicosiladas	19.9	20.6	18.3	16.2	19.9	17.1	0.4
<i>Luteolina y derivados</i>	15.9	15.8	12.4	12.4	16.0	13.9	0.3
Glucósido de luteolina	2.41	2.43	n.d.	n.d.	2.46	2.46	0.01
Isoorientina	2.56	2.69	2.72	2.71	2.58	2.56	0.03
Glucósido de isoscoparina	6.44	7.66	6.45	6.79	6.57	6.16	0.27
Rutinósido de isoscoparina	4.44	2.68	3.06	2.64	4.22	2.57	0.05
Glucósido feruloil isoorientina	0.11	0.31	0.13	0.22	0.13	0.10	0.03
<i>Apigenina y derivados</i>	3.98	4.79	5.90	3.82	3.91	3.21	0.16
Glucósido de apigenina	3.23	3.40	4.83	3.00	3.36	2.38	0.15
Glucósido de isovitexina	0.12	0.26	0.14	0.10	0.13	0.17	0.03
Rutinósido de isovitexina	0.47	0.45	0.75	0.33	0.32	0.30	0.05
Glucósido feruloil isovitexina	0.12	0.54	0.10	0.27	0.10	0.28	0.03
Glucósido sinapoil isovitexina	0.04	0.15	0.07	0.12	n.d.	0.07	0.02
FENOLES TOTALES	1657	2059	2163	1802	1930	1476	98

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Con el fin de simplificar los datos, se ha representado el contenido total (mg/kg peso seco) de las tres familias fenólicas principales (ácidos fenólicos, flavan-3-oles y flavonas glicosiladas) según año de cultivo y fertilización de nitrógeno (**Figura 6.3**). Podemos observar como en las muestras de cebada (**Figura 6.3(A)**), estas dos familias mayoritarias tienen una concentración mayor en 2018 respecto 2019. Contrariamente al contenido de flavonas glicosiladas, aun siendo compuestos minoritarios se obtuvieron concentraciones mayores en 2019 respecto 2018. Cabe destacar el ligero efecto inverso de la aplicación nitrogenada entre los dos años estudiados, la **Figura 6.3(A)** sugiere que la aplicación nitrogenada aumentó las concentraciones fenólicas en 2018 respecto a la no aplicación, en especial el contenido de ácidos fenólicos, mientras que en 2019 el efecto es totalmente contrario, dónde la aplicación de nitrógeno supuso una disminución de las concentraciones respecto la no aplicación. A grandes rasgos, si miramos los datos expuestos, el contenido total de compuestos fenólicos parece ser mayor en las muestras del año 2018 respecto las del 2019.

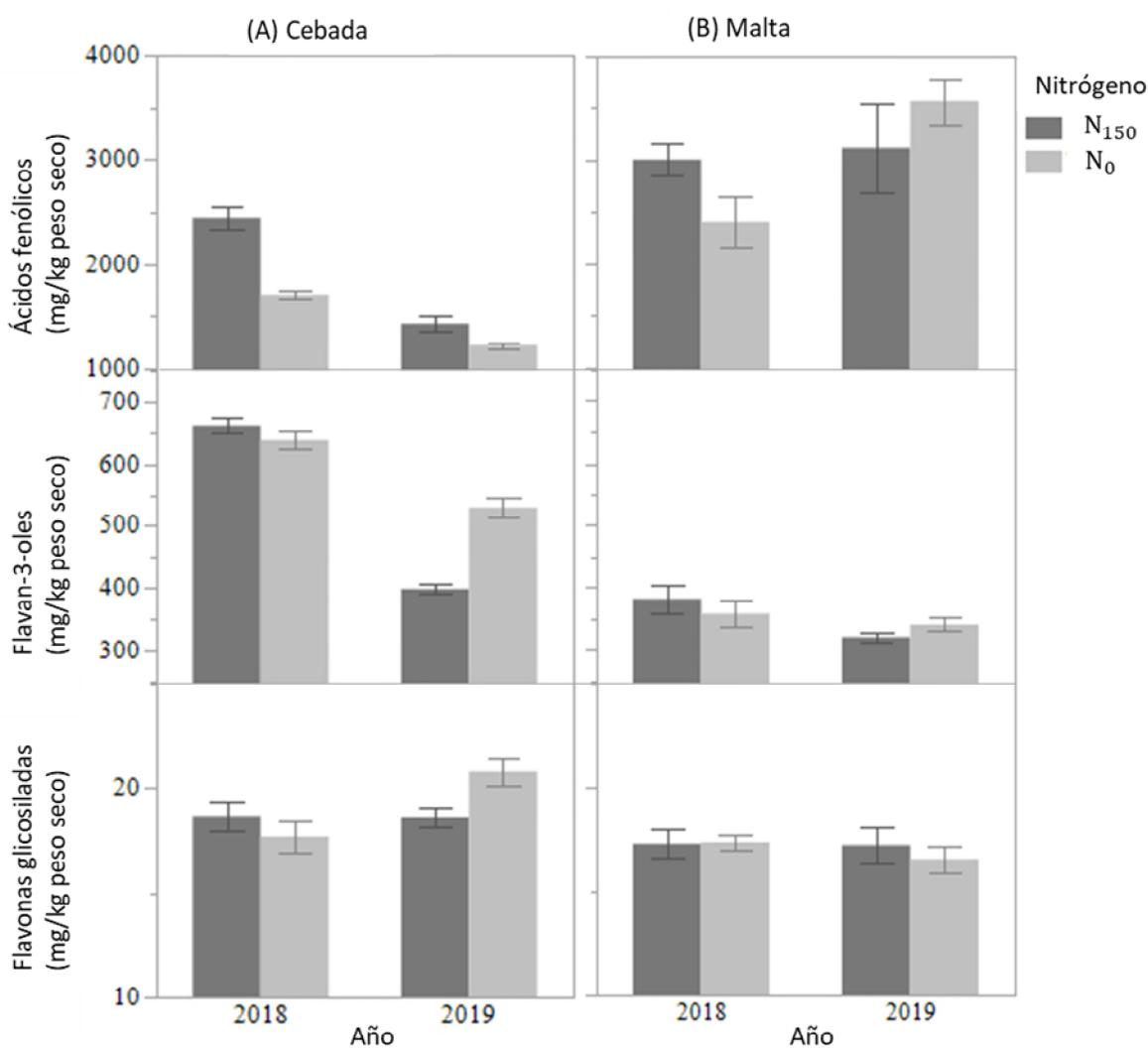


Figura 6.3. Concentraciones (mg/kg peso seco) de las principales familias fenólicas. (A) muestras de cebada cultivadas bajo dos condiciones de nitrógeno durante dos años consecutivos (2018 y 2019); (B) maltas correspondientes.

Tras realizar el malteado de las muestras de cebada comentadas anteriormente, las concentraciones (mg/kg peso seco) de los compuestos analizados en las maltas resultantes quedan recogidos en las **Tablas 6.16 a 6.19**. En líneas generales, contrariamente a las cebadas de partida, el contenido fenólico total fue mayor, siendo más alto en las muestras del 2019 respecto a las del 2018, indistintamente del tratamiento nitrogenado aplicado.

Evaluando el contenido fenólico total entre genotipos, en 2018 la variedad con mayor contenido fue Planet N₁₅₀ y la de menor Shakira N₀. En cambio, en 2019 el mayor contenido se obtuvo en la variedad Shuffle N₁₅₀ y el menor en Traveler N₁₅₀. De manera que, del mismo modo que en las cebadas, los resultados parecen indicar que los distintos genotipos no se comportan de igual manera frente al año de cultivo y la fertilización nitrogenada.

Por otro lado, en la **Figura 6.3(B)** observamos que los compuestos mayoritarios tras el malteado siguen siendo los ácidos fenólicos, viéndose un aumento considerable de sus niveles respecto las cebadas de partida. Contrariamente, los flavan-3-oles y las flavonas glicosiladas disminuyeron tras el proceso de malteado. Por lo que respecta a la aplicación de nitrógeno, podemos ver un comportamiento similar al observado en las cebadas, puesto que en 2018 la aplicación de nitrógeno al cultivo aparentemente supuso un aumento de las concentraciones y, por el contrario, en 2019 una disminución de éstas.

Aprovechando la **Figura 6.3**, resulta interesante comparar la **Figura 6.3(A)** con la **Figura 6.3(B)**. Las concentraciones de ácidos fenólicos aumentan tras la transformación de cebada a malta, al contrario que las concentraciones de flavan-3-oles, que disminuyen. Durante el malteado (remojo, germinación y secado-tostado) se producen un gran número de reacciones enzimáticas que liberan compuestos de la matriz del endospermo. En el caso de los compuestos fenólicos, la fracción ligada se libera, por lo que los ácidos fenólicos, que en cebada mayormente se encuentran en forma ligada (Wannenmacher et al., 2018), podrían verse liberados, hecho que puede traducirse en un aumento de su concentración en la malta final. Al contrario que los flavan-3-oles, los cuales se encuentran en la cebada principalmente en forma libre (Dvořáková et al., 2008a) y, durante el malteado, son más propensos a interactuar con otras moléculas, como las proteínas (Jongberg et al., 2020; Ozdal et al., 2013). Por ello, el contenido de esta familia fenólica disminuye en la malta final. Cabe resaltar el comportamiento de las flavonas glicosiladas, puesto que como se observa parece ser una familia que se mantiene aparentemente constante a pesar del proceso de malteado.

Tabla 6.16. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el primer año (2018) sin fertilización con nitrógeno (N₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).

	N ₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	2318	2389	2240	2093	2941	2467	832
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	53	54	47	51	56	53	13
Ácido hidroxibenzoico	19	19	18	18	21	21	4
Ácido dihidroxibenzoico	4.93	4.67	4.56	4.45	4.93	4.93	1.41
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Ácido siríngico	12.5	12.0	9.3	11.0	12.4	9.9	3.1
Siringaldehído	1.93	2.22	1.88	2.01	2.40	1.91	0.49
Ácido vanílico	14	16	14	16	16	16	4
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	2265	2335	2193	2043	2885	2414	819
Ácido cinámico	8.52	8.11	8.21	8.28	8.89	9.06	1.13
Ácido cumárico	574	551	772	480	973	647	249
<i>Ácido cafeico y derivados</i>	33	34	19	39	38	42	12
Ácido cafeico	33	25	19	35	34	42	11
Cafeoil hexosa	n.d.	8.88	n.d.	4.04	4.05	n.d.	2.54
<i>Ácido ferúlico y derivados</i>	1649	1742	1394	1516	1866	1715	576
Ácido ferúlico	942	1116	856	909	1132	1095	389
Ácido isoferúlico	501	357	340	379	431	348	136
Feruloil pentosa	0.68	0.67	0.58	0.70	0.94	0.81	0.16
Ácido diferúlico	121	169	127	145	189	176	44
Ácido triferúlico	7.6	13.5	8.9	12.9	15.1	12.9	4.9
Ácido diferúlico DC	21	29	22	24	32	30	7
Ácido sinápico	21	25	18	21	28	23	7
Sinapoil hexosa	5.45	3.24	0.61	3.64	5.92	8.86	6.08
Flavan-3-oles	312	367	382	347	369	376	51
<i>Catequina y derivados</i>	94	102	113	105	111	100	16
Catequina	25	23	22	20	23	13	7
Epicatequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Glucósido de catequina	55	65	75	69	72	73	9
C-C-GC/GC-C-C	7.00	6.45	7.51	6.87	7.61	7.53	1.61
C-GC-C	6.61	6.61	7.94	8.60	7.36	6.69	1.41
<i>Oligómeros</i>	219	266	269	242	258	276	35
Dímero procianidina	92	108	116	111	119	130	16
Dímero prodelfinidina	113	140	136	116	121	123	18
Diglucoído de procianidina	5.11	9.59	7.08	4.09	8.87	12.4	1.03
Trímer procianidina	5.65	6.17	7.56	8.75	7.37	8.83	1.31
Trímer prodelfinidina	2.23	1.96	2.10	2.51	2.17	1.74	0.47
Flavonas glicosiladas	17.1	19.0	17.5	16.6	16.8	17.2	1.5
<i>Luteolina y derivados</i>	15.4	16.9	15.3	14.6	14.9	14.8	1.4
Isoorientina	2.48	2.42	1.98	2.41	2.33	1.97	0.76
Glucósido de isoscoparina	7.91	8.32	7.29	7.45	7.82	7.52	0.86
Rutinósido de isoscoparina	2.51	3.69	2.50	2.33	1.95	2.35	0.85
Glúcosido feruloil isoorientina	0.21	1.93	0.01	n.d.	0.56	0.01	0.09
<i>Apigenina y derivados</i>	1.73	2.11	2.22	1.99	1.89	2.40	0.20
Glucósido de apigenina	0.55	0.71	0.74	0.78	0.69	0.87	0.14
Glucósido de isovitexina	0.67	0.60	0.91	0.65	0.77	1.10	0.15
Rutinósido de isovitexina	0.26	0.27	0.41	0.20	0.26	0.22	0.06
Glucósido feruloil isovitexina	0.14	0.33	0.10	0.25	0.12	0.15	0.04
Glucósido sinapoil isovitexina	0.11	0.20	0.07	0.12	0.05	0.07	0.03
FENOLES TOTALES	2647	2775	2639	2457	3326	2859	861

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Tabla 6.17. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el primer año (2018) bajo fertilización con nitrógeno (N₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).

	N ₁₅₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	2741	3225	3298	2647	3293	2849	832
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	62	71	67	62	65	65	13
Ácido hidroxibenzoico	23	24	24	22	24	23	4
Ácido dihidroxibenzoico	5.26	5.71	5.25	5.26	5.24	5.27	1.41
Ácido gálico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Ácido siríngico	13	14	16	13	14	15	3
Siringaldehído	2.11	2.55	2.18	2.19	2.30	2.49	0.49
Ácido vanílico	19	24	20	19	19	19	4
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	2679	3154	3231	2585	3228	2784	819
Ácido cinámico	8.99	9.01	8.91	8.61	8.85	9.01	1.13
Ácido cumárico	640	864	1232	552	1060	851	249
Ácido cafeico y derivados	50	43	29	37	41	47	12
Ácido cafeico	43	32	26	37	36	46	11
Cafeoil hexosa	6.9	10.8	2.6	n.d.	5.3	1.6	2.5
Ácido ferúlico y derivados	1980	2239	1961	1987	2118	1877	576
Ácido ferúlico	1166	1407	1177	1218	1283	1195	389
Ácido isoferúlico	546	511	485	472	499	366	136
Feruloil pentosa	0.67	0.79	0.64	0.59	0.80	0.76	0.16
Ácido diferúlico	155	207	198	197	220	203	44
Ácido triferúlico	13	16	16	13	20	16	5
Ácido diferúlico DC	30	27	38	32	34	38	7
Ácido sinápico	35	36	27	29	35	29	7
Sinapoil hexosa	5.97	34.2	2.49	2.67	6.76	4.56	6.08
Flavan-3-oles	375	392	430	355	403	340	51
<i>Catequina y derivados</i>	119	116	133	107	125	99	16
Catequina	34	30	26	22	24	14	7
Epicatequina	1.91	0.50	1.94	1.75	2.02	1.56	0.85
Glucósido de catequina	71	72	88	70	83	72	9
C-C-GC/GC-C-C	5.57	7.02	8.48	6.38	8.12	6.08	1.61
C-GC-C	7.31	6.25	8.10	6.84	7.91	6.47	1.41
<i>Oligómeros</i>	256	276	297	248	278	240	35
Dímero procianidina	107	112	131	111	131	115	16
Dímero prodelfinidina	133	144	145	121	124	105	18
Diglucósido de procianidina	6.9	12.0	8.9	5.8	11.5	10.6	1.0
Trímer procianidina	6.18	6.26	8.59	7.11	8.63	8.28	1.31
Trímer prodelfinidina	2.72	2.43	3.15	2.21	2.30	1.85	0.47
Flavonas glicosiladas	18.3	19.3	17.5	17.2	16.4	15.2	1.5
<i>Luteolina y derivados</i>	16.3	16.3	14.7	15.2	14.2	12.5	1.4
Isoorientina	1.16	2.46	1.58	2.37	1.19	1.20	0.76
Glucósido de isoscoparina	8.36	9.01	8.23	8.17	8.33	7.75	0.86
Rutinósido de isoscoparina	4.43	2.36	2.49	2.31	2.33	1.15	0.85
Glucósido feruloil isoorientina	2.92	0.03	0.02	0.01	n.d.	1.63	0.09
<i>Apigenina y derivados</i>	2.01	2.95	2.75	1.96	2.19	2.76	0.20
Glucósido de apigenina	0.74	1.25	0.88	0.61	0.74	1.12	0.14
Glucósido de isovitexina	0.72	0.86	1.24	0.87	1.03	1.22	0.15
Rutinósido de isovitexina	0.32	0.34	0.45	0.15	0.22	0.26	0.06
Glucósido feruloil isovitexina	0.13	0.32	0.10	0.23	0.12	0.14	0.04
Glucósido sinapoil isovitexina	0.10	0.18	0.08	0.10	0.08	0.02	0.03
FENOLES TOTALES	3134	3636	3746	3019	3712	3204	861

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Tabla 6.18. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el segundo año (2019) sin fertilización con nitrógeno (N₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).

	N ₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	3796	3387	3275	3522	4058	3383	832
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	79	75	66	76	83	78	13
Ácido hidroxibenzoico	24	21	21	20	27	27	4
Ácido dihidroxibenzoico	7.70	6.13	5.83	5.80	8.07	6.86	1.41
Ácido gálico	n.d.	3.42	n.d.	3.41	3.39	n.d.	1.89
Ácido siríngico	16	17	16	17	16	18	3
Siringaldehído	2.52	2.53	2.41	2.37	2.67	2.55	0.49
Ácido vanílico	28	25	21	28	27	24	4
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	3717	3312	3209	3446	3974	3305	819
Ácido cinámico	9.1	9.3	9.1	9.1	10.1	9.8	1.1
Ácido cumárico	1093	732	1012	833	1027	775	249
<i>Ácido cafeico y derivados</i>	52	46	29	46	66	51	12
Ácido cafeico	44	36	27	44	54	43	11
Cafeoil hexosa	8.7	9.9	2.1	2.1	12.2	8.2	2.5
<i>Ácido ferúlico y derivados</i>	2563	2524	2159	2558	2871	2469	576
Ácido ferúlico	1601	1601	1340	1520	1727	1514	389
Ácido isoferúlico	609	580	522	695	729	588	136
Feruloil pentosa	1.06	0.79	0.60	0.80	1.01	0.73	0.16
Ácido diferúlico	225	216	189	219	273	222	44
Ácido triferúlico	15	15	13	13	15	20	5
Ácido diferúlico DC	34	37	34	37	47	41	7
Ácido sinápico	39	34	30	33	41	41	7
Sinapoil hexosa	11.3	41.8	0.3	7.3	1.1	5.5	6.1
Flavan-3-oles	359	319	355	369	310	339	51
<i>Catequina y derivados</i>	115	97.3	105	113	107	107	16
Catequina	41	38	33	34	40	32	7
Epicatequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Glucósido de catequina	64	51	62	67	58	67	9
C-C-GC/GC-C-C	4.49	3.22	4.45	5.20	4.50	3.82	1.61
C-GC-C	5.12	4.26	5.46	7.64	3.80	4.11	1.41
<i>Oligómeros</i>	244	221	249	256	203	232	35
Dímero procianidina	113	93.0	118	122	96.8	117	16
Dímero prodelfinidina	114	112	115	118	91	96	18
Diglucósido de procianidina	6.8	8.2	7.9	5.0	7.2	10.0	1.0
Trímer procianidina	6.78	4.95	6.71	8.46	6.60	7.86	1.31
Trímer prodelfinidina	2.55	2.83	2.16	2.80	1.73	1.80	0.47
Flavonas glicosiladas	16.2	17.4	15.2	15.4	19.0	16.2	1.5
<i>Luteolina y derivados</i>	13.8	14.9	13.2	13.3	17.0	13.9	1.4
Isoorientina	n.d.	1.23	n.d.	n.d.	1.16	1.22	0.76
Glucósido de isoscoparina	8.97	8.75	8.37	8.42	9.01	8.55	0.86
Rutinósido de isoscoparina	2.45	2.35	2.44	2.33	4.43	1.73	0.85
Glucósido feruloil isoorientina	0.01	0.04	0.02	n.d.	2.90	0.80	0.09
<i>Apigenina y derivados</i>	2.41	2.45	1.94	2.16	2.06	2.27	0.20
Glucósido de apigenina	1.11	1.31	0.82	1.04	1.10	1.21	0.14
Glucósido de isovitexina	0.58	0.31	0.57	0.42	0.41	0.46	0.15
Rutinósido de isovitexina	0.46	0.28	0.39	0.23	0.32	0.29	0.06
Glucósido feruloil isovitexina	0.13	0.35	0.11	0.38	0.15	0.25	0.04
Glucósido sinapoil isovitexina	0.12	0.20	0.06	0.09	0.08	0.07	0.03
FENOLES TOTALES	4171	3723	3645	3907	4386	3739	861

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Tabla 6.19. Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg peso seco) analizados en las muestras de malta cultivadas durante el segundo año (2019) bajo fertilización con nitrógeno (N₁₅₀). Los resultados se expresan como las medias de análisis y malteado junto el error estándar de la diferencia (SED) (n=6).

	N ₁₅₀						SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	
Ácidos fenólicos	3371	2711	3597	2666	4177	2188	832
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i>	79	59	84	73	89	57	13
Ácido hidroxibenzoico	25	20	27	22	29	21	4
Ácido dihidroxibenzoico	6.17	4.52	6.96	5.58	6.59	4.99	1.41
Ácido gálico	4.29	1.58	4.20	2.70	6.27	n.d.	1.89
Ácido siríngico	17	12	18	16	18	12	3
Siringaldehído	2.43	2.01	3.11	2.64	2.90	2.56	0.49
Ácido vanílico	24	20	24	25	27	16	4
<i>Ácidos hidroxicinámicos</i>	3292	2653	3514	2593	4087	2131	819
Ácido cinámico	9.2	7.7	10.2	8.8	10.1	8.4	1.1
Ácido cumárico	839	591	978	502	1274	531	249
<i>Ácido cafeico y derivados</i>	48	32	41	37	58	34	12
Ácido cafeico	42	27	37	35	50	32	11
Cafeoil hexosa	5.6	4.2	4.1	2.6	8.3	2.1	2.5
<i>Ácido ferúlico y derivados</i>	2395	2022	2484	2045	2745	1557	576
Ácido ferúlico	1544	1293	1574	1196	1667	941	389
Ácido isoferúlico	561	491	614	611	716	405	136
Feruloil pentosa	0.57	0.58	0.75	0.70	1.10	0.55	0.16
Ácido diferúlico	180	151	181	150	230	127	44
Ácido triferúlico	10.9	14.8	12.3	9.2	15.9	7.6	4.8
Ácido diferúlico DC	31	26	32	28	37	25	7
Ácido sinápico	36	26	38	26	38	23	7
Sinapoil hexosa	22.3	25.6	16.3	6.9	18.6	3.9	6.1
Flavan-3-oles	344	338	340	315	299	295	51
<i>Catequina y derivados</i>	127	117	120	106	111	103	16
Catequina	49	45	43	36	46	37	7
Epicatequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0
Glucósido de catequina	71	65	69	64	60	60	9
C-C-GC/GC-C-C	3.03	3.35	3.38	2.93	2.43	2.70	1.61
C-GC-C	3.56	3.06	4.44	3.69	3.05	2.89	1.41
<i>Oligómeros</i>	217	221	220	208	188	192	35
Dímero procianidina	102	97	108	104	93	96	16
Dímero prodelfinidina	100	108	98	92	82	79	18
Diglucoído de procianidina	7.08	8.18	6.49	5.33	6.92	9.69	1.03
Trímer procianidina	4.91	5.34	5.81	5.92	5.38	5.55	1.31
Trímer prodelfinidina	1.77	2.20	2.05	1.57	1.72	1.62	0.47
Flavonas glicosiladas	19.4	16.2	18.2	16.7	20.3	12.6	1.5
<i>Luteolina y derivados</i>	17.6	14.0	15.9	14.9	18.1	10.7	1.4
Isoorientina	2.34	1.27	1.14	1.21	2.38	10.7	0.76
Glucósido de isoscoparina	9.23	7.81	9.87	8.83	9.44	7.22	0.86
Rutinósido de isoscoparina	3.61	2.33	2.50	2.34	3.90	1.15	0.85
Glucósido feruloil isoorientina	1.70	0.02	0.01	0.04	2.18	1.63	0.09
<i>Apigenina y derivados</i>	1.83	2.26	2.31	1.75	2.20	1.88	0.20
Glucósido de apigenina	0.97	1.05	1.26	0.84	1.45	1.03	0.14
Glucósido de isovitexina	0.38	0.43	0.41	0.36	0.27	0.49	0.15
Rutinósido de isovitexina	0.29	0.26	0.45	0.14	0.31	0.15	0.06
Glucósido feruloil isovitexina	0.13	0.36	0.11	0.28	0.14	0.14	0.04
Glucósido sinapoil isovitexina	0.05	0.17	0.08	0.12	0.04	0.07	0.03
FENOLES TOTALES	3734	3065	3955	2997	4497	2495	861

DC: forma descarboxilada; C: catequina; GC: galactocatequina; n.d.: no detectado.

Dadas las diferencias comentadas anteriormente, los resultados del ANOVA se presentan en la **Tabla 6.20** con el fin de clarificar lo observado. Sin profundizar, tanto en las muestras de cebada como en sus correspondientes maltas, se observa un efecto significativo del año, la fertilización con nitrógeno y su interacción (A × N). A pesar de que las variables con efecto significativo son las mismas en las muestras de cebada y en las muestras de malta, los compuestos fenólicos se ven influenciados de manera distinta y, por ello, se van a comentar a continuación separadamente.

Tabla 6.20. Valores *p* del ANOVA para el modelo fijo del análisis de las seis variedades de cebada, cultivadas bajo dos condiciones nitrogenadas distintas durante dos años, así como para sus maltas correspondientes.

	Año (A)	Nitrógeno (N)	Genotipo (G)	A × N	A × G	N × G
GL	1	1	5	1	5	5
(A) CEBADA						
<i>Fenoles totales</i>	0.0005	<i>0.0159</i>	0.6723	<i>0.0322</i>	0.6328	0.6756
<i>Ácidos fenólicos</i>	0.0011	0.0084	0.6824	0.0649	0.6206	0.7580
Ácidos hidroxibenzoicos	0.4734	<i>0.0200</i>	0.4821	0.2836	0.6523	0.7219
Ácidos hidroxicinámicos	0.0010	0.0083	0.6808	0.0631	0.6208	0.7587
Ácido cinámico	<0.0001	<i>0.0325</i>	0.5053	0.5881	0.5333	0.7958
Ácido cumárico y derivados	0.0095	<i>0.0281</i>	0.2329	0.2250	0.4862	0.4878
Ácido cafeico y derivados	<i>0.0110</i>	<i>0.0382</i>	0.4112	<i>0.0221</i>	0.9546	0.9655
Ácido ferúlico y derivados	0.0003	0.0051	0.3411	<i>0.0302</i>	0.5037	0.9258
<i>Flavan-3-oles</i>	<0.0001	<i>0.0162</i>	0.2464	0.0035	0.4693	0.2905
Catequina y derivados	0.0001	0.0630	0.1069	<i>0.0116</i>	0.6301	0.3297
Oligómeros	<0.0001	<i>0.0144</i>	0.3686	0.0037	0.4355	0.3405
<i>Flavonas glicosiladas</i>	0.0582	0.3901	0.0939	0.0539	0.1258	0.2715
Luteolina y derivados	0.1945	0.1889	0.3434	0.0826	0.2816	0.3885
Apigenina y derivados	0.0774	0.0831	<i>0.0486</i>	0.8016	0.2786	0.3735
(B) MALTA						
<i>Fenoles totales</i>	0.0025	0.5015	<i>0.0298</i>	0.0036	0.1964	0.1938
<i>Ácidos fenólicos</i>	0.0021	0.5241	<i>0.0345</i>	0.0048	0.2260	0.2425
Ácidos hidroxibenzoicos	0.0024	0.1187	0.4682	<i>0.0417</i>	0.3840	0.4085
Ácidos hidroxicinámicos	0.0021	0.5444	<i>0.0329</i>	0.0046	0.2241	0.2404
Ácido cinámico	0.0509	0.9410	0.2751	0.1341	0.4516	0.4353
Ácido cumárico y derivados	0.1601	0.4933	<i>0.0127</i>	<i>0.0227</i>	0.2564	0.3892
Ácido cafeico y derivados	<i>0.0165</i>	0.8562	<i>0.0197</i>	<i>0.0213</i>	0.1210	0.2687
Ácido ferúlico y derivados	0.0009	0.6865	0.0957	0.0054	0.2997	0.2205
<i>Flavan-3-oles</i>	0.0015	0.7969	0.1122	<i>0.0174</i>	0.0568	0.1169
Catequina y derivados	0.7377	0.0010	<i>0.0112</i>	0.0924	<i>0.0211</i>	<i>0.0170</i>
Oligómeros	0.0006	0.1831	0.1479	<i>0.0145</i>	0.0795	0.2358
<i>Flavonas glicosiladas</i>	0.3073	0.4687	<i>0.0458</i>	0.3906	0.0739	0.1010
Luteolina y derivados	0.3903	0.5808	<i>0.0235</i>	0.1187	0.0626	0.0605
Apigenina y derivados	0.1788	0.2387	0.0634	<i>0.0153</i>	0.1926	0.2189

GL: grados de libertad; A: año; N: nitrógeno; G: genotipo. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A × N × G) se ha utilizado como término error. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

En cebada (**Tabla 6.20(A)**), el año influye significativamente sobre el contenido de todos los compuestos fenólicos, exceptuando los ácidos hidroxibenzoicos, ácidos cafeicos y las flavonas glicosiladas; la fertilización con nitrógeno tan solo se ha detectado una influencia significativa sobre el contenido fenólico total, los ácidos hidroxicinámicos y ferúlicos; la interacción entre el año y la aplicación de nitrógeno tuvo un efecto significativo sobre el contenido de flavan-3-oles y oligómeros. Respecto a las muestras de malta (**Tabla 6.20(B)**), el efecto del año resultó ser significativo en un menor número de compuestos fenólicos respecto las cebadas de partida, tan solo sobre los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos y ferúlicos) y los oligómeros, así como el contenido fenólico total; el nitrógeno tan solo tuvo un efecto significativo sobre las catequinas y derivados; en cambio, la interacción entre el año y el nitrógeno influyó sobre un mayor número de compuestos, como los ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinámicos y ferúlicos) y el contenido total de fenoles. Al comparar la fracción cebada con la fracción malta, se observó un mayor efecto de la aplicación de nitrógeno sobre las muestras de cebada respecto sus correspondientes maltas, hecho que parece indicar que sobre la malta existe una mayor repercusión del proceso de malteado y no del manejo del cultivo.

El hecho que la interacción entre el año de cultivo y la aplicación de nitrógeno haya sido significativa, puede venir dado por la alta implicación que las condiciones ambientales parecen mostrar sobre los compuestos fenólicos. Como se ha explicado anteriormente, la ruta de la biosíntesis fenólica en los cultivos de cebada se inicia a partir del aminoácido fenilalanina (Cohen y Kenedy, 2010), resultando importante la presencia de nitrógeno en el suelo, así como su asimilación y disponibilidad. En 2019 la precipitación fue menor que en 2018 (**Figuras 10.1 a 10.3** del apartado Anejo), pudiéndose ver reducida la absorción de nitrógeno por parte del suelo y, como consecuencia, la disponibilidad de fenilalanina por parte de la planta, coincidiendo con el descrito por Ma et al. (2014). Por ello, en 2018 el efecto de la aplicación nitrogenada parece ser más notorio que en 2019 (**Figura 6.3**). Recientemente, Savin et al. (2022) han observado una respuesta positiva frente la fertilización con nitrógeno incluso en condiciones de secano, atribuyéndolo a la mayor capacidad y eficiencia de la planta para extraer el agua transpirada por parte del suelo. Por esta razón, no podríamos atribuir con certeza nuestros resultados a las precipitaciones, teniendo en cuenta también que en ambos años de estudio se realizaron riegos de los cultivos.

Por otro lado, Horvat et al. (2020) observaron un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en los años de cultivo dónde predominaron las temperaturas bajas. En nuestro estudio, en 2018 la temperatura media mensual al inicio de cultivo fue más baja que en 2019 y levemente más alta al final, así como la radiación mensual media, que fue más baja en 2018 respecto 2019 (**Figuras 10.1 a 10.3** del apartado Anejo). Y, aunque en este estudio no se ha podido definir con claridad los efectos de las condiciones climatológicas, se ha observado como la aplicación de fertilización nitrogenada afecta de modo distinto a los diferentes compuestos fenólicos según el año de cultivo.

Conviene subrayar que, en las muestras estudiadas, no se ha determinado una influencia genotípica significativa en ninguna de las fracciones estudiadas, tanto en las cebadas como en sus correspondientes maltas. Así pues, sería necesario realizar estos ensayos con un mayor

número de variedades y poder discernir así el posible efecto genotípico sobre el perfil fenólico, tal y como lo reportaron Engert et al. (2012) en trigo.

Una peculiaridad de este ensayo es que, en las muestras de malta, la variable año se ve confundida entre las condiciones climatológicas y las condiciones del malteado, por lo que valores significativos de esta variable se deberían atribuir a ambas, influencia ambiental e influencia tecnológica. Además, la implicación del proceso de malteado ha sido reportada en numerosos trabajos. Contrariamente a nuestros resultados, Cai et al. (2015) y Zhao y Zhao (2011) observaron una disminución del contenido de ácidos fenólicos en algunas muestras de malta respecto las cebadas de partida, hallazgo que se puede atribuir a la posible lixiviación de estos compuestos al agua de remojo (Dicko et al., 2005) y/o a la formación de complejos entre fenoles y proteínas (Gammoh et al., 2018). Asimismo, Pejin et al. (2009), quienes estudiaron el comportamiento del contenido fenólico total a lo largo de todo el proceso de malteado, observaron una disminución del contenido fenólico durante la germinación y un posterior incremento al secado-tostado. En la misma línea, Maillard y Berset (1995) determinaron que el posible aumento de fenoles después del malteado puede darse por la liberación enzimática de compuestos fenólicos resultante de las reacciones de Maillard al inicio del secado-tostado. Contrariamente, Inns et al. (2011) observaron una disminución del contenido fenólico frente la aplicación de temperaturas excesivamente altas al final del secado-tostado, puesto que inducen a la degradación fenólica.

Desafortunadamente, en este trabajo no se ha podido estudiar el efecto aislado del remojo, germinación y/o secado-tostado, pero como se describe en la **Tabla 5.4** del apartado 5.2.3 de Materiales y métodos, el proceso de malteado fue más largo para las muestras de 2019 que para las de 2018. El remojo duró dos horas más, la germinación se alargó trece horas y durante el secado-tostado el incremento de temperatura pudo ser más suave puesto que duró tres horas más. Dada la literatura citada en el párrafo anterior, estas diferencias de proceso entre años podrían explicar el aumento del contenido fenólico que se observa en las maltas de 2019 (**Figura 6.3(B)**). Con el fin de esclarecer la implicación del malteado, se ha calculado el cambio relativo entre las muestras de cebada y sus correspondientes maltas. El resultado se ha plasmado como porcentaje, para cada variedad y tratamiento nitrogenado, en la **Tabla 6.21**. De un modo general, se observa como el incremento entre las cebadas y sus correspondientes maltas tras el proceso de malteado fue mayor en las muestras de 2019 respecto a las de 2018. Si nos centramos en los ácidos fenólicos, aumentaron tras el malteado en todos los genotipos estudiados, aunque como se observa éste fue bastante distinto según genotipo. Respecto los flavan-3-oles, el malteado provocó una disminución en su contenido bastante similar entre las variedades estudiadas. Contrariamente, las flavonas glicosiladas han mostrado un comportamiento distinto entre genotipos tras el malteado, puesto que en algunas variedades su contenido aumentó y en otras disminuyó.

Tabla 6.21. Porcentaje (%) del cambio relativo tras el malteado sobre el contenido de compuestos fenólicos entre las muestras de cebada y malta.

	N ₀						N ₁₅₀					
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Shuffle	Traveler
2018 Ácidos fenólicos	49.2	29.1	28.6	22.3	80.4	39.4	24.4	49.5	35.0	28.4	16.9	-3.7
Ácidos hidroxibenzoicos	3.0	-2.4	-13.6	-5.2	16.1	-5.2	4.3	13.4	0.0	16.8	-4.0	-16.1
Ácidos hidroxicinámicos	50.8	30.0	29.9	23.1	82.3	40.9	25.0	50.6	36.0	28.7	17.4	-3.4
Ácido cinámico	267	244	244	257	284	289	263	285	273	256	271	269
Ácido cumárico y derivados	34.3	15.7	36.2	-15.4	100.6	36.0	25.2	108.5	32.3	-22.3	-3.0	-9.9
Ácido cafeico y derivados	123	149	66	219	158	259	115	46	55	130	48	103
Ácido ferúlico y derivados	56.0	33.6	25.9	40.8	72.7	40.2	23.2	35.8	37.7	55.3	30.2	-1.9
Flavan-3-oles	-55	-44	-42	-44	-37	-37	-39	-42	-37	-45	-45	-46
Catequinas y derivados	-64	-57	-56	-51	-49	-54	-51	-49	-49	-54	-54	-55
Oligómeros	-50	-36	-34	-40	-31	-28	-30	-38	-30	-39	-39	-41
Flavonas glicosiladas	-4.2	-16.7	3.6	-1.5	9.2	5.4	18.0	-16.9	-1.6	-5.9	-9.0	-21.2
Luteolina y derivados	2.5	-6.5	10.3	10.8	15.2	11.6	24.5	-11.2	5.5	4.1	2.8	-17.8
Apígenina y derivados	-39	-56	-27	-46	-23	-21	-17	-39	-28	-46	-48	-34
2019 Ácidos fenólicos	206	175	148	213	268	156	172	69	110	91	169	103
Ácidos hidroxibenzoicos	42.1	38.2	12.0	45.5	85.2	31.4	35.8	-7.5	27.4	25.1	51.7	10.2
Ácidos hidroxicinámicos	214	181	154	221	275	162	179	72	113	94	174	108
Ácido cinámico	72	75	74	71	94	84	75	45	91	65	91	54
Ácido cumárico y derivados	210	148	121	233	225	120	111	37	41	36	127	197
Ácido cafeico y derivados	290	195	248	533	423	251	302	166	207	240	415	367
Ácido ferúlico y derivados	215	193	173	215	296	177	213	85	165	115	199	87
Flavan-3-oles	-33	-36	-43	-31	-32	-37	-14	-23	-21	-19	-16	-23
Catequinas y derivados	-45	-44	-53	-38	-35	-45	-21	-32	-28	-26	-22	-22
Oligómeros	-25.9	-31.2	-37.6	-26.7	-29.8	-31.7	-9.0	-16.1	-16.9	-15.6	-12.3	-24.0
Flavonas glicosiladas	-29.7	-13.8	-34.4	-31.1	4.5	-9.7	-2.7	-21.1	-0.2	3.1	2.2	-26.0
Luteolina y derivados	-29.4	-1.7	-29.9	-29.8	11.6	-0.7	10.1	-11.5	28.7	20.8	13.4	-22.5
Apígenina y derivados	-31	-51	-54	-38	-32	-42	-54	-53	-61	-54	-44	-41

Para determinar las variables de mayor implicación sobre el cambio relativo en el perfil fenólico, se ha llevado a cabo el ANOVA (Tabla 6.22). La variable año tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre todos los compuestos fenólicos estudiados, a excepción de las flavonas glicosiladas. Este hecho parece indicar la importancia e implicación que tiene el proceso de malteado sobre el contenido fenólico que, como se ha comentado anteriormente, produce glicosilaciones y reacciones enzimáticas que pueden inducir cambios en el perfil fenólico del grano de cebada y maltas. Por otro lado, la aplicación nitrogenada tuvo un efecto significativo sobre la variación del contenido de los ácidos hidroxicinámicos y los flavan-3-oles. La única interacción significativa ha sido entre el año y el nitrógeno (A × N) sobre los niveles de catequinas y derivados. Respecto al genotipo, no ha resultado ser una variable que suponga un efecto significativo sobre la variación fenólica entre cebadas y maltas. En esta materia, Lu et al. (2007) también reportaron esta implicación significativa del proceso de malteado sobre el contenido total e individual de los compuestos fenólicos, así como de la actividad antioxidante de las maltas estudiadas.

Tabla 6.22. Valores *p* del ANOVA del cambio relativo en los compuestos fenólicos entre las muestras de cebada y sus correspondientes maltas una vez realizado el malteado.

	Año (A)	Nitrógeno (N)	Genotipo (G)	A × N	A × G	N × G
GL	1	1	5	1	5	5
<i>Ácidos fenólicos</i>	0.0001	0.0094	0.1337	0.0467	0.3450	0.6555
Ácidos hidroxibenzoicos	0.0013	0.1920	0.0776	0.0748	0.2367	0.3444
Ácidos hidroxicinámicos	0.0001	0.0091	0.1395	0.0463	0.3512	0.6654
Ácido cinámico	<0.0001	0.8261	0.3780	0.3122	0.6251	0.4385
Ácido cumárico y derivados	0.0084	0.1100	0.7748	0.2117	0.6261	0.7066
Ácido cafeico y derivados	0.0020	0.1210	0.1845	0.5744	0.4875	0.6086
Ácido ferúlico y derivados	<0.0001	0.0147	0.0833	0.0663	0.2649	0.4795
<i>Flavan-3-oles</i>	0.0002	0.0027	0.7621	0.0050	0.1963	0.1597
Catequinas y derivados	<0.0001	0.0006	0.2363	0.0026	0.2149	0.1318
Oligómeros	0.0010	0.0150	0.9422	0.0160	0.2587	0.2306
<i>Flavonas glicosiladas</i>	0.0496	0.4568	0.2410	0.0770	0.4418	0.0945
Luteolina y derivados	0.2329	0.2790	0.4925	0.0726	0.7705	0.1520
Apigenina y derivados	0.0601	0.3306	0.4064	0.3216	0.4918	0.6949

GL: grados de libertad; A: año; N: nitrógeno; G: genotipo. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A × N × G) se ha utilizado como término error. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Se realizó el análisis multivariante para los compuestos fenólicos significativos (**Tabla 6.20**) con el fin de clarificar las diferencias fenotípicas (genotipo y ambiente) de las muestras de cebada y sus correspondientes maltas. El PCA resultante para ambas fracciones se ha plasmado en la **Figura 6.4**.

En las muestras de cebada (**Figura 6.4(A)**), claramente se identifica el año como el principal factor que explica la variabilidad, puesto que las muestras del año 2018 se agrupan a la derecha del eje principal y las del 2019 a su izquierda. El tamaño de los círculos representa el total marginal, siendo mayor en 2018 respecto al 2019 e indicando un mayor contenido de compuestos fenólicos en el segundo año de estudio. El PCA1 muestra que la variabilidad entre las muestras del 2018 estaría relacionada principalmente con el contenido de oligómeros y catequinas, mientras que en el 2019 la variabilidad vendría dada por los niveles de los ácidos hidroxibenzoicos y cinámicos, así como las apigeninas y sus derivados. Por otro lado, las luteolinas parecen no mostrar una variabilidad entre muestras, ya que se encuentran cerca de la intersección central entre ejes, pudiéndose asumir que su contenido ha sido estable entre años. En cambio, el PCA2 está mayormente relacionado con la aplicación de nitrógeno, puesto que las muestras que han recibido fertilización nitrogenada se sitúan en la parte superior del eje principal y las demás por debajo. Se observa que la mayor variabilidad en las muestras que recibieron fertilización fue en contenido de ácidos hidroxibenzoicos y cinámicos y apigeninas, mientras que entre las muestras que no recibieron tratamiento nitrogenado estarían más asociadas al contenido de oligómeros y catequinas.

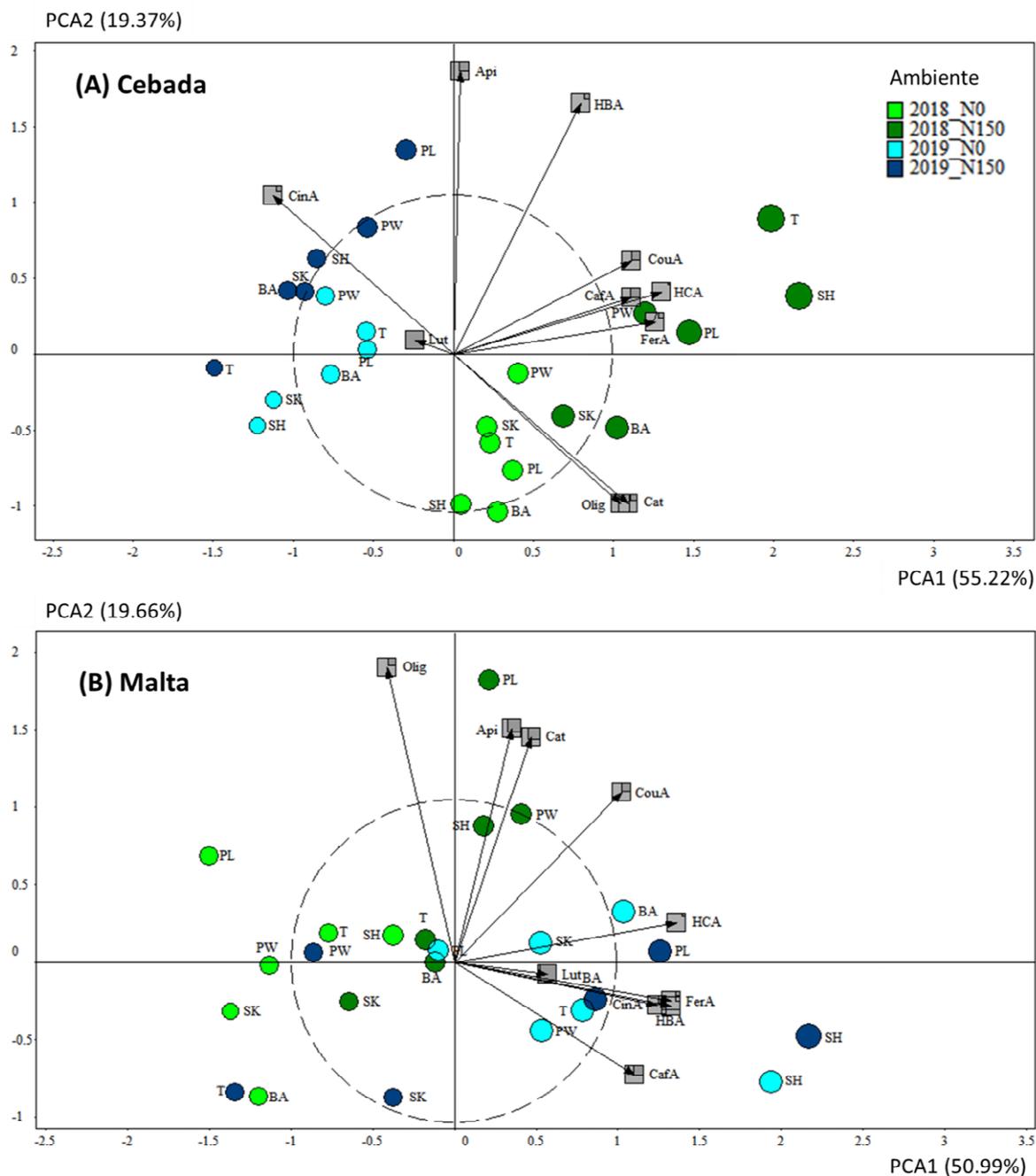


Figura 6.4. Resultado del PCA de los compuestos fenólicos significativos de las muestras de cebada (A) y sus correspondientes maltas (B) según año de cultivo y aplicación nitrogenada. El color de los círculos identifica el ambiente (combinación año × nitrógeno); el tamaño de los círculos representa el total marginal. BA: basic; PW: pewter; PL: planet; SK: shakira; SH: shuffle; T: traveler. HBA: ácidos hidroxibenzoicos; HCA: ácidos hidroxicinámicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico y derivados; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequina y derivados; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Respecto las muestras de malta, en la **Figura 6.4(B)** se identificamos un efecto año en el PCA1, puesto que las muestras del 2018 se encuentran a la izquierda del eje principal y las del 2019 a su derecha, pudiéndose atribuir esta variabilidad, sobre todo, al contenido de oligómeros. Asimismo, en línea con las muestras de cebada, el contenido de luteolinas no muestra variabilidad para las variables estudiadas, ya que se encuentra en el área central de los ejes. En el PCA2 podemos observar como la aplicación nitrogenada se comporta distintamente entre años, las muestras de 2018 que recibieron fertilización se sitúan por encima del eje principal y las del 2019 por debajo, asociándose esta variabilidad al contenido de oligómeros, catequinas y apigenina para las muestras de la parte superior y al contenido de ácido cafeico para las muestras de la parte inferior.

Con tal de esclarecer estas observaciones y su asociación con las variables genotípicas y/o ambientales, se realizó el ANOVA de cada eje del PCA. En la **Tabla 6.23** quedan recogidos los valores *p* para las muestras de cebada (**A**) y sus correspondientes maltas (**B**). Si nos centramos en las cebadas (**Tabla 6.23(A)**), el principal efecto significativamente asociado a la variabilidad total explicada por el PCA1, que como se observa en la **Figura 6.4(A)** es del 55.22%, es la variable año. Respecto al 19.3% de variabilidad explicada por el PCA2, se ha observado un efecto significativo de la aplicación nitrogenada. En el caso de las muestras de malta (**Tabla 6.23(B)**), el 50.99% de la variación total asociada al PCA1 (**Figura 6.4(B)**) vendría explicada por la variable año, mientras que el 19.66% de variabilidad del PCA2 (**Figura 6.4(B)**) estaría relacionado en parte por el efecto significativo del año, del genotipo y de la interacción año × nitrógeno (A × N).

Tabla 6.23. Valores *p* del ANOVA de los ejes de los componentes principales uno y dos (PCA1 y PCA2) del PCA para las muestras de cebada, cultivadas durante dos años bajo dos condiciones nitrogenadas distintas, y sus correspondientes maltas.

	GL	(A) Cebada		(B) Malta	
		PCA1	PCA2	PCA1	PCA2
Año (A)	1	0.0003	<i>0.0258</i>	0.0054	0.0015
Nitrógeno (N)	1	<i>0.0265</i>	0.0081	0.2990	0.0739
Genotipo (G)	5	0.6610	0.3566	0.0954	0.0099
A × N	1	<i>0.0227</i>	0.6864	<i>0.0205</i>	0.0054
A × G	5	0.6883	0.5278	0.2485	<i>0.0163</i>
N × G	5	0.6745	0.6181	0.2641	<i>0.0497</i>

A: año; N: nitrógeno; G: genotipo; GL: grados de libertad. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A × N × G) se ha utilizado como término error. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Cabe resaltar que, en este estudio, no se han podido identificar diferencias genotípicas, ni en las muestras de cebada ni en las muestras de malta, tras analizar los compuestos fenólicos de manera individual. Aunque, al realizar el PCA para las muestras de malta, dónde los grupos fenólicos se analizan de forma conjunta, se ha podido identificar un efecto del genotipo. Arigò et al. (2018), quienes también utilizaron la metodología HPLC-MS/MS para la identificación fenólica, no detectaron tampoco diferencias genotípicas entre las muestras. Por otro lado,

Fernandez-Orozco et al. (2010), en trigo, y Narwal et al. (2016), en cebada, sugirieron que la fracción fenólica libre se ve mayormente influenciada por las condiciones ambientales, mientras que la fracción ligada tiene una mayor influencia genotípica. En base a esto, sugirieron que ciertas variedades son más estables frente a los cambios ambientales que otras, puesto que observaron que la variación fenólica relacionada con las condiciones ambientales era distinta entre los genotipos estudiados. Hernanz et al. (2001), Narwal et al. (2016) y Tian et al. (2021) son un ejemplo de autores que detectaron un efecto genotipo claro sobre el contenido fenólico total. Esta discrepancia entre la literatura consultada y los resultados expuestos en este estudio puede deberse a los diferentes métodos de extracción y análisis de los compuestos fenólicos empleados, así como por la estabilidad de las variedades de cebada maltera estudiadas frente las condiciones ambientales. Todo ello indica la necesidad de realizar estudios con genotipos distintos a los estudiados y durante un mayor número de años de cultivo, para comprender mejor las causas y consecuencias de la variación en el perfil fenólico de la cebada y sus correspondientes maltas.

6.3.2. EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON NITRÓGENO SOBRE EL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS Y COMPUESTOS AROMÁTICOS VOLÁTILES DEL MOSTO CERVECERO Y CERVEZA

Se utilizaron cuatro variedades de cebada (Basic, Pewter, Planet y Shakira), cultivadas bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno (N_0 y N_{150}), en la localidad de Bell-lloc d'Urgell (Lleida, Catalunya, España) durante dos años consecutivos (2017-2018 y 2018-2019).

Las concentraciones de los parámetros analíticos y el perfil de aminoácidos quedan recogidas en la **Tabla 6.24** para los mostos elaborados a partir de las maltas del primer malteado y en la **Tabla 6.25** para los mostos elaborados a partir de las maltas del segundo malteado, mostrándose también el equipo PicoBrew empleado para cada muestra. A grandes rasgos, no se aprecian grandes diferencias en el contenido de minerales entre las muestras estudiadas, al contrario que los β -glucanos, sobre los cuales sí se aprecian niveles dispares entre genotipos, tratamiento nitrogenado y año de cultivo. En el caso del parámetro FAN, el cual engloba desde aminoácidos hasta péptidos libres, no parece mostrar niveles distintos entre las muestras, sin embargo, si nos centramos en el contenido de aminoácidos se puede contemplar cierta variabilidad, tanto entre genotipos como según el tratamiento nitrogenado y año de cultivo, siendo mayor en 2019 respecto 2018 y en las muestras que se fertilizaron con nitrógeno. En las muestras analizadas los aminoácidos mayoritarios han resultado ser la asparagina, glutamina y prolina, así como los minoritarios la metionina y cistina. Además, en ambos malteados, la presencia del aminoácido cistina no se ha detectado en todas las muestras estudiadas, así como el contenido de metionina en las muestras del 2019.

Dado el gran número de datos y con el objetivo de facilitar la comprensión, en la **Figura 6.5** se muestran las concentraciones medias para cada aminoácido según la combinación nitrógeno \times año \times malteado. El contenido de ácido glutámico, glutamina y prolina varía bastante entre muestras, al contrario que el resto de los aminoácidos donde los niveles son similares entre muestras. El mayor contenido en aminoácidos se dio en las muestras procedentes del segundo malteado y ambas condiciones nitrogenadas de 2019, siendo, principalmente, por un aumento en el contenido de ácido aspártico, glutamina y prolina. Por otro lado, tanto en las muestras que recibieron tratamiento nitrogenado como en las que no lo recibieron, el contenido de aminoácidos es mayor que en las muestras del 2019 respecto las del 2018, pudiéndose explicar tanto por las condiciones ambientales como por las condiciones del proceso de malteado.

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la fertilización nitrogenada tuvo un mayor impacto sobre los compuestos fenólicos en las muestras de cebada del año 2018 respecto las del 2019, pudiéndose atribuir a la mayor absorción de nitrógeno por el suelo dada la mayor precipitación. Respecto a los aminoácidos, existe literatura que reportan la relación entre la fertilización nitrogenada y el contenido proteico de la cebada (Marconi et al., 2011), por lo que, cabría esperar que cebadas con un mayor contenido en proteína resultaran en mostos con un mayor contenido de compuestos nitrogenados. Aunque como describieron Herb et al. (2017b), las características sensoriales del mosto y de la cerveza que son aportadas por la materia prima no tan solo son intrínsecas de la variedad dada su base genética, sino que también se desarrollan durante el malteado. A pesar de que en este estudio no se ha podido

evaluar individualmente la implicación de las condiciones de malteado, el mayor contenido de aminoácidos en nuestras muestras de mosto se ha dado en aquellas procedentes de cebadas malteadas en 2019, cuyas condiciones de malteado fueron distintas respecto al malteado de 2018 (tal y como se describe en el apartado 5.2.3 de Materiales y métodos).

Tabla 6.24. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados y del perfil de aminoácidos de los mostos cerveceros elaborados a partir del primer malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas bajo dos condiciones de fertilización nitrogenada durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	2018								2019								SED
	N ₀				N ₁₅₀				N ₀				N ₁₅₀				
	Basic		Planet		Planet		Shakira		Basic		Planet		Planet		Shakira		
	PB	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	
Amargos (IBU)	71	45	46	40	45	45	49	34	42	35	41	59	76	63	45	43	15
β-glucanos (mg/L)	45	122	55	105	64	127	38	44	88	192	85	246	106	231	154	110	45
°Balling (° P)	14	12	14	13	15	12	13	14	13	13	13	13	13	11	12	13	1
Calcio (mg/L)	36	35	37	34	39	35	48	40	40	30	36	31	44	39	37	34	5
Cloruros (mg/L)	242	247	294	258	302	277	319	277	342	313	305	320	375	286	365	299	22
Color (EBC)	12	12	13	11	13	11	13	11	12	8	11	10	11	10	10	9	1
Diacetilo (µg/L)	21	12	31	36	50	58	106	12	14	24	137	35	152	25	80	70	57
FAN (mg/L)	167	161	153	151	198	164	141	163	150	174	150	151	146	148	184	159	13
Fosfatos (mg/L)	644	685	532	608	685	631	498	590	638	734	499	686	594	543	555	573	46
Magnesio (mg/L)	70	70	67	65	76	72	76	75	75	73	72	70	81	77	69	79	5
Nitratos (mg/L)	2.0	2.1	2.5	2.2	1.8	1.8	2.2	2.2	2.2	2.0	2.0	2.1	2.4	1.9	2.1	1.8	0.5
Oxalatos (mg/L)	3.4	2.5	n.d.	n.d.	7.9	6.3	n.d.	n.d.	6.0	6.2	5.2	7.5	3.7	4.5	4.7	6.2	2.5
pH	5.9	6.1	6.0	6.0	5.9	5.8	6.1	6.1	6.0	6.2	6.1	6.1	6.1	6.2	6.1	6.1	0.1
Sulfatos (mg/L)	115	140	141	120	120	133	142	118	161	154	136	148	156	126	162	120	9
Zinc (mg/L)	281	394	294	256	458	496	493	540	307	318	346	307	391	412	334	386	58
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>																	
Ácido aspártico	32	75	54	58	75	81	53	67	80	87	76	74	76	90	68	89	15
Ácido glutámico	34	77	78	78	82	88	83	78	81	79	76	69	77	82	71	81	10
Alanina	49	102	96	93	107	106	101	100	93	97	92	81	85	85	79	94	11
Arginina	50	102	73	91	108	92	64	107	82	88	79	88	73	77	60	109	12
Asparagina	104	253	179	201	274	309	173	260	231	256	231	237	243	326	216	342	28
Cistina	7	12	9	12	n.d.	n.d.	8	10	n.d.	17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11	6
Fenilalanina	52	99	88	89	115	85	76	95	90	87	89	82	82	76	75	91	12
Glicina	21	44	39	40	45	41	39	42	39	41	38	36	36	36	33	42	5
Glutamina	399	641	617	715	945	589	514	743	629	868	686	597	650	530	556	1023	206
Hidroxiprolina	32	35	31	35	78	57	30	29	31	54	55	67	34	61	50	26	4
Histidina	25	48	44	44	52	38	42	49	45	43	44	38	41	37	37	48	6
Isoleucina	29	55	45	47	61	44	40	49	46	45	41	41	40	37	34	46	12
Leucina	54	93	87	90	111	74	77	91	88	83	79	73	75	65	64	82	11
Lisina	35	71	58	64	62	42	53	64	57	61	54	47	51	44	40	61	10
Metionina	12	20	21	21	23	16	18	21	17	20	18	16	n.d.	n.d.	15	22	6
Prolina	297	320	510	328	695	552	256	312	493	714	647	704	639	756	614	261	187
Serina	32	58	57	56	68	50	53	60	57	50	54	49	52	42	46	57	7
Tirosina	41	80	70	70	88	66	60	74	73	72	68	62	63	60	58	71	9
Treonina	29	56	50	54	60	49	47	57	52	50	48	48	46	42	41	55	6
Triptófano	22	50	42	41	51	48	41	49	43	50	45	39	41	44	37	49	6
Valina	52	98	87	84	110	87	80	91	89	85	84	74	79	73	71	84	11

PB: PicoBrew; FAN: aminonitrógeno libre; n.d.: no detectado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.25. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados y del perfil de aminoácidos de los mostos cerveceros elaborados a partir del segundo malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas durante dos años bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	2018								2019								SED
	N ₀				N ₁₅₀				N ₀				N ₁₅₀				
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	
	PB	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	
Amargos (IBU)	47	24	40	28	37	47	42	34	37	61	59	34	28	45	59	55	15
β-glucanos (mg/L)	88	105	28	43	105	177	35	77	189	244	51	297	264	187	62	372	45
°Balling (° P)	13	10	14	14	13	11	13	12	13	11	12	13	11	11	9	11	1
Calcio (mg/L)	25	26	44	32	45	42	46	24	37	31	38	29	38	30	37	30	5
Cloruros (mg/L)	269	288	281	240	283	268	307	295	288	254	297	279	338	265	312	305	22
Color (EBC)	10	10	12	11	13	11	11	10	9	8	10	7	7	8	9	9	1
Diacetilo (µg/L)	163	234	44	198	106	171	37	171	134	187	191	129	247	181	116	370	57
FAN (mg/L)	162	139	173	187	159	130	150	154	141	128	136	135	126	131	153	122	13
Fosfatos (mg/L)	700	706	567	663	569	539	493	605	572	557	473	584	496	553	510	509	46
Magnesio (mg/L)	62	59	82	73	75	72	76	63	79	62	69	70	72	65	66	65	5
Nitratos (mg/L)	0.3	0.3	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	0.5	2.0	2.0	1.8	1.9	2.0	2.1	2.1	2.0	0.5
Oxalatos (mg/L)	5.9	3.2	3.2	3.1	n.d.	n.d.	n.d.	5.2	1.7	3.6	1.8	3.9	1.1	3.2	3.0	3.2	2.5
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.1	6.1	6.0	6.1	6.1	6.1	6.1	6.2	6.2	6.3	6.1	0.1
Sulfatos (mg/L)	82	103	139	118	106	117	133	76	131	121	125	121	131	116	132	109	9
Zinc (mg/L)	214	196	394	310	430	530	481	339	302	293	374	331	365	372	266	272	58
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>																	
Ácido aspártico	64	58	61	70	68	71	60	59	122	105	122	113	108	140	91	114	15
Ácido glutámico	76	75	79	83	81	92	78	82	78	64	76	68	74	73	84	71	10
Alanina	92	86	108	109	97	102	100	94	86	76	89	77	76	86	107	72	11
Arginina	75	63	87	126	85	80	72	77	70	59	66	73	53	74	75	67	12
Asparagina	162	174	193	251	218	271	187	179	216	243	213	245	232	306	189	278	28
Cistina	n.d.	10	10	12	9	11	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10	n.d.	n.d.	14	n.d.	6
Fenilalanina	89	67	106	120	91	79	86	79	81	66	77	70	69	71	89	68	12
Glicina	39	35	41	46	41	40	39	39	37	33	38	34	32	37	47	32	5
Glutamina	265	171	783	986	672	456	870	222	948	814	871	1151	865	735	1082	803	206
Hidroxiprolina	59	46	32	36	34	33	27	47	41	35	55	37	38	43	31	40	4
Histidina	41	30	49	56	45	42	45	42	46	38	44	41	40	42	47	40	6
Isoleucina	57	n.d.	55	64	49	41	44	49	41	36	38	36	32	35	48	33	12
Leucina	92	68	105	119	91	69	84	80	81	65	77	70	61	65	93	59	11
Lisina	61	45	65	85	59	59	56	60	64	55	65	57	47	58	70	46	10
Metionina	24	20	24	27	22	17	20	22	16	n.d.	15	15	n.d.	n.d.	22	n.d.	6
Prolina	207	406	439	407	381	255	361	372	716	793	846	799	758	750	442	1040	187
Serina	53	43	65	71	58	47	57	49	53	42	54	46	44	44	64	41	7
Tirosina	71	55	83	95	72	64	67	63	66	55	61	56	53	58	71	50	9
Treonina	49	43	57	69	51	46	49	49	47	40	46	44	39	43	56	40	6
Triptófano	43	37	47	50	41	47	43	46	39	39	39	36	38	45	44	36	6
Valina	89	74	102	109	90	81	86	79	80	68	81	68	68	74	94	61	11

PB: PicoBrew; FAN: aminonitrógeno libre; n.d.: no detectado.

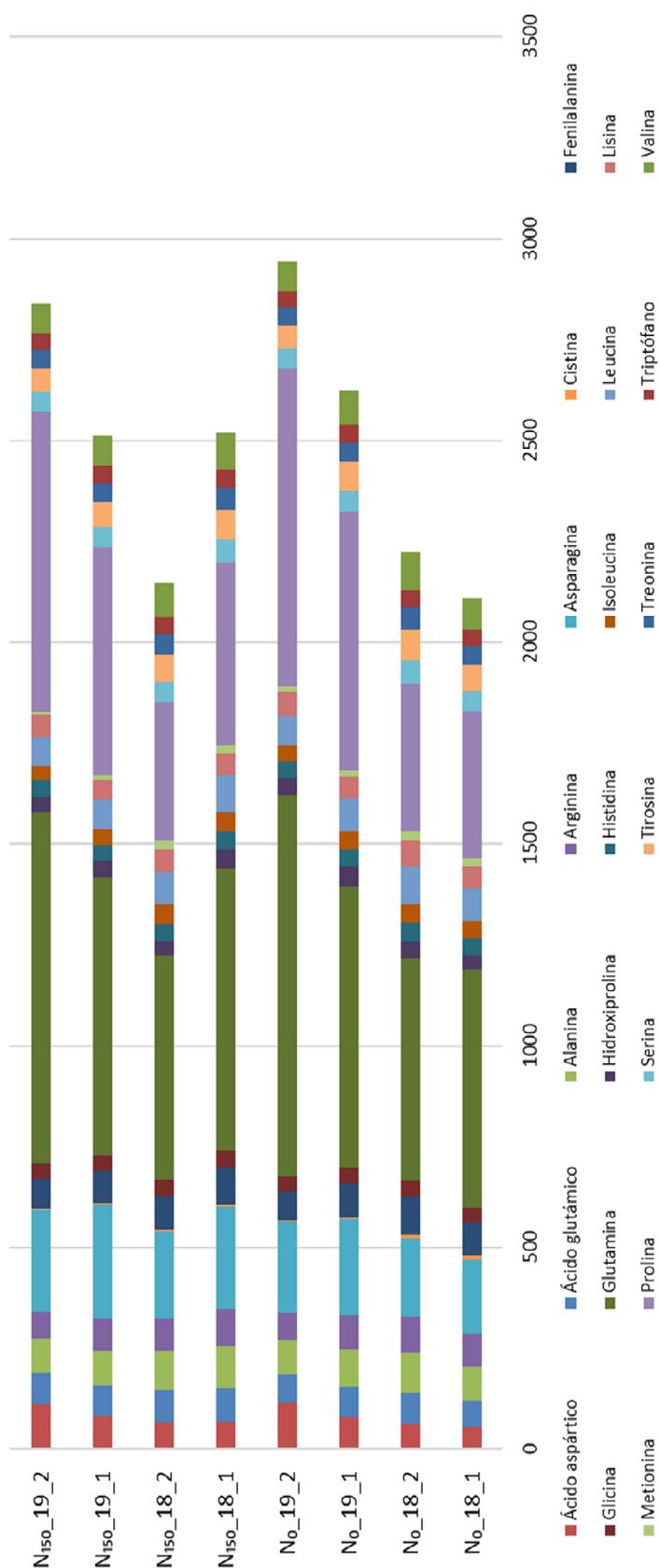


Figura 6.5. Contenido medio de los aminoácidos determinados en los mostos cerveceros para cada combinación nitrógeno x año x malteado.

Seguidamente, las concentraciones de los parámetros analíticos, compuestos aromáticos y el perfil de aminoácidos de las cervezas quedan recogidas en la **Tabla 6.26** para las procedentes del primer malteado y en la **Tabla 6.27** para las procedentes del segundo malteado. Cabe destacar que en las muestras del segundo malteado de 2018 no se disponen de todas ellas, puesto que en las elaboraciones de Basic y Pewter para el tratamiento N₀ y Basic y Shakira para el tratamiento N₁₅₀, surgieron problemas técnicos con los equipos PicoBrew y los mostos se desperdiciaron y no se pudieron elaborar de nuevo al no disponer de muestras de malta suficiente. De los parámetros analíticos, los β -glucanos y el FAN son los que presentaron mayor variabilidad entre las muestras y, en ambos casos, parece apreciarse una disminución respecto los mostos cerveceros de partida. En referencia a la graduación alcohólica, se observan ciertas diferencias entre las muestras, dado que sus valores van desde 6.7 hasta 4.5 dependiendo de la muestra, hecho que pudiera deberse por la cantidad de carbohidratos libres obtenidos durante el malteado, por la eficacia de la elaboración del mosto y/o por la fermentación.

Si nos centramos en los compuestos implicados en el desarrollo del aroma y sabor de la cerveza, intervienen tanto los compuestos aromáticos volátiles como los aminoácidos. En las muestras analizadas, el alcohol superior mayoritario ha resultado ser el isoamilo y, por otro lado, el minoritario el feniletanol. Respecto los ésteres, el mayoritario ha sido el acetato de etilo y el minoritario el acetato isobutilo. De la misma manera que en los mostos cerveceros, el aminoácido glutamina y prolina, han resultado ser los dos aminoácidos con mayor contenido. En cierta manera, se puede observar una disminución del contenido de aminoácidos entre los mostos de partida y las cervezas resultantes y, en algunos casos, no se ha detectado su contenido, como por ejemplo en el caso de la asparagina, hidroxiprolina, metionina y serina, los cuales no se han detectado en las muestras de cerveza pesar de haberse detectado en sus correspondientes mostos. Como se ha descrito anteriormente, durante el metabolismo de la levadura se produce un consumo elevado de aminoácidos (Ferreira y Guido, 2018; Fontana y Buiatti, 2009; Jones y Pierce, 1964). Por otro lado, tanto en el caso de los compuestos aromáticos volátiles como de los aminoácidos, se aprecia una leve variabilidad entre muestras dependiendo del genotipo, año y nitrógeno.

Resulta importante destacar que, como se observa en la **Tabla 6.26** y en la **Tabla 6.27**, el contenido de diacetilo ha resultado ser mayor en las muestras del año 2019 respecto las del 2018, debido a que estas cervezas tuvieron un mayor tiempo de residencia en botella. Para obtener carbónico en botella, se realizó una segunda fermentación tras embotellar las cervezas y, como describen Gibson et al. (2018), durante la maduración se produce una disminución del diacetilo con el paso de los días. Los mostos de las muestras del año 2018 se elaboraron un mes antes que las del 2019, realizándose sus análisis en la misma fecha, es decir, las muestras de 2018 estuvieron un mayor número de días en botella respecto las de 2019, propiciándose así el consumo de diacetilo. Cabe destacar la importancia de controlar correctamente las condiciones de fermentación, maduración y segunda fermentación en botella, puesto que cualquier desviación puede producir compuestos aromáticos desagradables, como los descritos por Díaz et al. (2022), quienes observaron que frente bajos niveles de oxígeno durante la segunda fermentación en botella se producían compuestos aromáticos desagradables en boca.

Tabla 6.26. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados, compuestos aromáticos y perfil de aminoácidos de las cervezas elaborados a partir del primer malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas durante dos años bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	2018								2019								SED	
	N ₀				N ₁₅₀				N ₀				N ₁₅₀					
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira		
	PB	1	2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	
Alcohol (% v/v)		5.9	5.4	6.5	6.4	6.7	5.6	6.0	6.3	5.9	6.3	5.7	5.6	5.7	4.7	5.4	6.1	0.4
Amargor (IBU)		29	23	21	14	23	24	17	17	20	19	23	31	33	31	26	22	6
Atenuación real (%)		60	63	66	64	65	64	73	67	63	69	63	64	63	63	65	66	3
β-glucanos (mg/L)		30	87	16	28	44	88	17	23	60	9	294	190	77	162	68	71	79
Color (EBC)		11	8	9	13	10	15	8	15	8	6	12	7	9	7	7	6	2
Densidad (g/ml)		1.016	1.013	1.012	1.014	1.014	1.012	1.006	1.011	1.014	1.009	1.013	1.012	1.013	1.010	1.011	1.011	0.010
Extracto aparente (* p)		4.2	3.2	3.0	3.5	3.5	3.0	1.5	2.9	3.5	2.4	3.4	3.0	3.4	2.7	2.9	2.9	0.6
Extracto primitivo (% p/p)		15	13	15	15	16	13	13	15	14	14	14	13	14	12	13	14	1
Extracto real (%)		6.3	5.2	5.3	5.8	5.8	5.0	3.6	5.1	5.6	4.6	5.4	5.0	5.5	4.4	4.8	5.0	0.6
FAN (mg/L)		120	102	60	116	111	87	70	92	71	84	62	73	72	90	59	68	20
pH		4.7	4.7	4.7	4.6	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7
Sulfuroso (mg/L)		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	1.00	1.20	1.00	1.00	0.43
<i>Compuestos aromáticos</i>																		
Alcoholes superiores totales (mg/L)		127	133	145	152	148	112	146	121	122	144	137	135	102	97.3	131	134	12
Ácido feniletanol (mg/L)		4.7	6.6	4.0	7.4	3.4	1.5	5.4	11.3	2.6	5.1	4.2	3.8	5.6	6.8	5.3	1.8	1.8
β-Feniletanol (mg/L)		29	32	31	32	32	27	38	22	15	32	26	35	20	22	37	19	5
Isoamilo (mg/L)		80	81	90	99	94	69	87	84	86	92	89	81	68	63	75	93	8
Isobutanol (mg/L)		18	19	23	21	22	16	21	16	21	20	23	18	14	12	19	22	3
Ésteres totales (mg/L)		25	27	23	33	30	19	25	36	21	23	23	21	28	24	24	24	3
Acetato etilo (mg/L)		18	19	18	23	25	16	18	22	17	16	17	15	20	15	16	20	2
Acetato isoamilo (mg/L)		0.86	0.95	0.71	1.16	1.00	0.77	0.81	1.27	0.71	0.77	0.71	0.72	1.14	0.88	0.84	1.00	0.19
Acetato isobutilo (mg/L)		0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.01
Butirato etilo (mg/L)		0.12	0.12	0.11	0.16	0.14	0.08	0.11	0.15	0.08	0.11	0.12	0.10	0.11	0.09	0.09	0.10	0.02
Caprato de etilo (mg/L)		0.27	0.37	0.27	0.40	0.32	0.19	0.31	0.43	0.25	0.28	0.34	0.27	0.23	0.31	0.25	0.17	0.07
Caprilato etilo (mg/L)		0.43	0.55	0.48	0.63	0.55	0.35	0.49	0.61	0.35	0.46	0.44	0.43	0.36	0.40	0.45	0.41	0.05
Caproato etilo (mg/L)		0.15	0.19	0.16	0.21	0.19	0.12	0.16	0.21	0.11	0.17	0.16	0.15	0.13	0.16	0.15	0.14	0.03
Propionato etilo (mg/L)		0.08	0.07	0.09	0.10	0.11	0.07	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.07	0.05	0.07	0.01
Relación alcoholes-ésteres		5.0	4.8	6.2	4.6	4.9	5.8	5.7	3.4	5.9	6.3	6.0	6.5	3.7	4.1	5.5	5.7	1.1
Acetaldehído (mg/L)		6	19	17	12	11	9	17	20	27	12	17	21	11	15	36	15	4
Diacetilo (µg/L)		21	57	35	63	50	33	36	66	176	106	144	63	163	106	80	37	51
DMS (µg/L)		36	41	41	39	56	44	42	42	28	39	35	24	29	26	24	39	8
Pentanodiona (µg/L)		3	6	3	4	7	3	6	7	66	24	9	16	32	19	17	8	15
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>																		
Ácido aspártico		12	18	12	17	19	14	10	33	10	17	10	10	24	34	10	10	5
Ácido glutámico		22	24	26	28	29	25	15	40	15	27	15	15	32	32	15	15	6
Alanina		65	61	72	91	97	51	33	92	34	57	31	39	57	59	17	16	20
Arginina		15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	1
Cistina		10	10	10	10	10	10	10	10	10	13	10	10	10	10	10	10	1
Fenilalanina		28	25	27	42	32	16	15	36	15	15	15	15	22	20	15	15	6
Glicina		30	30	35	37	39	27	28	37	24	39	25	25	26	26	17	19	7
Glutamina		258	168	285	291	324	140	186	341	137	167	156	126	171	143	88	108	40
Histidina		15	15	19	19	20	15	15	18	15	15	15	15	15	15	15	15	1
Isoleucina		10	10	10	14	10	10	10	12	12	10	10	10	10	10	10	10	1
Leucina		12	10	12	21	14	10	10	16	10	10	10	10	10	10	10	10	3
Lisina		15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	0
Prolina		475	559	563	677	601	351	373	539	303	357	535	578	486	604	471	565	60
Tirosina		42	40	48	54	47	35	25	47	22	28	18	24	33	33	18	15	10
Triptófano		18	22	22	21	22	23	18	25	14	23	15	12	19	20	11	10	3
Valina		36	33	35	51	45	23	15	46	16	24	14	16	31	28	11	10	11

PB: PicoBrew; FAN: aminonitrógeno libre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.27. Concentraciones de los parámetros de calidad analizados, compuestos aromáticos y perfil de aminoácidos de las cervezas elaborados a partir del segundo malteado de cuatro variedades de cebada cultivadas durante dos años bajo dos condiciones de fertilización con nitrógeno. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	2018				2019								SED
	N ₀		N ₁₅₀		N ₀				N ₁₅₀				
	Planet Shakira		Pewter Planet		Basic Pewter		Planet Shakira		Basic Pewter		Planet Shakira		
	PB	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	
Alcohol (% v/v)	6.0	5.9	5.0	5.8	5.2	4.5	5.2	5.4	4.6	4.7	4.8	4.5	0.4
Amargor (IBU)	20	21	26	28	17	27	27	16	14	23	30	26	6
Atenuación real (%)	65	67	65	66	66	62	63	62	61	63	72	62	3
β-glucanos (mg/L)	36	59	128	22	138	175	32	219	221	147	10	347	79
Color (EBC)	8	7	7	11	6	7	7	6	6	7	6	6	2
Densidad (g/mL)	1.012	1.010	1.010	1.011	1.010	1.011	1.012	1.013	1.012	1.011	1.005	1.011	0.010
Extracto aparente (°P)	3.1	2.7	2.6	2.7	2.5	2.9	3.0	3.4	3.1	2.7	1.2	2.8	0.6
Extracto primitivo (% p/p)	14	14	12	14	12	11	13	13	12	12	10	11	1
Extracto real (%)	5	5	4	5	4	5	5	5	5	4	3	4	1
FAN (mg/L)	58	43	49	38	68	72	74	58	64	74	85	65	20
pH	4.6	4.6	4.7	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.8	4.8	4.9	4.8	4.7
Sulfuroso (mg/L)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.43
<i>Compuestos aromáticos</i>													
Alcoholes superiores totales (mg/L)	134	144	113	138	137	105	139	136	119	113	122	108	12
Ácido feniletanol (mg/L)	1	0	2	1	2	3	3	3	4	2	7	3	2
β-Feniletanol (mg/L)	27	28	24	27	28	23	30	21	21	24	23	21	5
Isoamilo (mg/L)	84	92	71	87	87	67	86	93	79	72	78	71	8
Isobutanol (mg/L)	23	24	18	25	23	14	22	22	19	17	20	16	3
Ésteres totales (mg/L)	16	20	16	19	18	21	22	24	23	16	27	16	3
Acetato etilo (mg/L)	14	18	13	16	14	16	17	19	17	13	18	12	2
Acetato isoamilo (mg/L)	0.49	0.70	0.57	0.71	0.64	0.87	0.87	0.95	1.02	0.57	1.18	0.61	0.19
Acetato isobutilo (mg/L)	0.04	0.05	0.04	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.08	0.04	0.01
Butirato etilo (mg/L)	0.09	0.09	0.07	0.09	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.07	0.11	0.07	0.02
Caprato de etilo (mg/L)	0.13	0.11	0.23	0.19	0.23	0.22	0.24	0.30	0.24	0.21	0.34	0.23	0.07
Caprilato etilo (mg/L)	0.33	0.36	0.36	0.37	0.32	0.35	0.39	0.44	0.37	0.31	0.38	0.34	0.05
Caproato etilo (mg/L)	0.11	0.11	0.11	0.13	0.10	0.09	0.11	0.13	0.11	0.09	0.16	0.10	0.03
Propionato etilo (mg/L)	0.07	0.08	0.06	0.08	0.07	0.06	0.07	0.08	0.07	0.06	0.05	0.06	0.01
Relación alcoholes-ésteres	8.3	7.3	7.0	7.4	7.7	5.1	6.3	5.7	5.2	7.2	4.6	6.6	1.1
Acetaldehído (mg/L)	2	2	4	4	22	5	4	22	12	8	14	17	4
Diacetilo (µg/L)	12	12	31	25	198	171	145	169	234	171	79	290	51
DMS (µg/L)	25	19	26	22	27	21	44	26	25	37	40	12	8
Pentanodiona (µg/L)	3	3	9	3	84	44	73	52	52	88	20	84	15
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>													
Ácido aspártico	10	10	10	10	10	14	10	10	10	18	21	10	5
Ácido glutámico	15	15	16	15	15	20	15	15	15	19	29	15	6
Alanina	21	15	29	16	16	42	25	20	19	51	41	26	20
Arginina	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	18	15	1
Cistina	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	1
Fenilalanina	15	15	15	15	15	16	15	15	15	15	17	15	6
Glicina	24	15	23	17	19	21	22	18	15	26	33	17	7
Glutamina	167	131	120	144	88	103	104	80	61	136	131	74	40
Histidina	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	1
Isoleucina	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	1
Leucina	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	14	10	3
Lisina	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	16	15	0
Prolina	469	535	395	506	282	372	157	233	405	261	268	401	60
Tirosina	22	15	22	18	15	26	16	15	18	21	31	16	10
Triptófano	15	10	17	12	10	18	12	10	13	21	15	12	3
Valina	11	10	12	10	10	23	13	10	13	21	25	13	11

PB: PicoBrew; FAN: aminonitrógeno libre.

Dada la importancia de los aminoácidos durante el metabolismo de las levaduras y su implicación en el desarrollo de compuestos involucrados en las características organolépticas de la cerveza, en la **Figura 6.6** quedan representados los contenidos medios de los aminoácidos detectados según combinación nitrógeno × año × malteado. El mayor contenido en aminoácidos se ha dado en las muestras procedentes del primer malteado de 2018 para ambas condiciones nitrogenadas, principalmente por un mayor contenido en alanina, glutamina, prolina y valina, siendo estos los aminoácidos los que más varían entre las muestras estudiadas. Los demás aminoácidos se mantienen constantes. Si comparamos réplicas de malteado para la misma combinación nitrógeno × año, se puede observar una disminución importante sobre el contenido en la segunda réplica. Contrariamente a las muestras de mosto, si comparamos los distintos años de cultivo dentro de una misma condición nitrogenada, en 2018 el contenido es mayor que en las muestras de 2019. Esto tan solo puede deberse a la fermentación, pudiendo haber sido más precaria en las muestras del 2018 que en las del 2019 y por ello el consumo de aminoácidos ha sido menor.

De la misma manera, los compuestos aromáticos volátiles medios según combinación nitrógeno × año se han recogido en la **Figura 6.7**. Se observa que el mayor contenido se obtuvo en las muestras de la segunda réplica de malteado de las muestras de 2019, principalmente por la concentración de pentanodiona, y el menor contenido en las muestras de la segunda réplica de malteado de 2018, mayormente por las concentraciones de ácido feniletanol, acetaldehído, diacetilo y DMS, en ambos casos se ha dado independientemente del tratamiento nitrogenado. Una gran parte de los compuestos aromáticos son producto del metabolismo de las levaduras (Hirst y Richter, 2016; Olaniran et al., 2017; Pires et al., 2014), por lo que un mayor contenido de éstos en las muestras del 2019 corrobora que la fermentación y/o maduración de las muestras del 2018 puede haberse visto disrumpida, ya sea por la propia composición del mosto o por factores externos, y haber sido insuficiente. Aunque claramente la principal diferencia entre las combinaciones nitrógeno × año × malteado en los compuestos aromáticos se ha dado en el contenido de diacetilo como se ha comentado anteriormente. Los compuestos mayoritarios en nuestras muestras son el isoamilo y diacetilo, así como los minoritarios el acetato isoamilo, acetato isobutilo, butirato, caprato, caprilato, caproato y propionato de etilo.

Puesto que los compuestos aromáticos presentes en la cerveza provienen, en gran parte, del metabolismo de la levadura por medio de la utilización de aminoácidos como nutrientes, si se compara el contenido de aminoácidos de los mostos cerveceros (**Figura 6.5**) con el contenido de compuestos aromáticos volátiles de las cervezas resultantes (**Figura 6.7**), a grandes rasgos se observa un mayor contenido aromático en las muestras de cerveza provenientes de los mostos con mayor concentración de aminoácidos. Es el caso de los mostos cerveceros elaborados a partir de cebadas malteadas en 2019, en ambos casos de fertilización ($N_{0_19_2}$ y $N_{150_19_2}$), los cuales fueron mostos con mayor contenido en aminoácidos, resultaron también en las cervezas con un mayor contenido de compuestos aromáticos volátiles. Como describió Åyrápáá (1970), la disponibilidad de aminoácidos en el mosto para la levadura define en gran medida el perfil y contenido de alcoholes superiores, ésteres y aldehídos.

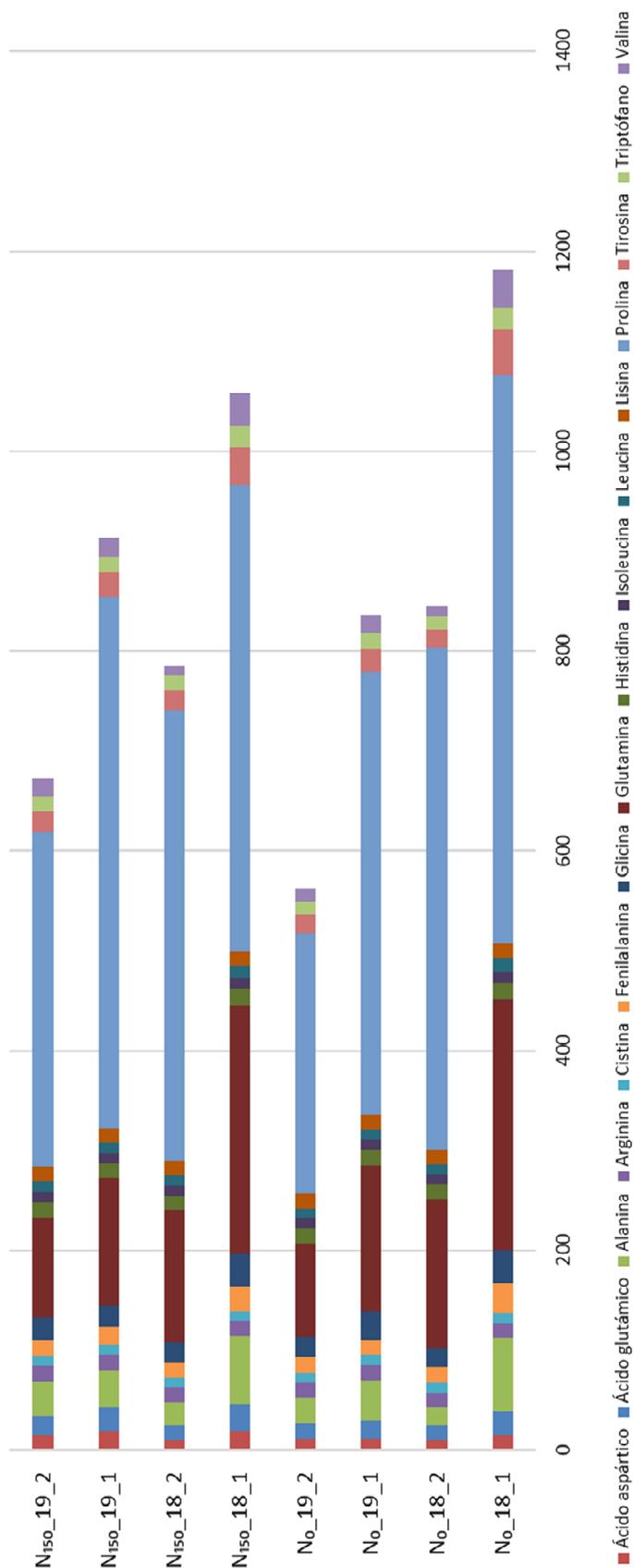


Figura 6.6. Contenido medio de los aminoácidos determinados en las cervezas para cada combinación nitrógeno x año x malteado.

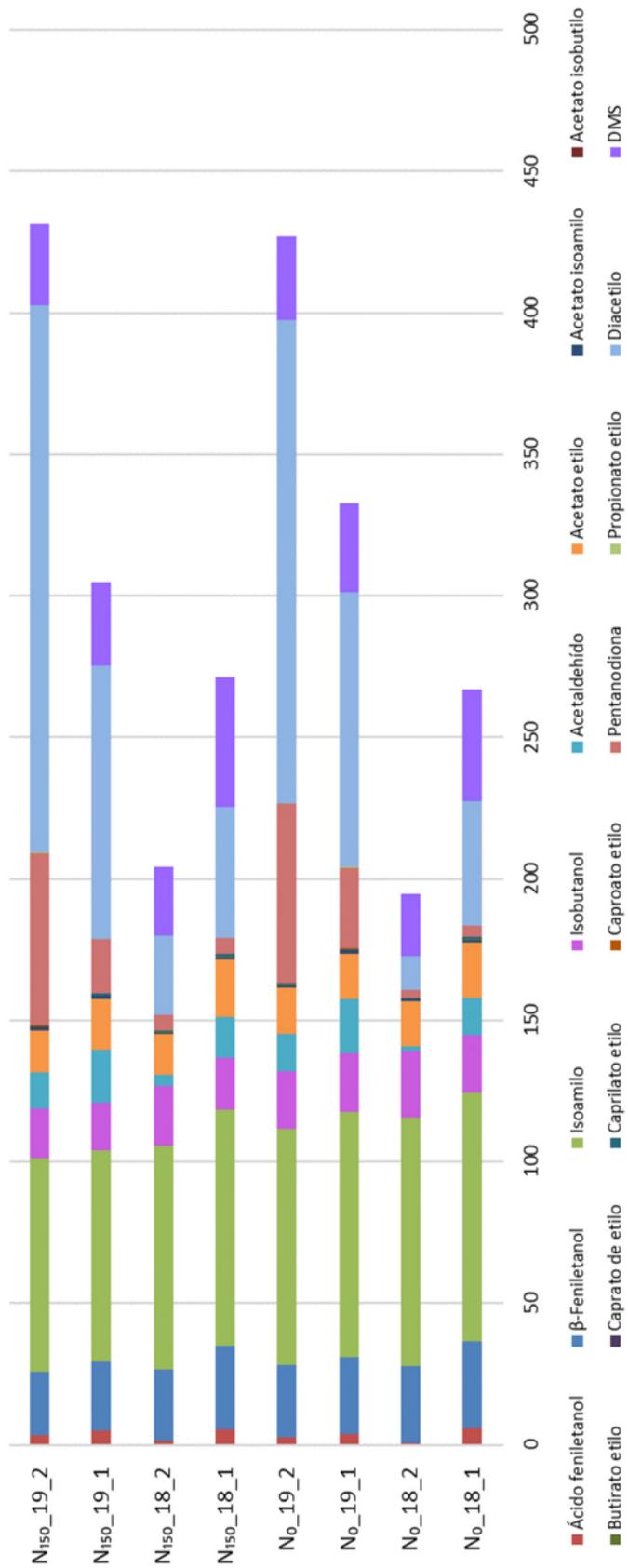


Figura 6.7. Contenido medio de los compuestos aromáticos determinados en las cervezas para cada combinación nitrógeno x año x malteado.

El sabor de la cerveza no viene dado solo por los compuestos aromáticos derivados de la fracción nitrogenada, sino que otras moléculas como los minerales y/o carbohidratos presentes en los mostos de partida también aportan matices organolépticos importantes. Por esta razón, se han contemplado todos los parámetros analizados en el análisis de varianza, los resultados del cual se presentan en la **Tabla 6.28** para los mostos cerveceros estudiados. El año tuvo un efecto significativo sobre el contenido de β -glucanos, cloruros y sulfatos, así como sobre el color y los aminoácidos ácido aspártico, asparagina, glutamina, metionina y prolina. La aplicación de fertilización nitrogenada tuvo un efecto significativo sobre el contenido de fosfatos, zinc y el aminoácido asparagina. Por otro lado, el genotipo influyó significativamente sobre el contenido de fosfatos y sulfatos, así como los aminoácidos arginina y asparagina. La repetición industrial, que hace referencia a la réplica de malteado y al equipo PicoBrew empleado para la elaboración del mosto, se ha identificado como variable significativa sobre el contenido de β -glucanos, diacetilo, FAN y sulfatos, así como sobre el color y el aminoácido arginina. Referente a las interacciones, tan solo el año \times nitrógeno y el año \times genotipo han tenido un efecto significativo sobre el contenido en zinc y los sulfatos, respectivamente. En otras palabras, los mostos cerveceros analizados se han visto influenciados tanto por las condiciones ambientales y de manejo de cultivo como por el genotipo y las condiciones de proceso.

La contribución del genotipo y las condiciones ambientales sobre las características sensoriales también han sido reportadas por Herb et al. (2017a), Marconi et al. (2011), Nie et al. (2010) o Stewart et al. (2022), entre otros, así como la calidad del grano de cebada que en gran parte está influenciada por las prácticas agronómicas del cultivo (Díaz et al., 2022; McMillan et al., 2020). Aunque también existe una gran influencia del proceso de malteado, en gran parte sobre el contenido de aminoácidos en la malta final y, como consecuencia, sobre los aminoácidos que estarán presentes en el mosto cervecero (Nie et al., 2010). En este trabajo, no es posible atribuir al malteado las variaciones observadas en el perfil de aminoácidos de las muestras, puesto que entre los dos años de estudio (2018 y 2019) las condiciones de malteado empleadas han resultado distintas y los equipos empleados para la elaboración de mosto cervecero a pequeña escala no han sido del todo comparables entre ellos. De ahí que las variables repetición industrial y año tengan un efecto significativo tan importante.

Respecto a las diferencias para el parámetro color, éstas pueden venir dadas por las diferencias en el proceso de malteado entre 2018 y 2019, más concretamente por las condiciones de la etapa secado-tostado. En las muestras de 2018, el secado-tostado duró tres horas menos que en 2019, resultando en un incremento de temperatura más abrupto que puede haber fomentado un aumento en las reacciones de Maillard, generándose más compuestos responsables de aportar color y aromas a la malta resultante. Estas diferencias en el color también podrían deberse a incidencias durante la etapa de ebullición del mosto cervecero en los equipos PicoBrew, puesto que cualquier descontrol en la regulación de la temperatura de ebullición ha podido propiciar la formación de compuestos involucrados en el desarrollo del color.

Por otro lado, sobre el contenido de β -glucanos también se han observado diferencias y, a pesar de que Paynter y Harasymow (2010) determinaran una mayor influencia del genotipo respecto las condiciones ambientales, en las muestras estudiadas en este proyecto la variable con mayor repercusión ha sido el año, la cual incluye tanto las condiciones ambientales como las condiciones de malteado.

Tabla 6.28. Valores p del ANOVA para el modelo fijo del análisis de los mostos obtenidos de las cuatro variedades de cebada malteada cultivadas bajo dos condiciones de fertilización nitrogenada durante dos años consecutivos.

	Año (A)	Nitrógeno (N)	Genotipo (G)	A × N	A × G	N × G	A × N × G	Repetición industrial
GL	1	1	3	1	3	3	3	3
Amargor	0.2523	0.5766	0.7325	0.8096	0.5993	0.8860	0.5780	0.6465
β -glucanos	0.0005	0.2011	<i>0.0309</i>	0.9691	<i>0.0158</i>	0.8782	0.1644	0.0061
^o Balling	<i>0.0454</i>	0.0533	<i>0.0240</i>	0.0705	0.4750	0.3709	0.9174	<i>0.0221</i>
Calcio	0.4301	<i>0.0258</i>	<i>0.0211</i>	0.1643	0.2695	0.6814	0.7248	0.2896
Cloruros	0.0031	<i>0.0147</i>	<i>0.0211</i>	0.7676	0.1371	0.2850	0.7170	0.2596
Color	<0.0001	0.8512	0.0817	0.4024	0.8103	0.7507	0.3358	0.0073
Diacetilo	0.1830	0.4048	0.6317	0.0727	0.6846	0.7344	0.1684	0.0007
FAN	0.0737	0.6578	0.4975	0.8220	0.0597	0.8969	0.3106	0.0077
Fosfatos	0.1193	0.0033	0.0026	0.9264	0.3355	0.3697	0.3843	0.0725
Magnesio	0.3186	0.1614	0.1389	0.0568	0.2279	0.2495	0.8588	<i>0.0265</i>
Nitratos	0.1808	0.6086	0.8981	0.6738	0.6104	0.4686	0.5788	0.2945
Oxalatos	0.0544	0.5742	0.2879	0.4886	0.2144	0.8677	0.8732	0.2111
pH	<i>0.0248</i>	0.1503	0.4743	0.4685	0.8161	0.4345	0.8554	0.4136
Sulfatos	0.0002	0.2855	0.0096	0.2825	0.0065	0.1199	0.2964	0.0001
Zinc	0.1071	0.0003	0.5441	0.0020	0.6725	0.1905	0.7790	0.2251
<i>Aminoácidos</i>								
Ácido aspártico	<0.0001	0.7184	0.3839	0.8447	0.9861	0.4662	0.3277	<i>0.0248</i>
Ácido glutámico	0.5505	0.0771	0.7402	0.2560	0.2857	0.7001	0.3203	0.9594
Alanina	0.0972	0.4080	0.6380	0.1518	0.6256	0.6394	0.3502	0.2945
Arginina	0.2899	0.9211	0.0053	0.2162	0.5611	0.2033	0.1799	0.0097
Asparagina	0.0011	0.0023	0.0005	0.3222	0.7172	<i>0.0229</i>	0.1019	0.1516
Cistina	0.1913	0.3005	0.2930	0.5305	0.9744	0.4254	0.9475	0.4324
Fenilalanina	0.1868	0.7604	0.4864	0.2764	0.8590	0.2010	0.2134	<i>0.0436</i>
Glicina	0.4887	0.5958	0.7517	0.3163	0.6603	0.7136	0.2978	0.3578
Glutamina	0.0044	0.8205	0.5536	0.4389	0.9637	0.3262	0.3973	0.1255
Hidroxiprolina	0.6307	0.9285	0.7870	0.2920	0.3099	0.6913	0.9538	0.7391
Histidina	0.9554	0.7792	0.5779	0.2609	0.7615	0.4290	0.2155	0.3206
Isoleucina	0.3053	0.7649	0.3423	0.1954	0.7132	0.6725	0.6713	0.2333
Leucina	0.0581	0.1865	0.4444	0.3507	0.5898	0.3813	0.1425	0.0573
Lisina	0.6706	0.1862	0.6372	0.6736	0.4199	0.8168	0.4348	0.2018
Metionina	0.0028	0.0534	0.3371	0.1541	0.2224	0.8735	0.3134	0.4271
Prolina	0.0011	0.8706	0.9736	0.6474	0.8748	0.3045	0.9604	0.7901
Serina	0.2831	0.7040	0.5181	0.2819	0.5954	0.2971	0.1240	0.0656
Tirosina	0.1964	0.4787	0.6369	0.2996	0.7844	0.3416	0.1867	0.0716
Treonina	0.2510	0.6264	0.2895	0.3599	0.5499	0.4468	0.1590	0.0732
Triptófano	0.6714	0.2891	0.2741	0.1984	0.8497	0.3672	0.7116	0.2892
Valina	0.1143	0.7245	0.9037	0.2732	0.6402	0.3407	0.2120	0.0835

GL: grados de libertad; A: año; N: nitrógeno; G: genotipo. La repetición industrial hace referencia a la combinación de malteado × PicoBrew. FAN: aminonitrógeno libre. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Si nos centramos en las muestras de cerveza, en la **Tabla 6.29** se puede observar como el año influyó significativamente sobre el contenido de caprilato de etilo, pentanodiona y los aminoácidos fenilalanina, glutamina, histidina y prolina. En particular, los efectos de las variables nitrógeno y genotipo no se han identificado como significativos, a pesar de que Herb et al. (2017a) determinaron que las características sensoriales de la cerveza tales como químico, floral, afrutado, tostado y caramelo se asociaban significativamente al genotipo. Contrariamente, ninguna de las interacciones ha resultado tener un efecto significativo sobre los parámetros analizados en las cervezas, a excepción de la interacción triple ($A \times N \times G$), la cual tuvo un efecto significativo sobre el contenido en acetaldehído. Respecto a la repetición industrial, los resultados indican una implicación significativa sobre el contenido en alcohol, acetaldehído, caprilato de etilo, pentanodiona y el aminoácido prolina.

Cualquier desequilibrio de la composición del mosto cervecero puede implicar, en mayor o menor medida, desviaciones en la fermentación, tal y como describieron Venkateshwar et al. (2010), quienes observaron el impacto de los minerales y iones metálicos sobre el metabolismo de la levadura durante la fermentación, viéndose alterado el crecimiento de las células de la levadura, su viabilidad, actividad enzimática, tolerancia al estrés y su capacidad de fermentación alcohólica. En los mostos estudiados en este trabajo no se han observado grandes diferencias en el contenido de estos compuestos, por ello, y teniendo en cuenta las pequeñas diferencias observadas en el perfil de compuestos aromáticos volátiles analizados en las cervezas de estudio, la composición iónica no parece tener un impacto en las características aromáticas de la cerveza.

Considerando los resultados expuestos hasta ahora, parece ser que, por medio del metabolismo de la levadura durante la etapa de fermentación y maduración, el producto resultante se estabiliza, puesto que entre las muestras de mosto cervecero y cerveza se ve una disminución del efecto significativo de las variables año y nitrógeno. Concretamente, en las muestras de mosto cervecero se observa un mayor número de aminoácidos influenciados significativamente por las variables de estudio, mientras que en las muestras de cerveza el número de aminoácidos con influencia significativa es menor. Por otro lado, como describieron Olaniran et al. (2017), durante la fermentación y maduración se producen re-asimilaciones y reducciones de compuestos por parte de la levadura que podrían estabilizar el producto final, como en el caso del diacetilo. Este hallazgo podría explicar el hecho de que en las muestras estudiadas en este trabajo no se haya determinado ninguna variable como significativa sobre este compuesto.

Por lo que al aroma y sabor se refiere, son numerosos los autores que destacan la influencia de los compuestos procedentes de lúpulo (Díaz et al., 2022; Olaniran et al., 2017; Stewart et al., 2022). En este trabajo, dado que el objetivo fue determinar la implicación de la cebada como materia prima sobre los compuestos aromáticos de la cerveza, se obtuvo por emplear un mismo lúpulo para todas las elaboraciones, además de usarlo en formato extracto, el cual asegura una mejor conservación a lo largo del tiempo y una mejor extracción durante la etapa de cocimiento. Por tanto, la implicación del lúpulo sobre los compuestos involucrados en el aroma y sabor de las cervezas estudiadas, se puede considerar una variable común y estable entre elaboraciones.

Tabla 6.29. Valores *p* del ANOVA para el modelo fijo del análisis de las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos elaborados.

	Año	Nitrógeno	Genotipo	A × N	A × G	N × G	A × N × G	Repetición industrial
	(A)	(N)	(G)					
GL	1	1	3	1	3	3	3	3
Alcohol	<i>0.0376</i>	0.1470	0.1527	0.2648	0.8514	0.4536	0.5102	<i>0.0048</i>
Amargor	0.2758	0.5209	0.5496	0.9433	0.3944	0.9087	0.7454	0.4608
Atenuación real	0.7686	0.4018	0.1403	0.5906	0.7604	0.4008	0.5928	0.3228
β-glucanos	0.2201	0.4068	0.4961	0.4737	0.4515	0.5022	0.8093	0.1212
Color	<i>0.0271</i>	0.4338	0.6903	0.1555	0.3707	0.4718	0.5668	0.2001
Densidad	0.2996	0.1597	0.1452	0.7866	0.7258	0.4283	0.8325	0.6492
Extracto aparente	0.2974	0.1612	0.1469	0.7915	0.7295	0.4253	0.8290	0.6483
Extracto primitivo	0.0497	0.0825	0.2117	0.5245	0.9141	0.4382	0.9553	<i>0.0283</i>
Extracto real	0.1704	0.1170	0.1726	0.9912	0.7942	0.4242	0.9523	0.3990
FAN	0.1858	0.6513	0.4506	0.4378	0.1731	0.9013	0.8916	0.3962
pH	0.0788	0.3412	0.1633	0.4208	0.4981	0.9279	0.9724	0.3513
Sulfuro	0.2031	0.4215	0.4617	0.6016	0.8010	0.8420	0.8735	0.5895
<i>Compuestos aromáticos</i>								
Alcoholes superiores totales	0.1345	<i>0.0412</i>	0.1127	0.6458	0.9348	0.2621	0.2220	0.6353
Ácido feniletanol	0.3261	0.2890	0.4828	0.7548	<i>0.0494</i>	0.1502	0.0784	0.0880
β-Feniletanol	0.0611	0.4295	0.2098	0.9894	0.7269	0.2837	0.9086	0.2287
Isoamilo	0.4278	0.0578	0.1500	0.6038	0.9817	0.4859	0.2943	0.6214
Isobutanol	0.5558	<i>0.0378</i>	0.1459	0.6129	0.7815	0.7369	0.1962	0.5696
Ésteres totales	0.1053	0.4710	0.2020	0.8149	<i>0.0474</i>	0.1085	0.2835	0.0646
Acetato etilo	0.0807	0.8625	0.1458	0.9150	0.1094	0.0565	0.4865	0.0935
Acetato isoamilo	0.9702	0.3350	0.4645	0.5582	0.1573	0.2254	0.5370	0.5673
Acetato isobutilo	0.6786	0.4680	0.8790	0.9797	0.2464	0.1366	0.8944	0.3542
Butirato etilo	<i>0.0282</i>	0.9252	0.2127	0.8531	0.1149	0.2111	0.7825	0.0904
Caprato de etilo	0.2358	0.7412	0.8294	0.6015	0.3740	0.5250	0.3558	0.2228
Caprilato etilo	<i>0.0012</i>	0.9573	0.0529	0.7269	0.1059	<i>0.0318</i>	0.2520	<i>0.0051</i>
Caproato etilo	<i>0.0494</i>	0.5529	0.5452	0.7543	0.3472	0.2868	0.4874	0.0246
Propionato etilo	0.1466	0.6125	0.0789	0.5741	0.7194	0.4164	0.2452	0.1419
Relación alcoholes – ésteres	0.9459	0.2322	0.8221	0.4854	0.2431	0.4789	0.4315	0.1858
Acetaldehído	<i>0.0388</i>	0.4644	<i>0.0318</i>	0.8674	0.1127	<i>0.0193</i>	<i>0.0040</i>	<i>0.0011</i>
Diacetilo	<i>0.0127</i>	0.7300	0.7014	0.9251	0.6492	0.6788	0.9406	0.0971
DMS	0.2466	0.7564	0.3678	0.9065	0.1122	0.3960	0.1900	0.0370
Pentanodiona	<i>0.0041</i>	0.4050	0.9898	0.4860	0.7001	0.8602	0.1393	<i>0.0036</i>
<i>Aminoácidos</i>								
Ácido aspártico	0.9911	<i>0.0401</i>	0.1513	0.9521	0.0623	0.5424	0.1009	0.4054
Ácido glutámico	0.4397	0.2236	0.4844	0.8803	0.1425	0.6421	0.2890	0.3308
Alanina	<i>0.0318</i>	0.6693	0.7137	0.9001	0.1210	0.5876	0.4240	0.1399
Arginina	0.2148	0.7226	0.8527	0.4542	0.2975	0.6925	0.6783	0.2738
Cistina	0.2286	0.3646	0.5084	0.6000	0.8632	0.7736	0.8575	0.6129
Fenilalanina	<i>0.0037</i>	0.7564	0.2336	0.4943	0.1157	0.7212	0.6485	0.1897
Glicina	0.2221	0.7580	0.8998	0.8549	0.3786	0.8091	0.5390	0.1894
Glutamina	<i>0.0005</i>	0.7708	0.3086	0.6556	<i>0.0206</i>	0.4522	0.2938	<i>0.0479</i>
Histidina	<i>0.0030</i>	0.2437	0.0974	0.5646	0.0909	0.0913	<i>0.0319</i>	0.0877
Isoleucina	0.2953	0.9131	0.2222	0.7741	0.1238	0.9162	0.8789	0.4317
Leucina	0.0671	0.5954	0.2525	0.8865	0.1647	0.9854	0.7277	0.6503
Lisina	0.2148	0.7226	0.8527	0.4542	0.2975	0.6925	0.6783	0.2738
Prolina	<i>0.0035</i>	<i>0.0306</i>	<i>0.0162</i>	0.9940	<i>0.0487</i>	<i>0.0468</i>	0.3024	<i>0.0003</i>
Tirosina	<i>0.0135</i>	0.9626	0.9529	0.4665	0.4069	0.8558	0.4873	0.1578
Triptófano	<i>0.0194</i>	0.4858	0.0575	0.8617	0.1523	0.4466	0.4145	0.0691
Valina	<i>0.0310</i>	0.8050	0.7529	0.5154	0.1421	0.6780	0.5937	0.2543

GL: grados de libertad; A: año; N: nitrógeno; G: genotipo. La repetición industrial hace referencia a la combinación de malteado × PicoBrew. FAN: aminonitrógeno libre; DMS: sulfuro de dimetilo. Letra en negrita y cursiva: $p \leq 0.01$; letra en cursiva: $0.05 > p > 0.01$.

Para realizar el análisis multivariante, se seleccionaron los parámetros significativos en mosto y cerveza, representándose los PCA en la **Figura 6.8**. En las muestras de mostos cerveceros (**Figura 6.8(A)**), si nos centramos en el PCA1, se puede apreciar como las muestras procedentes de la campaña 2018 se agrupan a la izquierda del eje principal y las del 2019 a su derecha, pudiéndose asociar la campaña 2019 a un mayor contenido en sulfatos y cloruros, así como de aminoácidos, y la campaña 2018 al contenido de fosfatos y arginina. Coincidiendo con lo explicado anteriormente, el parámetro color está más asociada a las muestras del 2018, corroborando en parte que puede venir explicado por el proceso de malteado. Si analizamos el PCA2, podemos ver agrupado el genotipo Planet (PL) en la parte inferior del eje principal, mientras que los demás genotipos se encuentran en la parte superior, mostrando un posible efecto del genotipo sobre los parámetros incluidos, tal y como se ha determinado anteriormente tras el análisis individual (**Tabla 6.28**). Una peculiaridad detectada es que, a pesar de haberse detectado en el análisis individual de las muestras, al realizar el análisis conjunto no se aprecian diferencias entre tratamientos nitrogenados en ninguno de los componentes. Este hecho podría venir dado porque la variabilidad de los parámetros sobre los cuales el abonado nitrogenado puede tener un efecto, una vez realizado el proceso de elaboración del mosto cervecero, se ve reducido y pasan a ser las condiciones del proceso y el año de cultivo las variables con mayor efecto.

Si nos centramos en las muestras de cerveza (**Figura 6.8(B)**), el PCA1 agrupa las muestras del 2018 a la derecha del eje principal, mayormente asociadas a los aminoácidos, y las del 2019 a su izquierda, relacionadas mayormente con el contenido de acetaldehído y pentanodiona. Esto podría venir dado por la reducción de ambos compuestos durante la fermentación (Brányik et al., 2008) y, como se ha comentado anteriormente, las muestras del 2018 tuvieron más días de segunda fermentación en botella que las del 2019 puesto que se elaboraron un mes antes y todas se analizaron en las mismas fechas al finalizar las elaboraciones. Por otro lado, coincidiendo con el análisis individual (**Tabla 6.29**), las variables nitrógeno y genotipo no tienen un efecto significativo, tras el análisis conjunto tampoco se observa en ninguno de los componentes. Este hecho podría venir dado por todos los procesos involucrados en el metabolismo de las levaduras durante la fermentación que gestionan las posibles diferencias entre parámetros.

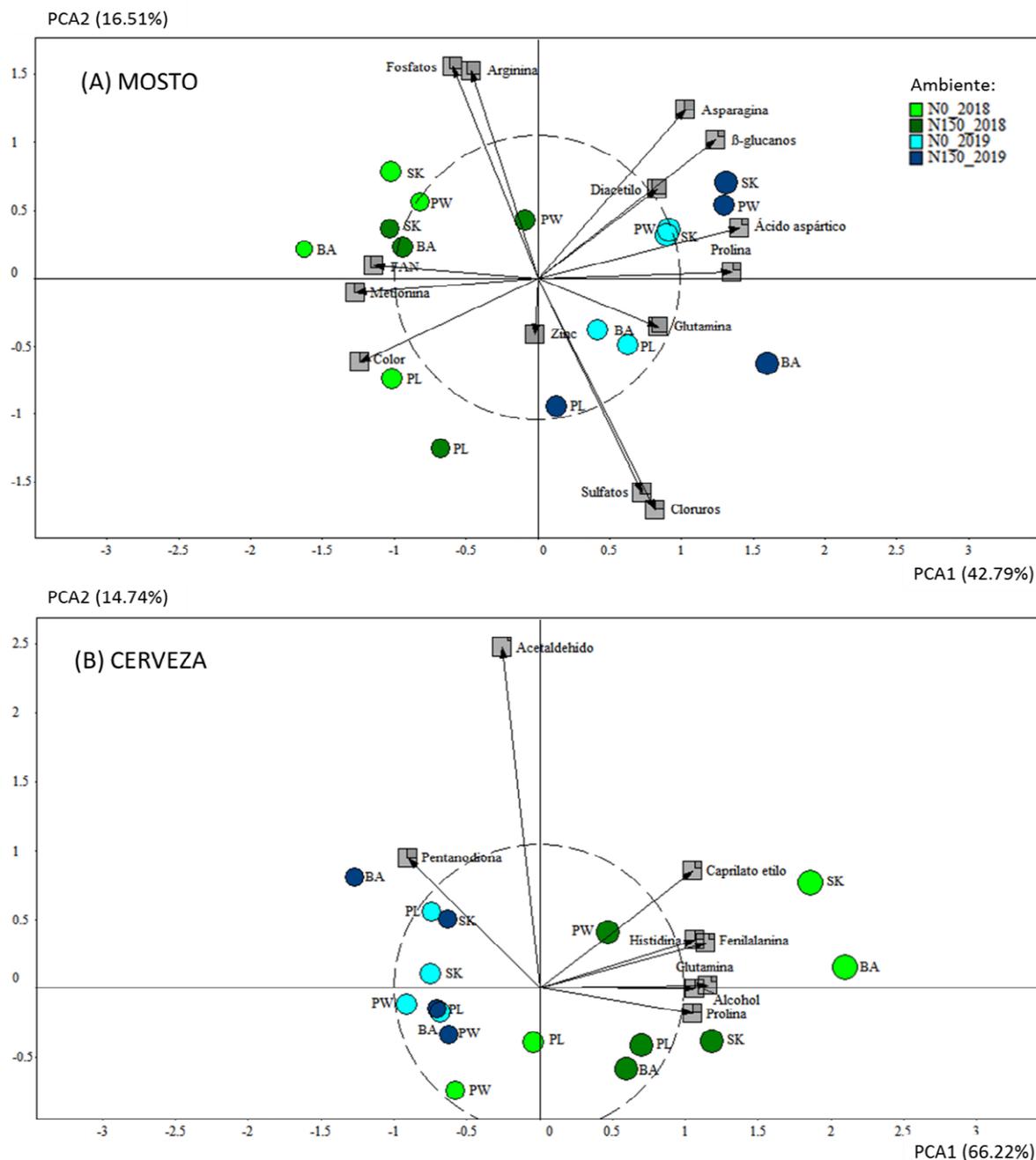


Figura 6.8. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros analíticos significativos de los mostos cerveceros (A), y sus correspondientes cervezas (B), elaborados a partir de cuatro genotipos de cebada distintos cultivados durante dos años bajo dos condiciones nitrogenadas distintas. El color de los círculos identifica el ambiente (combinación nitrógeno × año). BA: basic; PW: pewter; PL: planet; SK: shakira. FAN: amino nitrógeno libre.

Se ha realizado el ANOVA de los ejes uno y dos de los componentes principales (PCA1 y PCA2) con tal de contrarrestar las observaciones destacadas anteriormente (**Tabla 6.30**). En las muestras de mosto cervicero, según los resultados mostrados en la **Tabla 6.30(A)** se observa que la variabilidad del PCA1, que explica un 42.79%, se asocia significativamente a la variable año, así como el PCA2, explicando un 46.51% de la variabilidad total, estaría asociado significativamente a la variable genotipo. La variable año se ve confundida tanto por las

condiciones ambientales como por las condiciones del malteado, por lo que sumado a la significancia del efecto genotípico en el PCA2 podría indicar que las diferentes variedades estudiadas tienen un comportamiento distinto frente las mismas condiciones de proceso.

Por otro lado, en las muestras de cerveza (**Tabla 6.30(B)**) el PCA1, que explica un 66.22% de la variabilidad total, se asocia significativamente a la variable año, contrariamente al PCA2, aun explicando un 14.74% no se asocia significativamente a ninguna variable de estudio. Al realizar el análisis conjunto, cabe destacar que la variable año no incluye solo las condiciones ambientales, sino que también engloba las condiciones del malteado y la posible implicación del equipo PicoBrew empleado. Por ello, el efecto significativo de esta variable coincide en gran medida con Herb et al. (2017b), quienes también reportaron un efecto significativo del malteado sobre el diacetilo, entre otros parámetros.

Tabla 6.30. Valores *p* del ANOVA de los ejes uno y dos de los componentes principales (PCA1 y PCA2) del PCA para las muestras de mosto cervecero (A) y cerveza (B) procedentes de cebada malteada cultivada durante dos años y bajo dos condiciones nitrogenadas distintas.

	GL	(A) Mosto		(B) Cerveza	
		PCA1	PCA2	PCA1	PCA2
Año (A)	1	0.0015	0.3094	0.0063	0.5017
Nitrógeno (N)	1	0.0839	0.2858	0.7827	0.9252
Genotipo (G)	3	0.2445	0.0087	0.2220	0.8600
A × N	1	0.8464	0.3990	0.9010	0.7220
A × G	3	0.2412	0.1700	0.1857	0.9100
N × G	3	0.3041	0.4923	0.2108	0.8404

A: año; N: nitrógeno; G: genotipo; GL: grados de libertad. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A × N × G) se ha utilizado como término error.

Cabe resaltar el impacto del efecto genotípico, puesto que tanto en el análisis individual (**Tabla 6.28** y **Tabla 6.29**) como en el análisis conjunto (**Tabla 6.30**) se detecta en las muestras de mosto, pero no en las muestras de cerveza. Este hecho, como los comentados a lo largo de este capítulo, puede deberse al metabolismo de la levadura, puesto que desencadena numerosas reacciones enzimáticas que acaban transformando los compuestos presentes en el mosto cervecero. En este trabajo se ha evaluado que, a pesar de partir de mostos con leves diferencias en su composición debidas al tratamiento nitrogenado y/o al genotipo, las cervezas resultantes no se ven influenciadas por estas variables. Tan solo el año es la variable de mayor impacto en ambas fracciones estudiadas (mosto y cerveza) y, teniendo en cuenta que esta variable recoge tanto las condiciones ambientales propias del año como las condiciones de proceso, parece indicar que el procesamiento por parte de la levadura puede llegar a equilibrar las diferencias dadas por el manejo del cultivo y/o el genotipo, pero no las diferencias propiciadas por la climatología del año o por la repercusión del proceso de malteado y/o elaboración de cerveza. Por ello, ha resultado interesante analizar en profundidad la evolución del componente ambiental y el componente genotípico desde la cebada hasta la cerveza, en el apartado expuesto a continuación, para evaluar así la implicación de los cambios producidos por las etapas de proceso y esclarecer la repercusión de las diferencias en la materia prima sobre la calidad del producto final.

6.4. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÍPICOS Y AMBIENTALES DESDE LA CEBADA HASTA LA CERVEZA

Algunos autores han definido el término *terruño* sobre la cebada y/o cerveza (Herb et al., 2017a; Sayre-Chavez et al., 2022), es decir, la implicación de las condiciones agroclimáticas, como conjunto de suelo y clima, sobre compuestos aromáticos de la cerveza. De la misma manera, se ha destacado la variabilidad genotípica sobre compuestos involucrados en el desarrollo del sabor (Bettenhausen et al., 2018; Bettenhausen et al., 2020; Herb et al., 2017a; Herb et al., 2017b). Por ello, se ha llevado a cabo un estudio sobre la implicación de estas variables sobre las muestras estudiadas, con tal de esclarecer la posible existencia de *terruño* en cervezas elaboradas a partir de materia prima procedente de cultivos de la Valle del Ebro.

Se utilizaron cuatro variedades de cebada (Basic, Pewter, Planet y Shakira), cultivadas en cuatro localidades distintas (Bell-lloc d'Urgell, Sádaba, Saganta y Sariñena) durante dos años de cultivo (2017-2018 y 2018-2019). El método de micro-malteado y las condiciones del proceso se recogen en el apartado 5.2.3 de Materiales y métodos, así como la metodología para la elaboración de mosto cervecero y cerveza en el apartado 5.3. Las condiciones climáticas se muestran en las **Figuras 10.1 a 10.3** en el apartado Anejo.

6.4.1. CEBADA

En la **Tabla 6.31** y **Tabla 6.32** se muestran las concentraciones de los parámetros analíticos, perfil de ácidos grasos y familias fenólicas analizados en las muestras de cebada de 2018 y 2019.

A grandes rasgos se puede observar como en 2018 (**Tabla 6.31**) el contenido de proteína y β -glucanos fueron mayores en las muestras cultivadas en la localidad de Sariñena respecto las demás zonas de cultivo. En cambio, la humedad parece ser muy similar entre zona de cultivo, exceptuando las muestras procedentes de Sádaba, las cuales han resultado en humedades relativamente mayores. En cambio, en las muestras de 2019 (**Tabla 6.32**), el contenido proteico aumentó en las localidades de Sádaba y Saganta respecto al año anterior, de la misma manera ocurrió con el contenido de β -glucanos. Los ácidos grasos mayoritarios han sido el ácido palmítico (C26:0), ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2). Cabe resaltar que el contenido de ácidos grasos totales parece mantenerse estable entre ambos años estudiados, a pesar de que, aparentemente, se observan diferencias en los ácidos grasos individualmente dependiendo de la localidad y genotipo. Por otro lado, el ácido cumárico, ácido ferúlico, catequinas y oligómeros, así como sus derivados, son los grupos fenólicos con mayor contenido, y, si comparamos ambos años, el contenido fenólico total ha resultado ser mayor en 2018 respecto 2019. Asimismo, se pueden intuir distintos niveles fenólicos dependiendo de la localidad, puesto que en 2018 el mayor contenido se da en la localidad de Sariñena y en 2019 en la localidad de Bell-lloc.

Tabla 6.31. Concentraciones de los parámetros de calidad y ácidos grasos analizados en las muestras de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	Bell-Iloc				Sádaba				Saganta				Sariñena				SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	
β-glucanos (%)	4.67	3.67	4.18	4.23	4.81	3.35	4.27	3.89	3.50	2.96	3.91	3.53	7.65	3.80	6.62	6.17	1.29
Humedad (%)	11.6	11.9	11.7	11.8	13.7	13.7	12.3	13.8	11.1	9.8	11.5	11.4	11.2	11.4	11.2	11.2	1.1
PT (%)	9.3	9.4	9.0	9.4	9.9	11.5	9.9	10.8	7.2	8.2	9.3	9.7	13.2	13.3	11.9	13.0	1.8
<i>Ácidos grasos (%)</i>																	
C14:0	0.19	0.21	0.22	0.21	0.16	0.17	0.18	0.18	0.18	0.20	0.23	0.26	0.19	0.20	0.25	0.20	0.03
C16:0	20.5	21.0	21.8	21.0	20.5	20.9	21.5	21.3	19.6	20.4	21.3	21.0	20.5	21.0	21.7	21.2	0.6
C18:0	1.17	1.24	1.29	1.25	1.08	1.08	1.06	1.10	1.37	1.27	1.32	1.44	1.08	1.20	1.16	1.22	0.11
C18:1	15.1	13.9	13.5	13.9	14.2	12.7	12.7	11.7	17.7	15.0	13.9	14.4	14.4	12.2	12.0	12.1	1.5
C18:2	55.5	56.5	55.7	56.1	55.6	56.7	56.0	56.7	54.3	56.3	55.7	55.6	55.3	56.8	55.8	56.4	0.6
C18:3	5.7	5.2	5.6	5.4	6.4	6.5	6.5	7.1	4.8	4.8	5.4	5.2	6.5	6.6	6.9	6.8	0.8
C20:0	0.00	0.24	0.22	0.23	0.20	0.20	0.18	0.19	0.28	0.28	0.25	0.28	0.21	0.22	0.20	0.21	0.03
Totales	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	0
<i>Familias fenólicas (mg/kg)</i>																	
HBA	47	44	48	48	40	57	52	53	52	61	50	52	50	46	60	56	6
CinA	2.3	2.3	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.5	5.6	2.5	2.5	2.4	2.4	2.3	0.8
CouA	430	427	674	476	549	628	538	426	374	709	734	375	711	321	962	414	175
CafA	10.6	13.3	9.2	12.1	10.3	17.7	10.4	12.7	17.3	30.7	16.7	15.7	16.5	24.2	34.8	29.1	7.9
FerA	1005	1057	1119	1302	814	1227	1064	1247	1409	1679	1299	1270	1145	1317	1548	1649	233
Cat	217	238	258	236	196	241	204	202	241	281	268	271	232	245	260	229	25
Olig	413	447	414	423	358	407	381	397	373	423	403	386	417	373	435	456	28
Lut	13	15	14	18	14	14	14	15	14	16	16	20	15	13	14	18	2
Api	3.7	2.9	3.0	4.8	3.4	3.4	3.2	4.6	3.8	4.1	4.0	4.4	3.6	2.6	3.8	4.6	0.7
Totales	2141	2246	2540	2523	1989	2597	2267	2360	2487	3207	2796	2396	2592	2344	3320	2858	360

PT: proteína total; C14:0: ácido mirístico; C16:0: ácido palmítico; C18:0: ácido esteárico; C18:1: ácido oleico; C18:2: ácido linoleico; C18:3: ácido linolénico; C20:0: ácido araquídico; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Tabla 6.32. Concentraciones de los parámetros de calidad y ácidos grasos analizados en las muestras de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=2).

	Bell-Iloc				Sádaba				Saganta				Sariñena				SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira		
β-glucanos (%)	4.77	3.99	4.61	3.41	3.37	4.43	3.47	3.73	3.72	3.72	4.38	3.76	3.43	4.00	3.44	0.47	
Humedad (%)	9.9	10.1	9.9	10.2	10.5	10.6	10.4	10.4	9.8	9.7	10.3	10.1	10.0	10.1	10.1	0.3	
PT (%)	9.1	9.6	9.3	10.9	14.5	13.1	14.8	11.4	12.1	11.8	12.7	14.0	13.6	11.4	13.1	1.8	
<i>Ácidos grasos (%)</i>																	
C14:0	0.21	0.19	0.25	0.21	0.22	0.23	0.24	0.26	0.25	0.27	0.30	0.21	0.22	0.23	0.22	0.0	
C16:0	20.9	20.2	21.2	20.6	20.2	21.2	20.7	19.9	19.3	20.9	20.1	20.4	20.7	21.7	20.7	0.6	
C18:0	1.29	1.30	1.35	1.23	1.27	1.16	1.20	1.49	1.73	1.48	1.58	1.18	1.29	1.22	1.29	0.2	
C18:1	14.8	15.0	14.6	14.1	15.2	14.5	14.7	16.5	16.5	15.2	15.3	15.2	14.3	13.3	13.9	0.9	
C18:2	55.5	56.5	55.3	56.1	55.9	55.2	55.5	55.0	55.8	55.0	55.8	55.0	56.0	55.3	56.0	0.5	
C18:3	5.3	4.9	5.2	5.7	5.2	5.6	5.5	4.7	4.2	4.9	4.7	6.0	5.5	6.2	6.0	0.6	
C20:0	0.24	0.25	0.26	0.24	0.25	0.21	0.23	0.34	0.37	0.29	0.34	0.23	0.23	0.21	0.22	0.0	
Totales	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	0	
<i>Familias fenólicas (mg/kg)</i>																	
HBA	55	54	59	52	56	56	57	66	56	59	61	64	58	50	55	4.1	
CinA	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.3	5.2	5.3	3.7	2.3	3.8	5.2	5.4	0.9	
CouA	353	295	457	251	214	443	297	285	195	337	323	274	307	352	263	72.9	
CafA	13.4	15.6	8.4	7.2	10.8	15.1	11.0	17.5	3.4	15.0	18.0	11.2	11.4	8.6	11.1	4.0	
FerA	813	861	792	812	1026	835	969	915	728	849	945	1007	1047	768	985	101.4	
Cat	204	172	223	183	170	134	155	202	148	173	165	157	102	131	146	31.3	
Olig	335	328	405	354	247	201	248	343	274	291	292	220	188	201	225	65.6	
Lut	19	15	19	19	18	14	14	15	13	15	14	15	15	12	14	2.1	
Api	3.5	5.0	4.2	3.5	4.1	3.9	3.7	3.7	3.7	3.5	3.5	3.3	4.0	2.7	3.0	0.5	
Totales	1801	1752	1972	1687	1750	1707	1760	1852	1427	1748	1825	1754	1736	1532	1708	127	

PT: proteína total; C14:0: ácido mirístico; C16:0: ácido palmítico; C18:0: ácido esteárico; C18:1: ácido oleico; C18:2: ácido linoleico; C18:3: ácido linolénico; C20:0: ácido araquídico; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Se ha realizado el análisis de varianza con tal de esclarecer las diferencias comentadas anteriormente entre muestras de cebada, los resultados se presentan en la **Tabla 6.33**. A grandes rasgos, se puede observar que la variable año influye significativamente sobre la mayoría de los parámetros estudiados, seguida de la variable localidad y genotipo. Una peculiaridad que cabe destacar es la diferencia notoria en la influencia sobre los ácidos grasos y las familias fenólicas. Los ácidos grasos se ven altamente influenciados por el año, la localidad y el genotipo, mostrando una mezcla entre el efecto ambiental y el genotípico, así como una interacción entre ambos que podría hacer referencia a la adaptación y/o reacción de cada genotipo a las distintas condiciones y características del cultivo.

Tabla 6.33. Valores *p* resultantes del ANOVA del modelo fijo para los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.

	Año (A)		Localidad (L)		Genotipo (G)		A x L	A x G	L x G
	GL	1	3	3	3	3	3	3	9
β-glucanos		0.0304	0.0187	0.0282	0.5824	0.2645	0.0049		
Humedad		<0.0001	0.0008	0.4341	0.4691	0.9652	0.0246		
PT		<0.0001	<0.0001	0.0056	0.0343	0.4314	0.0001		
<i>Ácidos grasos</i>									
C14:0		<0.0001	0.0006	0.0034	0.0761	0.4466	0.0051		
C16:0		0.0011	0.0004	<0.0001	0.2172	0.0103	0.5366		
C18:0		0.0005	<0.0001	0.2097	0.5612	0.2125	0.0894		
C18:1		<0.0001	<0.0001	0.0002	0.3008	0.0262	0.0218		
C18:2		0.0030	0.0180	<0.0001	0.7006	0.2500	0.0778		
C18:3		<0.0001	<0.0001	0.0078	0.6892	0.5850	0.0087		
C20:0		<0.0001	<0.0001	0.0066	0.1692	0.4414	0.0025		
<i>Familias fenólicas</i>									
HBA		0.0255	0.2156	0.9808	0.8416	0.6059	0.8370		
CinA		0.0001	0.4348	0.4185	0.6092	0.9396	0.4097		
CouA		0.0034	0.9674	0.0999	0.9178	0.6338	0.8013		
CafA		0.0550	0.1890	0.9668	0.9618	0.4263	0.1257		
FerA		0.0003	0.1043	0.3413	0.9346	0.5986	0.2538		
Cat		<0.0001	0.0008	0.5142	0.0766	0.0040	0.0013		
Olig		<0.0001	0.0019	0.8217	0.5449	0.6005	0.0041		
Lut		0.4476	0.1019	0.0806	0.5328	0.0298	0.0238		
Api		0.7563	0.4810	0.4040	0.9989	0.0303	0.3572		

GL: grados de libertad; A: año; L: localidad; G: genotipo. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A x L x G) se ha utilizado como término error. PT: proteína total; C14:0: ácido mirístico; C16:0: ácido palmítico; C18:0: ácido esteárico; C18:1: ácido oleico; C18:2: ácido linoleico; C18:3: ácido linolénico; C20:0: ácido araquídico; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Bravi et al. (2012), quienes detectaron una fuerte influencia genotípica sobre el contenido de lípidos y ácidos grasos de la cebada, así como los descritos por Kuczyńska et al. (2019), quienes estudiaron distintas situaciones de estrés ambiental y pudieron observar que los cultivos sometidos a condiciones de estrés

hídrico y a temperaturas excesivamente altas resultaban en un mayor contenido lipídico, atribuyéndolo a la necesidad de la planta de preservar la integridad de las membranas celulares y evitar así la deshidratación.

Principalmente, los fenoles se ven afectados por el año y, en el caso de las catequinas y oligómeros, por la localidad. A pesar de haberse identificado en estas dos familias fenólicas un efecto significativo de la interacción localidad \times genotipo, no se ha detectado un efecto significativo de la variable genotipo de forma aislada. Este hecho no coincide con lo reportado por Dvořáková et al. (2008a), Narwal et al. (2016) o Zhao et al. (2008), puesto que en sus trabajos sí pudieron determinar diferentes rangos fenólicos dependiendo del genotipo. Cabe destacar que en sus trabajos realizaron la cuantificación fenólica total por medio del método Folin-Ciocalteu, mientras que en esta Tesis se ha determinado el perfil fenólico por UPLC-MS/MS, por lo que la obtención de resultados distintos puede deberse a la metodología empleada para el estudio en detalle del perfil fenólico.

En relación con los parámetros de calidad, como en el caso de los β -glucanos y PT, también se observa un efecto ambiental y genotípico conjunto, viéndose un efecto significativo de la interacción localidad \times genotipo. Hong y Zhang (2020) también vieron un efecto de las condiciones ambientales sobre el contenido de β -glucanos, resaltando la implicación del estrés hídrico durante el llenado de los granos puesto que supone una disminución en el contenido de este parámetro. De la misma manera, el efecto del año de cultivo, que en sí mismo recoge las condiciones climáticas, es considerada como una variable con gran implicación por numerosos autores (Dvořáková et al., 2008b; Przulj et al., 2014). En el caso de la humedad, está fuertemente influenciada por las condiciones climáticas del año de cultivo y por la zona de cultivo.

Coincidiendo con los resultados obtenidos respecto la existencia de la interacción entre la zona de cultivo y el genotipo (L \times G), Swanston et al. (2006) también observaron distintos grados de modificación tras el malteado entre genotipos y según la zona de cultivo, así como Fox et al. (2007) y Romagosa y Fox (1993), quienes también describieron la existencia de una interacción entre el genotipo y las condiciones ambientales. En este trabajo, a pesar de no haber obtenido significancia de la interacción entre el año y la localidad (A \times L), sí se ha detectado en varios parámetros estudiados una fuerte interacción entre la localidad y el genotipo.

Para conocer la importancia relativa del genotipo frente el componente ambiental sobre los parámetros analizados en las muestras de cebada, se calculó la heredabilidad en sentido amplio (H^2) para cada uno (**Tabla 6.34**). El componente genético ($H^2 > 0.60$) fue especialmente relevante para los parámetros β -glucanos, PT, ácidos grasos (exceptuando el C18:0) y el CouA, por lo que se puede considerar una baja influencia ambiental sobre ellos. En cambio, la humedad y el resto de las familias fenólicas presentaron una H^2 baja, mostrando una alta influencia ambiental ($H^2 < 0.50$). En el caso del ácido graso C18:0 y la familia fenólica Lut, el valor de H^2 fue intermedio ($0.50 < H^2 < 0.60$), siendo 0.54 y 0.56 respectivamente, lo que

indica que el componente ambiental y genotípico podría ser similar o bien que existe una posible interacción entre ambos.

Tabla 6.34. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos, ácidos grasos y familias fenólicas analizados en los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.

		<i>Ácidos grasos</i>							
β -glucanos	Humedad	PT	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
0.83	0.05	0.76	0.87	0.96	0.54	0.95	0.98	0.90	0.83
		<i>Familias fenólicas</i>							
HBA	CinA	CouA	CafA	FerA	Cat	Olig	Lut	Api	
0.00	0.34	0.78	0.00	0.46	0.00	0.00	0.56	0.00	

PT: proteína total; C14:0: ácido mirístico; C16:0: ácido palmítico; C18:0: ácido esteárico; C18:1: ácido oleico; C18:2: ácido linoleico; C18:3: ácido linolénico; C20:0: ácido araquídico; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Todos los resultados expuestos parecen indicar que, en la cebada, dependiendo del parámetro, tanto el componente ambiental como el genético tienen un gran peso.

6.4.2. MALTA

Las concentraciones de los parámetros analizados en las muestras de malta correspondientes a las anteriores cebadas se muestran en la **Tabla 6.35** y **Tabla 6.36**. Sin entrar en detalles, podemos observar un menor contenido de β -glucanos y viscosidad en las maltas procedentes de los cultivos de 2018 (**Tabla 6.35**) respecto los del 2019 (**Tabla 6.36**). El resto de los parámetros analizados parecen ser estables entre años de cultivo, pero parecen presentar diferencias entre las zonas de cultivo y genotipos estudiados, como por ejemplo en el caso del FAN y PD, mostrando el distinto comportamiento de las variedades frente la zona de cultivo y el proceso de malteado.

Respecto el contenido total de fenoles, podemos observar como el contenido ha aumentado respecto las cebadas, coincidiendo con lo comentado anteriormente en el apartado 6.3.1. Además, si comparamos ambos años de estudio, el contenido fue mayor en las muestras de malta procedentes de cebadas cultivadas en 2019 (**Tabla 6.36**). En otras palabras, a pesar de partir de cebadas con un mayor contenido en 2018, tras el malteado se observa un mayor contenido en las muestras de 2019, por lo que el contenido fenólico final de la malta parece venir dado, en gran medida, por las condiciones de malteado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.35. Concentraciones de los parámetros de calidad y familias fenólicas analizados en las correspondientes maltas de las muestras de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).

	Bell-Iloc				Sádaba				Saganta				Sariñena				SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	
Atenuación límite (%)	79	78	80	79	80	79	80	80	81	81	82	81	78	78	80	80	1
β-glucanos (%)	0.19	0.38	0.14	0.23	0.16	0.25	0.07	0.06	0.14	0.05	0.04	0.13	0.57	0.65	0.34	0.35	0.18
Extracto (%)	82	81	82	82	81	78	81	80	83	83	82	82	80	78	80	79	2
FAN (mg/Kg)	100	96	97	106	101	106	106	103	126	103	128	128	130	126	117	127	13
Friabilidad (%)	84	81	90	89	74	81	84	81	90	97	92	90	56	69	67	70	11
IK	35	35	37	38	32	32	37	37	48	47	42	40	33	33	32	32	5
SC (EBC)	5.3	5.4	6.1	4.8	5.4	5.5	6.1	5.2	8.9	7.9	6.5	6.3	5.9	5.4	6.1	5.4	1.1
PD (WK/dm)	208	157	234	220	269	218	294	332	136	182	255	291	263	270	346	327	62
pH	6.1	6.2	6.2	6.1	6.1	6.2	6.1	6.0	5.8	6.0	6.1	6.0	6.1	6.2	6.2	6.1	0.1
PS (%)	3.2	3.3	3.2	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.3	3.7	3.8	3.9	4.2	4.1	3.7	4.0	0.3
PT (%)	9.3	9.4	8.6	9.1	10.5	10.7	9.6	9.7	6.9	7.9	9.0	9.7	12.7	12.5	11.6	13.0	1.7
Viscosidad (mPa/s)	1.57	1.57	1.53	1.56	1.57	1.51	1.52	1.53	1.52	1.47	1.49	1.52	1.57	1.51	1.51	1.52	0.03
<i>Familias fenólicas (mg/Kg)</i>																	
HBA	53	54	44	47	73	77	71	64	82	51	50	82	71	70	69	64	12
CinA	8.5	8.1	8.0	8.0	9.7	9.0	9.3	9.2	10.0	8.2	7.6	9.5	10.1	10.0	9.9	9.8	0.9
CouA	574	551	772	476	807	936	1339	613	834	310	575	705	719	630	1108	364	264
CafA	33	34	19	36	68	42	45	46	66	25	21	70	47	39	31	34	16
FerA	1649	1742	1390	1501	2411	2802	2233	2111	2747	1744	1571	2865	2114	2168	2227	1768	471
Cat	94	99	113	105	127	117	122	102	156	107	105	146	133	117	127	95	18
Olig	218	266	269	242	270	286	280	242	407	276	297	323	336	293	326	223	48
Lut	17	17	14	14	13	16	15	16	16	15	12	14	14	18	15	15	1
Api	1.7	2.1	2.2	1.9	2.1	2.8	2.7	2.1	2.9	2.0	2.7	2.6	2.1	2.5	2.4	2.2	0.4
Totales	2648	2772	2630	2431	3782	4288	4116	3206	4320	2538	2643	4216	3446	3346	3915	2575	712

FAN: aminonitrógeno libre; IK: índice Kolbach; SC: sobrecolor; PD: poder diastásico; PS: proteína soluble; PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Tabla 6.36. Concentraciones de los parámetros de calidad y familias fenólicas analizados en las correspondientes maltas de las muestras de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).

	Bell-Iloc				Sádaba				Saganta				Sariñena				SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira		
Atenuación límite (%)	76	75	77	76	75	75	76	78	74	78	76	75	76	76	77	77	1
β-glucanos (%)	0.58	0.94	0.22	0.96	1.56	0.92	0.92	0.56	0.67	0.26	0.71	1.03	0.77	0.71	0.72	0.32	
Extracto (%)	82	82	81	80	77	79	78	79	79	79	78	80	80	82	79	2	
FAN (mg/Kg)	90	93	93	88	106	109	112	111	117	116	113	132	142	119	129	16	
Friabilidad (%)	81	75	86	69	41	59	52	77	76	82	70	48	69	67	62	13	
IK	34	32	33	30	25	28	26	30	33	34	28	28	31	33	30	3	
SC (EBC)	5.3	4.7	5.9	4.5	4.4	4.6	4.4	5.0	4.7	5.0	4.5	5.7	5.7	5.9	5.1	0.6	
PD (WK/dm)	205	162	251	229	231	298	287	273	203	283	227	229	242	233	273	37	
pH	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.0	6.0	6.1	5.9	6.0	6.0	6.0	6.0	0.1	
PS (%)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.6	3.8	3.5	3.7	3.7	3.6	3.8	4.3	3.7	4.0	0.4	
PT (%)	8.7	9.4	9.0	10.3	14.4	12.7	14.4	11.4	11.7	10.9	12.7	13.4	13.7	11.0	13.5	1.9	
Viscosidad (mPa/s)	1.66	1.67	1.56	1.76	1.71	1.68	1.64	1.56	1.53	1.51	1.58	1.69	1.51	1.60	1.57	0.08	
<i>Familias fenólicas (mg/Kg)</i>																	
HBA	78	75	66	76	92	73	88	73	72	50	67	72	73	71	73	9	
CinA	9.1	9.3	9.1	9.1	9.1	7.8	9.0	8.3	8.3	7.2	8.4	8.3	8.8	8.5	8.9	0.6	
CouA	1093	732	1012	833	726	967	693	511	650	487	408	1018	594	917	395	231	
CafA	52	46	29	46	53	40	54	52	41	23	40	32	31	30	36	10	
FerA	2563	2524	2159	2558	2832	1952	2835	2179	2281	1351	2081	1964	2326	1906	2112	389	
Cat	115	97	105	113	97	104	107	85	75	74	76	90	103	92	96	13	
Olig	244	221	249	256	193	224	219	165	152	140	150	166	174	175	178	39	
Lut	14	15	13	13	16	15	15	14	15	12	11	19	19	18	15	2	
Api	2.4	2.4	1.9	2.2	2.6	2.9	2.3	1.9	2.5	1.7	1.8	3.4	2.9	2.6	2.4	0.4	
Totales	4171	3723	3645	3907	4021	3386	4022	3090	3297	2145	2844	3373	3331	3221	2916	538	

FAN: aminonitrógeno libre; IK: índice Kolbach; SC: sobrecolor; PD: poder diastásico; PS: proteína soluble; PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

El resultado del análisis de varianza se muestra en la **Tabla 6.37** presentada a continuación. El efecto del año y de la localidad sigue siendo altamente significativo como en las muestras de cebada (**Tabla 6.33**). Se debe tener en cuenta que la variable año está confundida entre las condiciones ambientales y las condiciones de malteado, puesto que para cada año de cultivo se utilizaron unas condiciones de malteado distintas como se describe en el apartado 5.2.3 de Materiales y métodos, por lo que un efecto significativo del año puede atribuirse a ambos factores.

Si nos centramos en la localidad, todos los parámetros de calidad de la malta presentaron un efecto significativo, mostrando la gran influencia que puede tener la zona de cultivo sobre la calidad de la malta. En el marco de esta Tesis, se han estudiado 4 zonas de cultivo distintas, dos de las cuales se han considerado de tipo seco, una de seco húmedo y frío y la última como cultivo de regadío, por lo que, si tenemos en cuenta estas diferencias y las añadidas por parte de las condiciones ambientales propias de cada año de cultivo, los resultados obtenidos podrían venir explicados por este hecho.

Una diferencia notoria entre las muestras de cebada y malta ha sido la determinación del genotipo como efecto significativo sobre las familias fenólicas CafA y Lut. En el caso de las cebadas no se identificó ninguna influencia genotípica (**Tabla 6.33**), por lo que su detección en las muestras de malta podría indicar la reacción y/o adaptabilidad de los genotipos frente las condiciones de malteado (Narwal et al., 2016). Es decir, parece existir una interacción entre el genotipo de cebada y las condiciones ambientales, añadiendo complejidad al control del malteado y, como consecuencia, sobre el control de la calidad final de la malta. A lo largo de los estudios comentados, se ha observado que, a pesar de pretender controlar al máximo las condiciones de proceso, es casi inevitable prever o evitar posibles desviaciones, resaltando la gran implicación que pueden tener sobre la calidad final del producto.

Tabla 6.37. Valores *p* resultantes del ANOVA del modelo fijo para las maltas correspondientes de los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.

	Año (A)		Localidad (L)	Genotipo (G)	A x L	A x G	L x G
	GL	1	3	3	3	3	9
Atenuación límite		<0.0001	0.0046	0.0041	0.2182	0.6476	0.0391
β-glucanos		<0.0001	0.0075	0.0156	0.3161	0.3140	0.0153
Extracto		0.0006	0.0004	0.0278	0.5586	0.3259	0.0010
FAN		0.3605	<0.0001	0.7777	0.2386	0.1747	0.0988
Friabilidad		<0.0001	<0.0001	0.0254	0.1011	0.1924	0.0019
IK		<0.0001	0.0006	0.3321	0.2641	0.3938	0.0029
SC		0.0003	0.0083	0.0584	0.3133	0.5866	0.0026
PD		0.7546	0.0091	0.0107	0.8997	0.2858	0.1231
pH		0.0010	<0.0001	0.0012	0.0216	0.0016	0.0001
PS		0.1959	<0.0001	0.1278	0.2195	0.8067	0.1313
PT		<0.0001	<0.0001	0.0152	0.1855	0.2668	0.0006
Viscosidad		0.0002	0.0070	0.1002	0.2726	0.9037	0.1240
<i>Familias fenólicas</i>							
HBA		0.0062	0.0220	0.0872	0.3349	0.6529	0.0418
CinA		0.0056	0.0053	0.0271	0.1003	0.1013	0.0007
CouA		0.6641	0.0732	0.0209	0.4492	0.6843	0.1189
CafA		0.7247	0.0358	0.0090	0.3651	0.6645	0.1883
FerA		0.1333	0.1227	0.0562	0.3333	0.5027	0.0249
Cat		0.0041	0.7976	0.5271	0.5892	0.7852	0.0232
Olig		<0.0001	0.8812	0.6093	0.4826	0.3357	0.0032
Lut		0.7228	0.0034	0.0060	0.1988	0.5469	0.0124
Api		0.5910	0.1590	0.4411	0.9339	0.5099	0.0826

GL: grados de libertad; A: año; L: localidad; G: genotipo. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A × L × G) se ha utilizado como término error. FAN: aminonitrógeno libre; IK: índice Kolbach; SC: sobrecolor; PD: poder diastásico; PS: proteína soluble; PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

La interacción localidad × genotipo parece estar más presente en las muestras de malta (**Tabla 6.37**) que en las de cebada (**Tabla 6.33**), puesto que se ha identificado como significativa en un mayor número de parámetros, como por ejemplo el extracto, friabilidad, IK, SC, pH, PT, CinA y Olig. Este hallazgo parece indicar que las variedades estudiadas tienen un comportamiento distinto entre zonas de cultivo, hecho que se traduce en maltas con calidades distintas, y como consecuencia, cabría esperar que las cervezas resultantes obtengan características aromáticas distintas, tal y como describen Herb et al. (2017a).

Por medio de estos resultados, podríamos considerar que la solución para minimizar estas diferencias entre localidades y años de cultivo sería cultivar toda la cebada bajo las mismas condiciones, hecho que no sería factible dada la gran dispersión geográfica de los cultivos frente la alta demanda de materia prima por parte de la industria. Además, las condiciones ambientales no son controlables, por lo que siempre va a existir un efecto considerable del año de cultivo sobre la calidad de la malta de cebada y, por ende, sobre la cerveza resultante.

Por otro lado, coincidiendo con las muestras de cebada (**Tabla 6.33**), no se ha identificado un efecto significativo de la interacción año × localidad para los parámetros analizados en las maltas.

En la **Tabla 6.38** se han presentado los resultados del cálculo de H^2 . Los parámetros atenuación límite, β -glucanos, extracto, friabilidad, SC, PD, pH, PS, PT y las familias fenólicas HBA, CinA, CouA, CafA, FerA y Lut, presentaron valores de H^2 altos, por lo que se les puede atribuir un importante componente genético. Esta influencia genética sobre el parámetro PD ya fue reportada anteriormente por Foster et al. (1967) y Rutger et al. (1966). Contrariamente, Guo et al. (2020) determinaron una baja influencia genotípica para los parámetros extracto, SC y el contenido de β -glucanos, así como Rutger et al. (1966) quienes obtuvieron valores de H^2 bajos para el parámetro PT, resultados contrarios a los obtenidos en las muestras estudiadas. Este hecho puede deberse a la diferencia de genotipos estudiados y a las condiciones de malteado utilizadas.

Por otro lado, los parámetros FAN e IK, así como las familias fenólicas Cat, Olig y Api resultaron tener una alta influencia ambiental puesto que los valores de H^2 fueron bajos. En el caso de los parámetros PS y viscosidad, los valores de H^2 fueron 0.58 y 0.60 respectivamente, mostrando una influencia similar entre el componente genético y el ambiental y, como bien indica Przulj et al. (2014), parece ser un parámetro que depende en gran medida de la interacción entre el genotipo y el ambiente.

Tabla 6.38. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos y familias fenólicas analizados en las muestras de malta correspondientes a los seis genotipos de cebada cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.

Atenuación límite	β -glucanos	Extracto	FAN	Friabilidad	IK	SC	PD	pH	PS	PT	Visc
0.88	0.81	0.82	0.00	0.68	0.00	0.77	0.91	0.79	0.58	0.78	0.60
<i>Familias fenólicas</i>											
HBA	CinA	CouA	CafA	FerA	Cat	Olig	Lut	Api			
0.69	0.70	0.83	0.86	0.72	0.19	0.04	0.85	0.30			

FAN: aminonitrógeno libre; Friab: friabilidad; IK: índice Kolbach; SC: sobrecolor; PD: poder diastásico; PS: proteína soluble; PT: proteína total; Visc: viscosidad; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Los altos valores de H^2 parecen indicar que frente el malteado existe una gran implicación y adaptabilidad de las distintas variedades de cebada, hecho que implica que a nivel industrial sea todo un reto y una variable importante a tener en cuenta durante la producción. De esta manera, resulta interesante adaptar el proceso de malteado a las distintas variedades e ir ajustándolo en cada campaña de cultivo, puesto que como se ha visto también existe una gran implicación del año.

6.4.3. MOSTO

En la **Tabla 6.39** y **Tabla 6.40** quedan recogidas las concentraciones de los parámetros analíticos y de los aminoácidos analizados en los mostos cerveceros elaborados a partir de las cebadas malteadas estudiadas. Podemos intuir diferencias entre las muestras de 2018 y 2019, como por ejemplo en el contenido de β -glucanos, fosfatos o zinc, que han resultado ser mayores para las del 2019. En cambio, el parámetro FAN parece ser similar entre los años estudiados, pero no entre genotipos ni localidades.

En el caso de los aminoácidos, la asparagina, glutamina y prolina destacan por ser mayoritarios, tal y como se ha comentado anteriormente en el apartado 6.3.2, y, a simple vista, parece haberse obtenido un mayor contenido en los mostos de las muestras del 2019. El ácido aspártico, la alanina, arginina, fenilalanina, leucina y valina, parecen tener un comportamiento distinto entre las localidades estudiadas. Cabe resaltar que la cistina, aminoácido minoritario, su contenido parece ser notoriamente menor en las muestras de 2019 respecto las de 2018.

Tabla 6.39. Concentraciones de los parámetros de calidad y aminoácidos analizados en los mostos elaborados a partir de las maltas de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).

	Bell-Iloc				Sádaba				Saganta				Sariñena				SED
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	
Amargos (IBU)	59	35	43	34	54	46	31	34	39	25	37	46	45	38	38	58	10
β -glucanos (mg/L)	13.2	11.1	13.9	13.6	13.9	10.5	11.8	13.8	14.3	14.3	11.8	9.0	13.4	13.7	13.0	14.5	1.6
$^{\circ}$ Balling ($^{\circ}$ P)	67	114	42	74	68	58	34	38	89	34	29	44	208	95	62	50	44
Calcio (mg/L)	31	31	41	33	37	28	43	32	48	35	38	36	37	34	42	34	5
Cloruros (mg/L)	255	267	288	249	248	210	267	230	168	237	191	151	251	228	286	230	39
Color (EBC)	11.2	10.9	12.5	10.8	12.7	11.1	11.5	11.6	18.7	15.3	12.3	10.2	14.4	14.1	14.5	13.5	2.2
FAN (mg/L)	165	150	163	169	179	149	154	166	217	229	181	132	222	240	200	201	32
Fosfatos (mg/L)	672	695	549	636	684	662	592	688	720	802	526	478	711	778	549	717	92
Magnesio (mg/L)	66	65	75	69	60	51	61	64	80	71	57	46	73	79	75	78	10
Nitratos (mg/L)	1.2	1.2	2.3	2.2	2.1	1.4	2.7	2.1	2.0	2.5	1.9	2.7	2.1	1.9	2.3	2.0	0.5
Oxalatos (mg/L)	4.7	2.9	1.6	1.6	3.2	n.d.	n.d.	4.6	0.8	3.0	6.0	n.d.	4.2	6.6	n.d.	2.4	2.2
pH	5.9	6.1	6.0	6.0	5.8	6.1	6.1	6.0	5.6	5.9	6.0	6.0	5.9	6.1	6.1	6.0	0.1
Sulfatos (mg/L)	98	121	140	119	111	99	124	116	118	136	122	100	103	139	123	113	13
Zinc (mg/L)	248	295	344	283	189	269	300	258	199	204	258	240	172	376	339	308	59
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>																	
Ácido aspártico	48	67	58	64	81	79	72	78	60	76	56	45	94	112	87	95	18
Ácido glutámico	55	76	79	81	83	83	88	88	68	99	69	60	96	113	105	104	16
Alanina	71	94	102	101	98	97	102	103	130	138	103	81	122	131	124	122	19
Arginina	63	83	80	109	101	96	92	113	114	154	100	88	152	131	116	144	26
Asparagina	133	214	186	226	225	222	195	252	113	189	170	137	323	356	288	335	72
Cistina	3.5	11.0	9.5	12.0	4.5	5.5	10.5	6.0	<10.0	15.0	<10.0	<10.0	4.5	13.0	9.5	12.0	4.9
Fenilalanina	71	83	97	105	101	76	97	92	125	147	110	80	139	119	125	120	22
Glicina	30	40	40	43	40	38	40	41	44	50	37	29	49	49	46	49	6
Glutamina	332	406	700	851	755	333	775	656	996	2895	975	658	1136	781	1063	892	587
Hidroxi prolina	46	41	32	36	85	42	32	45	37	37	79	29	115	63	41	42	24
Histidina	33	39	47	50	45	40	46	48	47	54	42	36	61	61	64	64	10
Isoleucina	43	28	50	56	55	23	48	46	77	92	60	46	75	62	59	60	17
Leucina	73	81	96	105	103	72	93	89	150	164	113	82	139	105	111	109	26
Lisina	48	58	62	75	62	59	62	66	76	81	55	50	82	79	81	88	12
Metionina	18	20	23	24	22	18	21	20	36	37	21	17	31	28	24	29	6
Prolina	252	363	475	368	435	273	357	400	275	485	585	183	619	517	471	430	121
Serina	43	51	61	64	61	45	57	55	75	91	65	47	82	64	73	70	13
Tirosina	56	68	77	83	79	62	74	71	99	114	80	62	107	94	93	92	17
Treonina	39	50	54	62	29	45	52	56	67	76	55	43	71	64	66	70	13
Triptófano	33	44	45	46	38	39	38	41	49	58	48	33	46	52	51	48	7
Valina	71	86	95	97	100	83	95	90	122	143	104	77	131	117	118	111	20

FAN: aminonitrógeno libre; <10: compuesto detectado por debajo del límite de cuantificación (LOQ).

Tabla 6.40. Concentraciones de los parámetros de calidad y aminoácidos analizados en los mostos elaborados a partir de las maltas de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).

	Bell-lloc		Sádaba				Saganta				Sariñena				SED	
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet		Shakira
Amargos (IBU)	40	48	50	47	60	51	43	44	60	44	44	47	34	42	37	7
β-glucanos (mg/L)	13.1	12.1	12.5	12.8	9.9	12.4	12.2	12.4	11.7	10.6	11.5	12.8	12.7	12.6	13.7	1.0
°Balling (° P)	139	218	68	272	348	240	217	141	190	87	160	335	180	188	252	80
Calcio (mg/L)	38	31	37	30	37	41	42	49	44	43	49	35	41	45	38	6
Cloruros (mg/L)	315	283	301	300	265	298	290	238	238	222	231	257	221	288	233	33
Color (EBC)	10.4	8.3	10.1	8.7	9.6	9.1	9.9	10.5	10.0	9.8	9.8	12.9	13.7	12.3	11.6	1.5
FAN (mg/L)	146	151	143	143	154	175	170	166	175	152	139	217	244	200	226	33
Fosfatos (mg/L)	605	646	486	635	604	581	695	569	701	495	590	716	825	604	839	102
Magnesio (mg/L)	77	68	71	70	66	77	81	80	80	71	82	79	92	81	87	7
Nitratos (mg/L)	2.1	2.0	1.9	2.0	2.0	1.9	2.2	2.0	2.1	2.0	2.0	1.9	2.3	1.9	2.0	0.1
Oxalatos (mg/L)	3.9	4.9	3.5	5.7	3.2	2.3	1.8	0.7	2.0	0.6	2.3	4.0	5.4	3.2	6.4	1.8
pH	6.0	6.1	6.1	6.1	6.0	6.0	6.1	5.9	5.9	6.1	5.9	5.8	5.8	5.9	5.9	0.1
Sulfatos (mg/L)	146	138	130	135	113	130	124	139	127	123	127	102	126	131	121	11
Zinc (mg/L)	305	306	360	319	262	309	313	291	348	428	265	153	214	205	183	73
Aminoácidos (mg/L)																
Ácido aspártico	101	96	99	94	131	121	97	92	110	84	70	148	125	86	171	27
Ácido glutámico	80	72	76	69	94	88	90	73	81	72	70	83	96	84	92	9
Alanina	90	87	91	79	97	106	105	101	114	91	96	115	144	113	128	17
Arginina	76	74	73	81	93	101	130	85	103	80	99	130	169	101	156	30
Asparagina	224	250	222	241	365	296	369	211	254	210	225	282	345	204	295	57
Cistina	<10.0	8.5	<10.0	5.0	5.0	<10.0	5.5	<10.0	5.0	<10.0	<10.0	<10.0	6.5	<10.0	<10.0	3.1
Fenilalanina	86	77	83	76	76	99	99	94	95	85	91	125	141	117	134	21
Glicina	38	37	38	35	37	42	42	40	46	36	39	46	52	45	51	5
Glutamina	789	841	779	874	745	885	907	859	728	794	660	1177	1081	844	1159	152
Hidroxiprolina	36	45	55	52	73	61	43	61	88	68	51	87	100	63	105	21
Histidina	46	41	44	40	41	53	51	47	51	45	47	59	66	53	64	8
Isoleucina	44	41	40	39	39	46	48	53	56	43	49	69	80	59	71	13
Leucina	85	74	78	72	70	91	91	102	104	84	91	129	150	117	135	24
Lisina	61	58	60	52	57	71	74	66	78	58	65	84	107	73	96	15
Metionina	17	10	17	16	9	20	19	22	24	18	21	29	35	25	32	7
Prolina	605	754	747	752	783	719	705	714	721	566	575	891	713	750	834	88
Serina	55	46	54	48	43	59	57	59	62	54	55	75	81	68	78	11
Tirosina	70	64	65	59	60	72	71	74	78	64	68	96	109	86	98	15
Treonina	50	45	47	46	43	53	56	53	57	48	51	67	76	61	74	10
Triptófano	41	45	42	38	31	38	37	39	44	37	40	42	55	44	45	5
Valina	85	77	83	71	76	95	90	95	100	85	85	119	140	110	121	19

FAN: aminonitrógeno libre; <10: compuesto detectado por debajo del límite de cuantificación (LOQ).

En la **Tabla 6.41** se presentan los resultados del análisis de varianza realizado, donde se puede observar una disminución notoria de los efectos significativos de las variables estudiadas si la comparamos con la tabla del ANOVA de las maltas (**Tabla 6.37**) y de las cebadas de partida (**Tabla 6.33**). Si nos centramos en los parámetros analíticos analizados, el año ha tenido un efecto significativo sobre el contenido de β-glucanos, cloruros, color y magnesio; la localidad supone un efecto significativo sobre el calcio, cloruros, FAN y fosfatos; el genotipo ha mostrado un efecto significativo sobre el contenido de cloruros, fosfatos y pH; de las interacciones, año × localidad ha tenido un efecto sobre el pH y el contenido de zinc y la localidad × genotipo sobre los fosfatos. No se ha detectado diferencias significativas de la interacción año × genotipo.

Respecto el perfil de aminoácidos, la variable con mayor influencia ha sido la localidad, por encima del año y del genotipo, exceptuando para la glutamina, hidroxiprolina, serina y triptófano, los cuales no han presentado significancia para ninguna de las variables estudiadas, indicando que su contenido parece ser estable entre año, localidades y genotipos. Esta alta influencia de la localidad sobre los distintos aminoácidos determinados puede

deberse tanto a las características de manejo de cultivo y/o propiedades del suelo de cada zona de cultivo y, además, a las condiciones ambientales que se dieron en cada zona.

Tabla 6.41. Valores *p* resultantes del ANOVA del modelo fijo para los mostos cerveceros elaborados a partir de cuatro genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.

	Año (A)		Localidad (L)		Genotipo (G)		A x L	A x G	L x G
	GL	1	3	3	3	3			
Amargos		0.1331	0.7452	0.6080	0.3146	0.3160	0.6786		
°Balling		0.1723	0.1538	0.2874	0.9818	0.9268	0.1498		
β-glucanos		<0.0001	0.0201	0.0339	0.0787	0.2755	0.1006		
Calcio		0.0230	0.0097	0.0466	0.3432	0.4405	0.3401		
Cloruros		<0.0001	<0.0001	0.0076	0.0150	0.0490	0.0238		
Color		0.0019	0.0125	0.2553	0.3517	0.7089	0.5318		
FAN		0.0942	<0.0001	0.0479	0.0543	0.4812	0.0362		
Fosfatos		0.1567	0.0004	<0.0001	0.0265	0.0154	0.0068		
Magnesio		0.0031	0.0168	0.9094	0.3197	0.6154	0.1736		
Nitratos		0.9642	0.4000	0.4971	0.3718	0.1816	0.5827		
Oxalatos		0.4126	0.2412	0.6562	0.5683	0.8010	0.6913		
pH		0.7922	0.0128	0.0061	0.0059	0.1109	0.4667		
Sulfatos		0.0267	0.3526	0.3445	0.4379	0.2149	0.2532		
Zinc		0.3285	0.0511	0.0132	0.0025	0.5927	0.5580		
<i>Aminoácidos</i>									
Ácido aspártico		0.0003	0.0037	0.2717	0.8758	0.7337	0.3823		
Ácido glutámico		0.5582	0.0006	0.1590	0.0844	0.3279	0.3832		
Alanina		0.4172	0.0027	0.3501	0.6435	0.9245	0.2899		
Arginina		0.4582	0.0014	0.1219	0.4423	0.9032	0.4175		
Asparagina		<0.0001	<0.0001	0.0006	<0.0001	0.0688	0.0232		
Cistina		0.0012	0.8693	0.0466	0.6210	0.8183	0.6193		
Fenilalanina		0.2661	0.0026	0.9132	0.3048	0.8557	0.4104		
Glicina		0.9798	0.0055	0.5183	0.9673	0.9373	0.2598		
Glutamina		0.9378	0.3496	0.9097	0.2200	0.7455	0.4948		
Hidroxiprolina		0.0409	0.0322	0.3577	0.8275	0.3480	0.3758		
Histidina		0.5205	0.0006	0.9819	0.6811	0.8221	0.3607		
Isoleucina		0.4160	0.0040	0.5307	0.1487	0.6826	0.2331		
Leucina		0.2931	0.0059	0.5987	0.1233	0.8735	0.3714		
Lisina		0.5254	0.0038	0.5849	0.7731	0.9566	0.4219		
Metionina		0.0368	0.0019	0.7412	0.1807	0.4447	0.1455		
Prolina		<0.0001	0.0559	0.5924	0.4559	0.3430	0.2123		
Serina		0.4300	0.0093	0.8416	0.4593	0.9312	0.3395		
Tirosina		0.1744	0.0038	0.6141	0.4045	0.9538	0.3660		
Treonina		0.3667	0.0020	0.4393	0.6297	0.9708	0.1988		
Triptófano		0.1237	0.0399	0.2428	0.6325	0.8842	0.5246		
Valina		0.2002	0.0026	0.4567	0.3943	0.9298	0.3488		

GL: grados de libertad; A: año; L: localidad; G: genotipo. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A x L x G) se ha utilizado como término error. FAN: aminonitrógeno libre.

En este trabajo no se han determinado los compuestos aromáticos en los mostos, pero Stewart et al. (2022) quienes estudiaron en detalles el perfil aromático de mostos procedentes de 11 variedades distintas de cebada malteada en distintas malterías, observaron diferencias significativas entre variedades, zonas de cultivo y malterías, coincidiendo con lo reportado por Bettenhausen et al. (2021) y Herb et al. (2007a).

En otras palabras, los resultados obtenidos parecen señalar la existencia de una fuerte influencia por parte de la zona de cultivo sobre los aminoácidos y algunos parámetros de calidad de los mostos que, a términos generales, podría venir dada por la calidad del suelo, el manejo del propio cultivo y las condiciones ambientales que se han dado durante el año. Asimismo, también parece existir un efecto genotípico sobre alguno de los parámetros analíticos. Mediante los resultados de H², presentados en la **Tabla 6.42**, podemos clarificar estas observaciones. Los β-glucanos, el calcio, los cloruros, el color, los fosfatos, el pH, el zinc, el ácido glutámico, la arginina, asparagina y cistina son los únicos parámetros con una influencia genotípica, ya que los resultados de H² han sido mayores a 0.60. El resto de los parámetros y aminoácidos presentaron una influencia ambiental mayor, puesto que los valores de H² fueron por debajo de 0.50. Por lo que, coincidiendo con lo observado en el ANOVA, en los genotipos estudiados parece ser que los aminoácidos están mayormente influenciados por el ambiente y en menor medida por el genotipo.

Tabla 6.42. Heredabilidad (H²) de los parámetros analíticos y aminoácidos analizados en los mostos cerveceros elaborados a partir de los seis genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.

Amargos	°Balling	β-glucanos	Ca	Cl	Color	FAN	Fos	Mg	Nit	Oxa	pH
0.00	0.21	0.68	0.73	0.64	0.63	0.50	0.90	0.00	0.09	0.00	0.90
<i>Aminoácidos</i>											
Sulf	Zinc	Asp	Glu	Ala	Arg	Asn	Cis	Fen	Gli	Gln	Hip
0.28	0.90	0.33	0.67	0.17	0.65	0.87	0.83	0.00	0.00	0.00	0.00
His	Ile	Leu	Lis	Met	Pro	Ser	Tir	Tre	Trp	Val	
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52	0.00	

Ca: calcio; Cl: cloruros; FAN: aminonitrógeno libre; Fos: fosfatos; Mg: magnesio; Nit: nitratos; Oxa: oxalatos; Sulf: sulfatos; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Cis: cistina; Fen: fenilalanina; Gli: glicina; Gln: glutamina; Hip: hidroxiprolina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lis: lisina; Met: metionina; Pro: prolina; Ser: serina; Tir: tirosina; Tre: treonina; Trp: triptófano; Val: valina.

6.4.4. CERVEZA

Las concentraciones de los parámetros analíticos, compuestos aromáticos volátiles y perfil de aminoácidos se presentan en la **Tabla 6.43** para las cervezas elaboradas de las muestras del 2018 y en la **Tabla 6.44** para las del 2019. A diferencia de las muestras de cebada (**Tabla 6.31** y **Tabla 6.32**) y las de malta (**Tabla 6.35** y **Tabla 6.36**), a simple vista no es tan fácil discernir la existencia de diferencias sobre el contenido de los parámetros estudiados. Si es cierto que, como cabía esperar, el contenido de β -glucanos ha sido mayor en las muestras del 2019, tal y como se ha observado anteriormente en las demás fracciones analizadas (cebada, malta y mosto). De la misma manera, la graduación alcohólica varía en un rango entre 7.5 y 4.3 dependiendo de la muestra, pudiéndose deber a diferencias en la composición inicial del mosto y/o a la efectividad de la fermentación y maduración.

Coincidiendo con lo descrito anteriormente en el apartado 6.3.2, el contenido de alcoholes superiores es mayor que el de los ésteres, siendo los alcoholes isoamílicos y el acetato de etilo los mayoritarios para cada grupo. De la misma manera, el contenido de acetaldehído, diacetilo y pentanodiona ha resultado ser mayor en las cervezas procedentes del 2019 respecto las procedentes del 2018. Son numerosos los compuestos aromáticos determinados en cerveza, Bettenhausen et al. (2018) y Bettenhausen et al. (2020) determinaron cerca de 138 compuestos aromáticos volátiles y no volátiles, 64 de los cuales se han asociado con un aroma y sabor a cereal y cerca de 23 a un aroma y sabor herbáceo, siendo este considerado como un aroma indeseable y pudiendo propiciar el enranciamiento de la cerveza (Bettenhausen et al., 2021).

En el caso de los aminoácidos, la glutamina y la prolina presentan un contenido mayoritario respecto los demás. Enfatizar en el aumento del número de aminoácidos que se detectan por debajo del límite cuantificable (LOQ), lo que indicaría el consumo de éstos por parte de levadura durante la fermentación (Fix, 2000).

Tabla 6.43. Concentraciones de los parámetros de calidad, compuestos aromáticos y aminoácidos analizados en las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos cerveceros elaborados a partir de las maltas de cebada de 2018 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).

	Bell-Iloc		Sádaba				Saganta				Sariñena				SED		
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter		Planet	Shakira
Alcohol (% v/v)	5.9	5.4	6.3	6.2	6.3	5.6	5.7	6.5	6.6	7.5	5.6	4.3	5.9	5.6	6.2	6.3	0.7
Amargor (IBU)	29	23	21	18	28	25	16	15	20	15	18	24	23	18	23	27	5
Atenuación real (%)	60	63	66	65	66	78	70	68	66	75	71	68	73	65	70	71	5
β-glucanos (mg/L)	30	87	26	44	49	52	16	22	71	9	20	32	140	69	75	37	34
Color (EBC)	11.0	8.3	8.3	10.4	13.0	8.1	11.5	11.8	13.2	15.7	7.9	13.1	9.6	12.5	10.3	9.1	2.3
Densidad (g/ml)	1.016	1.013	1.012	1.012	1.012	1.002	1.008	1.010	1.013	1.006	1.007	1.007	1.011	1.011	1.009	1.007	0.004
Extracto aparente (* P)	4.2	3.2	3.1	3.1	3.1	0.5	1.9	2.7	3.2	1.5	1.7	1.7	1.4	2.9	2.2	1.9	0.9
Extracto primitivo (% p/p)	15	13	15	14	15	11	13	15	15	15	12	10	13	13	14	14	2
Extracto real (%)	6.3	5.2	5.3	5.3	5.3	2.5	4.0	5.0	5.5	4.1	3.7	3.3	3.6	4.9	4.4	4.1	1.0
FAN (mg/L)	120	102	59	80	91	46	67	75	102	112	125	70	141	124	139	113	29
pH	4.7	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7	4.7	4.7	4.6	4.6	4.6	4.6	4.8	4.8	4.7	4.7	0.1
Sulfuroso (mg/L)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	0.0
<i>Compuestos aromáticos</i>																	
Alcoholes superiores totales (mg/L)	127	133	139	148	120	139	133	118	151	167	96	100	109	136	117	119	19
Ácido feniletanol (mg/L)	4.7	6.6	2.4	3.9	5.0	4.9	4.8	3.2	3.7	4.0	7.1	1.2	5.2	4.2	5.0	3.6	1.4
β-Feniletanol (mg/L)	29	32	29	30	22	28	28	28	24	28	27	23	25	27	25	17	4
Isoamilo (mg/L)	80	81	87	96	81	89	85	74	101	113	59	61	69	87	75	84	14
Isobutanol (mg/L)	18	19	23	22	17	23	20	16	26	26	11	15	16	21	17	18	4
Ésteres totales (mg/L)	25	27	20	26	27	24	25	22	26	32	29	12	26	24	28	25	4
Acetato etilo (mg/L)	18	19	16	20	20	17	18	17	20	25	20	10	19	18	20	20	3
Acetato isoamilo (mg/L)	0.86	0.95	0.60	0.93	0.85	0.69	0.84	0.71	0.79	1.23	1.05	0.41	0.90	0.77	0.84	0.86	0.18
Acetato isobutilo (mg/L)	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.05	0.03	0.05	0.05	0.06	0.05	0.01
Butirato etilo (mg/L)	0.12	0.12	0.10	0.13	0.12	0.11	0.11	0.11	0.14	0.14	0.12	0.07	0.12	0.10	0.13	0.12	0.02
Caprato de etilo (mg/L)	0.27	0.37	0.20	0.26	0.34	0.46	0.31	0.19	0.32	0.28	0.31	0.16	0.30	0.30	0.32	0.23	0.07
Caprilato etilo (mg/L)	0.43	0.55	0.41	0.50	0.51	0.55	0.51	0.38	0.55	0.56	0.41	0.35	0.45	0.50	0.57	0.41	0.07
Caproato etilo (mg/L)	0.15	0.19	0.14	0.16	0.17	0.15	0.16	0.14	0.18	0.19	0.17	0.10	0.16	0.16	0.18	0.16	0.02
Propionato etilo (mg/L)	0.08	0.07	0.08	0.09	0.09	0.09	0.10	0.07	0.12	0.11	0.06	0.05	0.08	0.10	0.08	0.10	0.02
Relación alcoholes-ésteres	5.0	4.8	7.3	6.0	4.4	5.9	5.4	5.6	5.7	5.2	3.3	8.3	4.2	6.0	4.8	5.0	1.2
Acetaldehído (mg/L)	5.9	19.4	9.3	6.7	7.0	7.1	8.3	5.2	10.1	8.8	11.0	9.3	6.4	26.2	17.6	4.7	5.9
Diacetilo (µg/L)	21	57	24	38	37	34	36	47	44	37	41	17	32	47	83	32	15
DMS (µg/L)	36	41	33	29	43	61	49	36	47	87	46	28	68	78	53	61	17
Pentanodiona (µg/L)	2.5	6.1	3.0	3.1	2.7	3.1	3.6	5.9	4.6	4.5	3.3	2.5	4.5	4.7	7.3	3.2	1.4
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>																	
Ácido aspártico	12	18	11	14	25	<10	14	29	15	40	40	<10	77	31	56	39	21
Ácido glutámico	22	24	21	22	36	<15	23	33	27	62	49	16	64	40	59	41	18
Alanina	65	61	47	53	102	34	55	85	132	169	121	46	168	107	145	111	45
Arginina	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	32	<15	57	40	20	59	<15	59	41	24
Asparagina	<10	<10	<10	<10	11	<10	<10	21	<10	13	31	<10	56	11	67	34	21
Cistina	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0
Fenilalanina	28	25	21	29	38	<15	22	28	49	79	57	<15	64	37	70	42	23
Glicina	30	30	30	26	36	23	29	35	42	58	37	18	53	42	47	43	11
Glutamina	258	168	226	211	316	153	173	331	478	632	665	163	731	240	900	440	235
Hidroxiprolina	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	13	<10	<10	13	11	15	11	6
Histidina	<15	<15	17	17	16	<15	<15	21	16	30	27	<15	<15	24	37	26	13
Isoleucina	<10	<10	<10	12	13	<10	<10	13	19	37	27	<10	31	13	34	20	13
Leucina	12	<10	11	16	17	<10	11	15	23	47	37	<10	36	18	47	23	15
Lisina	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	18	<15	36	20	<15	29	<15	30	23	14
Metionina	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15	19	<15	5
Prolina	475	559	516	606	437	312	555	522	461	494	448	265	429	455	464	519	86
Serina	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	12	<10	17	<10	23	12	8
Tirosina	42	40	35	35	51	26	36	37	63	92	59	25	72	52	76	53	19
Treonina	11	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	12	<10	17	<10	6
Triptófano	18	22	19	16	16	14	14	16	18	37	27	11	27	24	27	20	7
Valina	36	33	23	31	51	17	29	36	67	102	69	21	86	50	86	54	26

FAN: aminonitrógeno libre; DMS: sulfuro de dimetilo; <10 y <15: compuesto detectado por debajo del límite de cuantificación (LOQ).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.44. Concentraciones de los parámetros de calidad, compuestos aromáticos y aminoácidos analizados en las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos elaborados a partir de las maltas de cebada de 2019 procedentes de cuatro genotipos cultivados en cuatro localidades distintas durante dos años. Los resultados se expresan como media de análisis y error estándar de la diferencia (SED) (n=4).

	Bell-lloc		Sádaba				Saganta				Sariñena				SED	
	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet	Shakira	Basic	Pewter	Planet		Shakira
Alcohol (% v/v)	5.6	5.4	5.4	5.5	4.3	5.7	5.6	5.4	4.8	5.1	5.0	5.3	5.7	5.5	5.6	0.4
Amargor (IBU)	19	23	25	24	31	25	24	23	32	23	24	24	19	23	21	4
Atenuación real (%)	64	65	63	63	62	64	65	63	60	71	62	59	68	62	64	3
β-glucanos (mg/L)	99	92	163	205	241	180	123	102	125	46	122	173	135	131	160	49
Color (EBC)	7.1	6.5	9.3	6.8	8.1	8.9	9.6	8.3	7.7	7.2	7.5	8.4	15.8	9.3	12.5	2.4
Densidad (g/ml)	1.012	1.010	1.012	1.013	1.010	1.012	1.011	1.012	1.013	1.006	1.012	1.016	1.010	1.013	1.012	0.002
Extracto aparente (* P)	3.0	2.6	3.2	3.2	2.7	3.2	2.9	3.1	3.4	1.5	3.1	4.0	2.5	3.3	3.1	0.5
Extracto primitivo (% p/p)	13	13	13	13	11	14	13	13	12	11	12	14	13	13	14	1
Extracto real (%)	5.0	4.6	5.1	5.2	4.3	5.2	4.9	5.0	5.1	3.4	4.9	5.9	4.5	5.3	5.1	0.6
FAN (mg/L)	70	78	118	66	98	122	123	104	114	99	101	120	143	117	125	22
pH	4.7	4.8	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.6	4.7	4.7	4.8	4.7	4.8	4.7	4.7	0.0
Sulfuroso (mg/L)	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	1.1	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.3
<i>Compuestos aromáticos</i>																
Alcoholes superiores totales (mg/L)	129	124	138	135	96	125	92	122	111	120	106	111	117	109	115	13
Ácido feniletanol (mg/L)	2.2	4.3	3.7	3.4	2.3	4.3	4.7	5.2	3.9	4.0	4.5	1.8	4.1	3.9	3.8	0.9
β-Feniletanol (mg/L)	21	27	28	28	20	25	15	25	18	26	23	25	22	21	19	4
Isoamilo (mg/L)	86	79	88	87	62	82	65	80	76	76	69	71	79	72	79	8
Isobutanol (mg/L)	22	17	22	20	14	18	12	17	17	18	15	15	16	16	16	3
Ésteres totales (mg/L)	19	22	23	22	14	25	23	26	21	21	21	20	22	21	23	3
Acetato etilo (mg/L)	15	16	17	17	10	19	17	19	16	16	15	17	17	16	17	2
Acetato isoamilo (mg/L)	0.68	0.82	0.79	0.84	0.49	0.91	0.92	0.96	0.85	0.77	0.71	0.75	0.79	0.74	0.85	0.11
Acetato isobutilo (mg/L)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.01
Butirato etilo (mg/L)	0.08	0.10	0.11	0.10	0.07	0.11	0.10	0.11	0.09	0.10	0.10	0.09	0.11	0.10	0.11	0.01
Caprato de etilo (mg/L)	0.24	0.25	0.29	0.29	0.23	0.32	0.24	0.35	0.27	0.26	0.30	0.21	0.28	0.23	0.28	0.04
Caprilato etilo (mg/L)	0.34	0.41	0.42	0.44	0.33	0.46	0.35	0.49	0.35	0.43	0.37	0.40	0.43	0.36	0.42	0.05
Caproato etilo (mg/L)	0.11	0.13	0.14	0.14	0.10	0.15	0.13	0.15	0.13	0.16	0.13	0.11	0.17	0.14	0.16	0.02
Propionato etilo (mg/L)	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	0.09	0.08	0.07	0.08	0.06	0.08	0.08	0.07	0.09	0.01
Relación alcoholes-ésteres	6.8	5.7	6.2	6.1	6.8	5.0	4.0	4.8	5.4	6.4	5.1	5.5	5.9	5.3	5.2	0.8
Acetaldehído (mg/L)	24.5	8.4	10.4	21.7	17.9	14.5	15.6	12.1	17.6	39.3	10.4	5.5	12.1	15.7	9.1	8.3
Diacetilo (µg/L)	187	139	95	116	158	117	329	91	164	158	110	85	89	159	158	61
DMS (µg/L)	28	30	40	25	37	49	43	48	36	47	33	53	49	42	49	9
Pentanodiona (µg/L)	75	34	41	34	32	35	54	26	51	42	17	18	15	31	21	16
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>																
Ácido aspártico	<10	16	<10	<10	41	44	70	22	29	25	30	65	48	45	42	22
Ácido glutámico	<15	24	<15	<15	37	38	58	24	30	29	31	47	35	42	37	17
Alanina	25	50	28	30	82	114	128	75	92	65	96	148	107	122	114	39
Arginina	<15	<15	<15	<15	28	42	66	18	22	16	28	57	53	32	39	22
Asparagina	<10	<10	<10	<10	17	18	47	11	11	14	13	35	27	16	14	13
Cistina	<10	12	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	3
Fenilalanina	<15	16	<15	<15	16	35	52	23	26	25	26	53	42	45	37	18
Glicina	22	30	24	22	30	38	40	28	34	30	34	45	35	39	36	7
Glutamina	113	135	130	103	217	382	596	242	207	236	288	650	427	433	373	171
Hidroxiprolina	<10	<10	<10	<10	13	12	15	<10	<10	<10	<10	21	15	<10	<10	8
Histidina	<15	<15	<15	<15	<15	23	27	16	17	19	17	27	23	24	19	11
Isoleucina	11	<10	<10	<10	<10	19	27	12	13	13	12	27	26	21	18	10
Leucina	<10	<10	<10	<10	<10	18	31	13	14	13	14	27	26	23	20	11
Lisina	<15	<15	<15	<15	<15	20	31	<15	17	<15	16	23	27	21	21	12
Metionina	<15	<15	<15	<15	<15	<15	17	<15	<15	<15	<15	<15	18	<15	<15	6
Prolina	293	365	346	406	304	461	548	413	289	355	424	389	624	512	498	98
Serina	<10	<10	<10	<10	<10	<10	13	<10	<10	<10	<10	14	12	<10	<10	5
Tirosina	19	27	17	20	25	43	58	32	37	30	36	61	44	52	45	14
Treonina	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	0
Triptófano	12	21	14	11	<10	15	20	15	18	15	18	20	19	20	16	5
Valina	13	24	14	13	28	51	70	36	46	34	40	74	56	63	54	20

FAN: aminonitrógeno libre; DMS: sulfuro de dimetilo; <10 y <15: compuesto detectado por debajo del límite de cuantificación (LOQ).

Los resultados del ANOVA se muestran en la **Tabla 6.45**, donde lo que más resalta es la disminución de la significación de las variables de estudio sobre los parámetros analizados. Se ha detectado diferencias significativas según el año para el contenido de β-glucanos, pH, β-feniletanol, butirato etilo, caprilato etilo, caproato etilo, diacetilo y pentanodiona; la localidad ha tenido un efecto significativo sobre el pH, el DMS y los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, fenilalanina, glicina, glutamina, histidina, tirosina y valina; en el caso del genotipo tan solo se ha detectado un efecto significativo sobre el pH. En las muestras

analizadas no se ha detectado ninguna interacción como variable significativa sobre los parámetros estudiados.

De hecho, los compuestos aromáticos determinados en las muestras estudiadas tienden a estar significativamente influenciadas por el año, mientras que los aminoácidos detectados han estado mayormente influenciados por la localidad. Puesto que el año es una mezcla entre las condiciones ambientales, las condiciones del malteado y el método por el cual se han elaborado las cervezas, en este trabajo parece más correcto considerar el año como una variable mayormente relacionada con las condiciones de proceso o como el efecto industrial per se. En cambio, la variable localidad se podría asociar más directamente a la influencia ambiental.

Como se ha explicado anteriormente, la mayoría de los compuestos aromáticos provienen del metabolismo de la levadura, como por ejemplo los alcoholes superiores que se sintetizan por medio de metabolizar los aminoácidos (Loviso y Libkind, 2019) o los ésteres que se origina, principalmente, por medio de la utilización de compuestos lipídicos (Loviso y Libkind, 2018). Por ello, las diferencias en el perfil aromático que se han detectado se podrían asociar, no tan solo a las condiciones ambientales e industriales, sino también a las características de cada zona de cultivo estudiadas.

Por otro lado, la influencia genotípica no parece ser una variable que influya sobre los parámetros de calidad ni sobre el perfil aromático de las cervezas obtenidas, a pesar de que se ha identificado en trabajos anteriores como los realizados por Bettenhausen et al. (2021), Herb et al. (2017a) y Stewart et al. (2022), entre otros. Esta discrepancia puede venir dada por las variedades empleadas en este trabajo o bien por la metodología de elaboración de los mostos cerveceros y su fermentación.

Todos estos hallazgos comentados, parecen indicar que, a pesar de partir de cebadas con grandes diferencias significativas tanto entre años y zona de cultivo como entre genotipos, una vez se ha realizado todos los procesos de malteado, elaboración del mosto y fermentación, estas diferencias entre muestras tienden a disminuir y resultar en cervezas sin grandes diferencias significativas para los parámetros estudiados. Esto da que pensar que, al final, tras toda la actividad enzimática que supone la producción de cerveza y el metabolismo de la levadura durante la fermentación, el producto final resulta equilibrado.

Tabla 6.45. Valores *p* resultantes del ANOVA del modelo fijo para las cervezas obtenidas tras fermentar los mostos cerveceros elaborados a partir de cuatro genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localizaciones distintas durante dos años consecutivos de cultivo.

	Año (A)		Localidad (L)		Genotipo (G)		A x L	A x G	L x G
	GL	1	3	3	3	3	3	3	9
Alcohol		0.0260	0.9220	0.9177	0.8839	0.8256	0.4626		
Amargos		0.1054	0.7936	0.6199	0.2601	0.5256	0.5117		
Atenuación real		0.0239	0.5332	0.5670	0.3897	0.9582	0.9519		
β-glucanos		0.0002	0.1528	0.7207	0.3579	0.6193	0.4465		
Color		0.0221	0.1492	0.5719	0.0731	0.6736	0.2250		
Densidad		0.0634	0.1824	0.1291	0.2601	0.8558	0.7897		
Extracto aparente		0.0617	0.2952	0.3078	0.2880	0.9910	0.8083		
Extracto primitivo		0.2188	0.3778	0.3171	0.6779	0.8362	0.1806		
Extracto real		0.1621	0.2192	0.2105	0.2760	0.9879	0.5253		
FAN		0.3029	0.0268	0.6396	0.2255	0.6360	0.8779		
pH		0.0011	0.0023	0.0066	0.0612	0.3191	0.0694		
Sulfuro		0.2789	0.7389	0.6264	0.5740	0.4773	0.5249		
<i>Compuestos aromáticos</i>									
Alcoholes superiores totales		0.0257	0.0657	0.3829	0.5055	0.1373	0.1639		
Ácido feniletanol		0.2619	0.9748	0.6040	0.7112	0.3219	0.7040		
β-feniletanol		0.0091	0.0230	0.2038	0.4432	0.4361	0.4245		
Isoamílicos		0.1079	0.2816	0.5287	0.6720	0.2217	0.1313		
Isobutanol		0.0539	0.1118	0.5547	0.5552	0.2403	0.2508		
Ésteres totales		0.0582	0.9748	0.6434	0.9689	0.3140	0.3557		
Acetato de etilo		0.0438	0.9406	0.6356	0.9729	0.3923	0.2268		
Acetato isoamilo		0.5432	0.8908	0.8961	0.9535	0.4060	0.1960		
Acetato isobutilo		0.0246	0.2341	0.4009	0.7465	0.3943	0.1521		
Butirato etilo		0.0091	0.7319	0.9142	0.9392	0.3506	0.5764		
Caprato de etilo		0.3014	0.8531	0.1916	0.4829	0.0827	0.6605		
Caprilato etilo		0.0061	0.9957	0.2499	0.9333	0.1495	0.2887		
Caproatio etilo		0.0069	0.4605	0.4190	0.8189	0.1487	0.1810		
Propionato etilo		0.0523	0.6843	0.8052	0.8938	0.2774	0.1703		
Relación alcoholes-ésteres		0.7996	0.5876	0.8003	0.8849	0.4525	0.6412		
Acetaldehído		0.0862	0.8899	0.4940	0.3735	0.5686	0.6346		
Diacetilo		0.0001	0.4380	0.8281	0.3554	0.5405	0.3264		
DMS		0.0118	0.0019	0.0295	0.3904	0.0198	0.3666		
Pentanodiona		<0.0001	0.2803	0.8636	0.1934	0.8316	0.5358		
<i>Aminoácidos</i>									
Ácido aspártico		0.0315	<0.0001	0.5368	0.0114	0.3898	0.0286		
Ácido glutámico		0.6563	0.0015	0.7188	0.0298	0.3979	0.0764		
Alanina		0.4876	0.0005	0.3218	0.0553	0.4154	0.1792		
Arginina		0.4845	0.0197	0.9420	0.1855	0.6832	0.4544		
Aspargina		0.5527	0.0130	0.4186	0.1077	0.2982	0.3224		
Cistina		0.4468	0.4932	0.4932	0.4681	0.4681	0.5715		
Fenilalanina		0.0858	0.0072	0.4509	0.1018	0.4025	0.1941		
Glicina		0.1889	0.0100	0.5733	0.3517	0.5553	0.2720		
Glutamina		0.2440	0.0074	0.2728	0.1439	0.4275	0.3362		
Hidroxiprolina		0.1485	0.0852	0.4964	0.2652	0.4179	0.6047		
Histidina		0.1834	0.0020	0.4748	0.0694	0.6396	0.1538		
Isoleucina		0.6018	0.0219	0.7931	0.1516	0.6821	0.4148		
Leucina		0.2095	0.0239	0.7568	0.1327	0.4529	0.3683		
Lisina		0.9000	0.0977	0.9923	0.3748	0.7919	0.5128		
Metionina		0.8699	0.3927	0.8791	0.9344	0.4671	0.7948		
Prolina		0.0772	0.1988	0.4364	0.0903	0.7803	0.2376		
Serina		0.3835	0.0497	0.4806	0.2567	0.2896	0.5980		
Tirosina		0.0126	0.0043	0.3279	0.0847	0.2218	0.1283		
Treonina		0.2305	0.3140	0.4814	0.3444	0.5046	0.5712		
Triptófano		0.0324	0.0692	0.2294	0.4926	0.3522	0.2599		
Valina		0.1829	0.0011	0.3256	0.0605	0.3277	0.0966		

GL: grados de libertad; A: año; L: localidad; G: genotipo. Como los análisis se han realizado con las medias, la interacción triple (A x L x G) se ha utilizado como término error. FAN: aminonitrógeno libre; DMS: sulfuro de dimetilo.

Por medio del cálculo de la H^2 , en la **Tabla 6.46** discernimos los parámetros que se ven influenciados por el genotipo como la densidad, el pH y el DMS, de los demás parámetros analizados que se verían mayormente influenciados por el componente ambiental que, en este caso, recogería tanto las condiciones ambientales como las de proceso. Como se ha comentado anteriormente, el componente genético de los parámetros estudiados se ha visto disminuido enormemente respecto las cebadas de partida, pudiéndose atribuir a todo el procesamiento que se aplica hasta obtener la cerveza final.

Tabla 6.46. Heredabilidad (H^2) de los parámetros analíticos, compuestos aromáticos y aminoácidos analizados en las cervezas correspondientes a los mostos elaborados a partir de los seis genotipos de cebada malteada, cultivados en cuatro localidades durante dos años consecutivos.

Alcohol	Amargos	RDF	β -glucanos	Color	Densidad	Ext. aparente	Ext. primitivo	Ext. real	FAN	
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.75	0.47	0.11	0.50	0.00	
<u>Compuestos aromáticos</u>										
pH	Sulfuro	Alcoholes superiores totales	Ácido feniletanol	β -feniletanol	Isoam	Isobut	Ésteres totales	Acetato de etilo	Acetato isoamilo	
0.77	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Acetato isobutilo	Butirato etilo	Caprato de etilo	Caprilato etilo	Caproatio etilo	Propionato etilo	Relación alc-est	Acetaldehído	Diacetilo	DMS	Pentan
0.00	0.00	0.39	0.14	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.62	0.00
<u>Aminoácidos</u>										
Asp	Glu	Ala	Arg	Asn	Cis	Fen	Gli	Gln	Hip	
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	
His	Ile	Leu	Lis	Met	Pro	Ser	Tir	Tre	Trp	Val
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00

RDF: atenuación real; Ext.: extracto; FAN: aminonitrógeno libre; Isoam: isoamílicos; Isobut: isobutanol; alc-est: alcoholes-ésteres; DMS: sulfuro de dimetilo; Pentan: pentanodiona; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Cis: cistina; Fen: fenilalanina; Gli: glicina; Gln: glutamina; Hip: hidroxiprolina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lis: lisina; Met: metionina; Pro: prolina; Ser: serina; Tir: tirosina; Tre: treonina; Trp: triptófano; Val: valina.

En definitiva, elaborar cerveza engloba numerosas etapas que, tanto por reacciones químicas como enzimáticas, transforman la composición de las distintas fracciones y, a pesar de partir de cebadas y maltas con grandes diferencias significativas entre muestras, el producto final parece ser más similar y el componente genético menor cobrando más importancia el componente ambiental y de proceso.

6.4.5. DE CEBADA A CERVEZA

Con tal de facilitar la comprensión, las fracciones estudiadas (cebada, malta, mosto y cerveza) se han comparado entre ellas según parámetros en común y evolución de proceso: cebada vs. malta, malta vs. mosto y mosto vs. cerveza. Puesto que el cálculo de H^2 proporciona información tanto del componente genético como ambiental de los parámetros estudiados, en la **Figura 6.9** se ha representado la tendencia del H^2 según fracciones.

Primeramente, si comparamos la H^2 de los parámetros en común entre las muestras de cebada y sus correspondientes maltas (**Figura 6.9(A)**), observamos como las muestras de malta presentaban un mayor componente genético que las muestras de cebada, ya que se obtuvieron resultados mayores para el cálculo de H^2 . Las principales diferencias entre la cebada y la malta vendrían dadas por las transformaciones químicas y bioquímicas que ocurren en el grano durante el malteado (Moll et al., 1979). No obstante, debemos añadir la diferencia en el comportamiento de cada genotipo frente las mismas condiciones de malteado, es decir, no todas las variedades de cebada se modifican de la misma manera bajo las mismas condiciones de proceso (Bettenhausen et al., 2020; Herb et al., 2017a; Herb et al., 2017b; Sayre-Chavez et al., 2022). Por tanto, se podría asumir que el componente ambiental de las muestras de malta vendría dado tanto por las condiciones agroclimáticas como las condiciones del proceso de malteado.

Por otro lado, en la **Figura 6.9(B)** se han comparado los valores de H^2 de los parámetros comunes entre las muestras de malta y mosto cervecero. Los valores de H^2 disminuyen entre ellas, siendo las muestras de malta las que presenta una mayor influencia genotípica. Una posible explicación para esta disminución en el componente genético entre las maltas y los mostos podría ser la actividad enzimática que se da durante el proceso de elaboración del mosto cervecero, tal y como describen Moll et al. (1979) tras observar que el efecto con mayor peso en la calidad de sus muestras fueron las condiciones de proceso. Por tanto, a través de estos resultados, podríamos incluir en el componente ambiental tanto las condiciones ambientales como las propias condiciones del proceso de elaboración de la cerveza.

Por último, si comparamos la H^2 de los parámetros comunes entre los mostos y sus correspondientes cervezas (**Figura 6.9(C)**), los valores disminuyen considerablemente. Existe la posibilidad que, tras la fermentación y maduración de la cerveza, muchos de los compuestos aromáticos presentes en ella disminuyan su concentración y el producto se equilibre (Díaz et al., 2022). Asimismo, como se ha comentado anteriormente, las concentraciones de aminoácidos disminuyen considerable entre los mostos y la cerveza, indicando que, aparentemente, el metabolismo de la levadura ha sido correcto y suficiente. En consecuencia y teniendo en cuenta los resultados de H^2 , el componente ambiental podría incluir tanto las condiciones ambientales como el efecto de la fermentación.

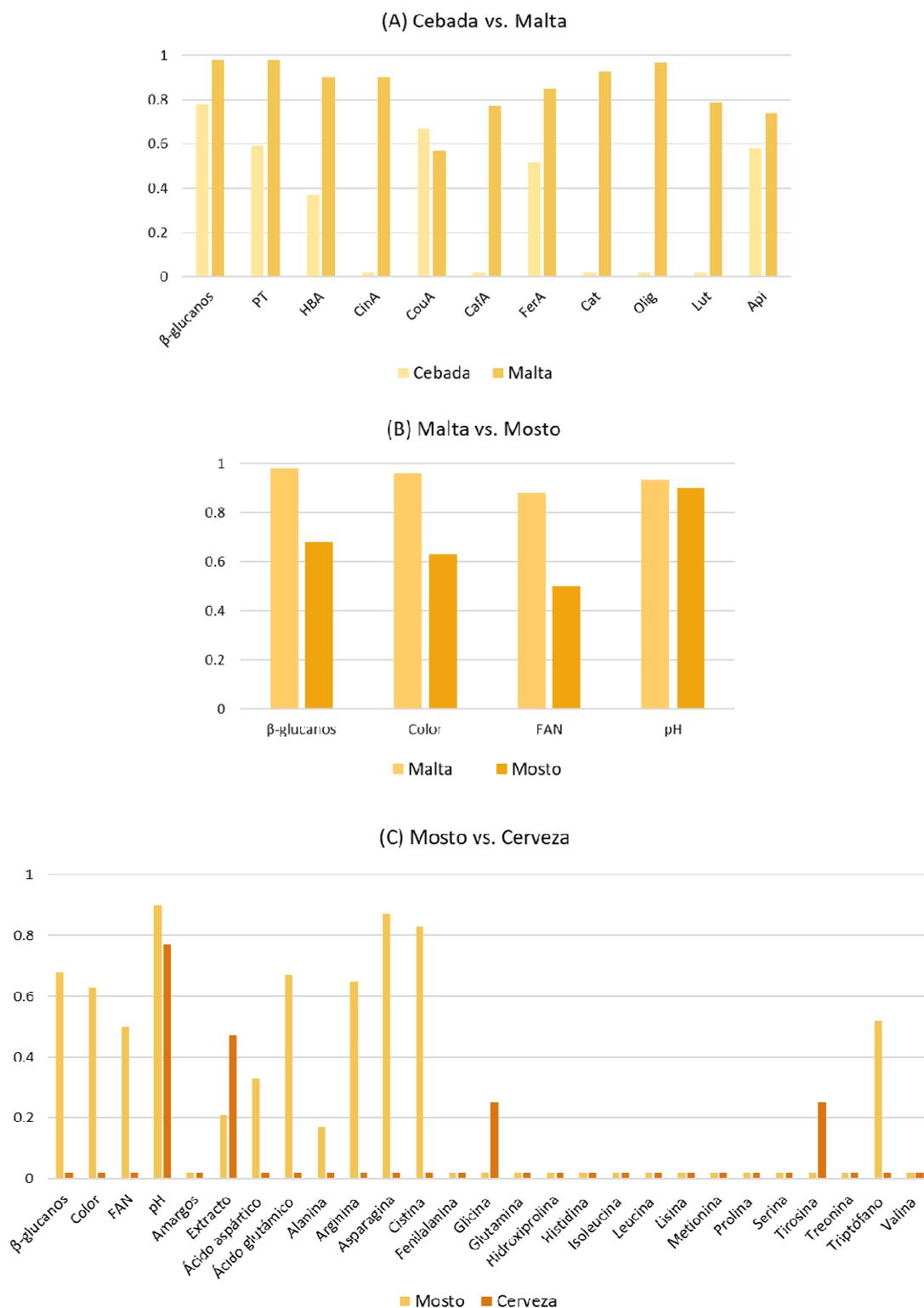


Figura 6.9. Evolución de la heredabilidad (H^2) entre las comparaciones de las fracciones estudiadas y los parámetros en común. (A) Cebada vs. Malta, (B) Malta vs. Mosto y (C) Mosto vs. Cerveza. PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico y derivados; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados; FAN: aminonitrógeno libre.

Para esclarecer las diferencias observadas entre las fracciones estudiadas, se ha realizado el análisis multivariante para cada comparación. En la **Figura 6.10** se presenta el PCA para los parámetros comunes entre las muestras de cebada y sus correspondientes maltas. Como se observa, en el PCA1 se distinguen claramente las muestras de cebada, a la derecha del eje principal, de las muestras de malta, a su izquierda. En cambio, si nos centramos en el PCA2 observamos como el año 2018 se sitúa discretamente por encima del eje principal mientras que las muestras del 2019 se agrupan en la parte inferior. Asimismo, parece existir una tendencia entre ambientes, puesto que Sádaba, Saganta y Sariñena de 2019 se encuentran en ambas fracciones en la parte inferior del PCA2. Cabe destacar que las muestras de Bell-lloc para ambas fracciones y años se sitúan en la parte central del eje horizontal. El tamaño de los círculos nos indica que las muestras de malta resultaron en un mayor contenido fenólico respecto las cebadas, hallazgo que coincide con lo reportado por Zhou et al. (2020) y lo observado anteriormente en el apartado 6.3.1.

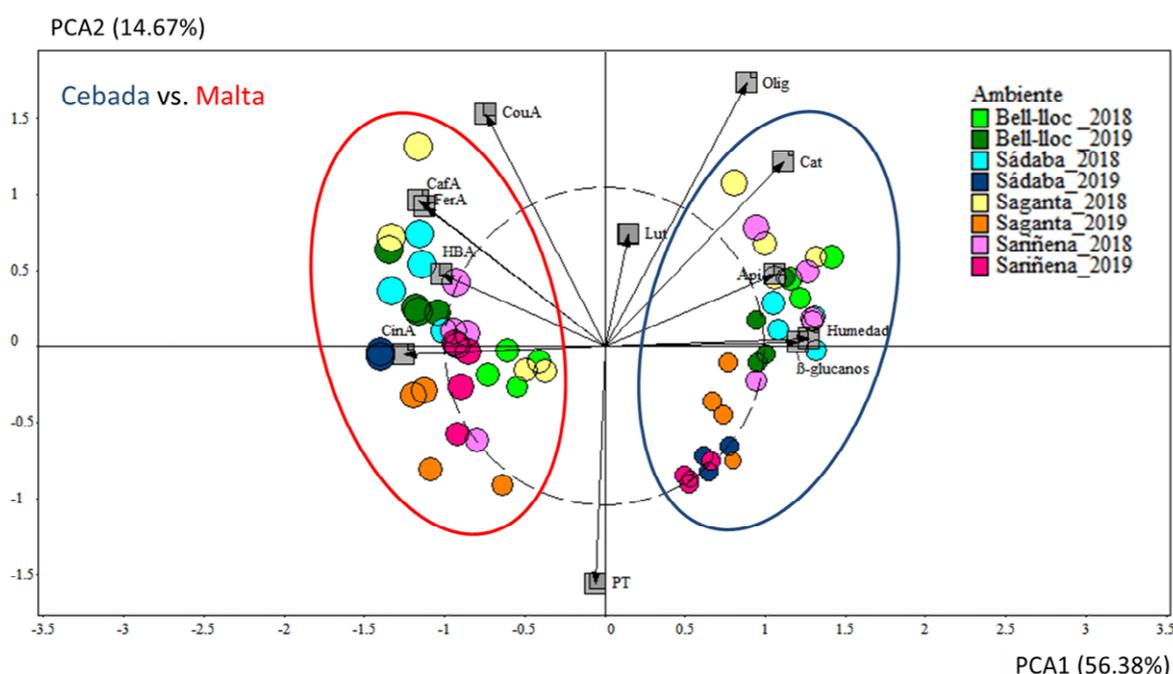


Figura 6.10. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros de calidad y compuestos fenólicos comunes entre las muestras de cebada (óvalo azul) y malta (óvalo rojo). El color de los círculos identifica el ambiente (localidad \times año); el tamaño de los círculos indica el total marginal. PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados.

Observando la **Figura 6.10**, los parámetros humedad, β -glucanos, Api, Cat y Olig parecen estar más asociados a las muestras de cebada, mientras que los parámetros CouA, CafA, FerA, HBA y CinA estarían más asociados a las muestras de malta. Asimismo, el contenido de PT se vería más asociado con las muestras procedentes de los cultivos del 2019, contrariamente a las familias fenólicas que parecen estar más vinculadas a las muestras procedentes del 2018.

En la **Figura 6.11** se presenta el PCA para la comparación entre las muestras de malta y sus correspondientes mostos cerveceros. A la derecha del eje principal se pueden observar las distintas muestras de mosto, mientras que a la izquierda de éste se sitúan las muestras de malta. El tamaño de los círculos individuales representa el total marginal de cada uno, por lo que los mostos presentan un contenido mayor respecto las maltas de los parámetros estudiados. Si nos centramos en el segundo eje, se puede intuir una dispersión según localidad y año distinta para cada fracción. En los mostos (óvalo verde), las muestras del 2019 se han situado en la parte superior, mientras que las del 2018 en la inferior. En cambio, para las muestras de malta (óvalo rojo), las muestras parecen estar más agrupadas, las muestras cultivadas en la localidad de Bell-lloc y Sádaba en ambos años se han agrupado en la parte central superior del eje horizontal, al contrario de las muestras cultivadas en Saganta en ambos años, que se han agrupado por debajo de éste. Una peculiaridad son las muestras de Sariñena, puesto que las del 2018 tienden a estar en la parte superior y las del 2019 en la inferior.

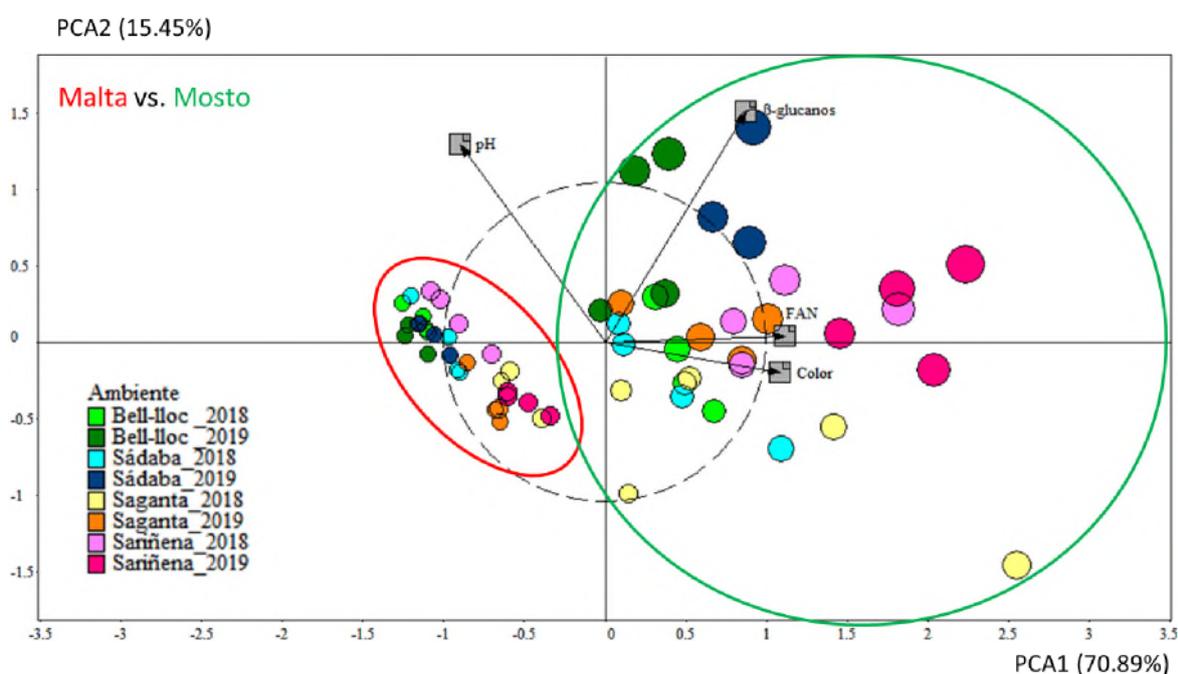


Figura 6.11. Resultado del PCA (PCA1 y PCA2) de los parámetros de calidad comunes entre las muestras de malta (óvalo rojo) y mosto (óvalo verde). El color de los círculos identifica el ambiente (localidad × año); el tamaño de los círculos indica el total marginal. FAN: aminonitrógeno libre.

De los parámetros en común entre ambas fracciones comparadas, los β -glucanos, FAN y color se asocian más a las muestras de mosto, que como indican los tamaños de los círculos individuales, el contenido de estos parámetros es mayor en los mostos que en las maltas. Esta observación podría atribuirse a la actividad enzimática que supone el macerado, hecho que propicia la solubilización de los compuestos. Por otro lado, los valores de pH se verían más asociados a las muestras de malta, dada la acidificación que supone todo el proceso de elaboración del mosto.

Tabla 6.47. Valores *p* del ANOVA de los ejes uno y dos de los componentes principales (PCA1 y PCA2) del PCA para cada comparación entre fracciones. (A) Cebada vs. Malta, (B) Malta vs. Mosto y (C) Mosto vs. Cerveza.

	GL	(A) Cebada vs. Malta		(B) Malta vs. Mosto		(C) Mosto vs. Cerveza	
		PCA1	PCA2	PCA1	PCA2	PCA1	PCA2
Año (A)	1	0.3392	<0.0001	0.8870	0.0058	0.8509	<0.0001
Localidad (L)	3	0.9559	0.0799	0.2053	0.0004	0.0934	<0.0001
Genotipo (G)	3	0.9970	0.5722	0.7587	0.1700	0.9560	0.7892
A × L	3	0.9964	0.0011	0.6360	0.0158	0.8440	0.2613
A × G	3	0.9973	0.8968	0.9111	0.3218	0.9790	0.7371
L × G	9	1.0000	0.7286	0.9996	0.4898	0.9932	0.0968

A: año; L: localidad; G: genotipo; GL: grados de libertad. La triple interacción (A × L × G) se ha utilizado como término error.

Primeramente, para la comparación entre las muestras de cebada y sus correspondientes maltas (**Tabla 6.47(A)**), al PCA1, aun explicando un 56.38% de la variabilidad, no se asocia significativamente ninguna variable estudiada. Aunque como hemos observado anteriormente, claramente este primer eje explica las diferencias entre las fracciones cebada y malta. En cambio, el 14.67% de la variabilidad explicada por el PCA2 se puede asociar significativamente al año de cultivo y a la interacción año × localidad.

Respecto a la comparación entre las muestras de malta y sus correspondientes mostos (**Tabla 6.47(B)**), el PCA1 no se asocia significativamente a ninguna de las variables estudiadas, aunque explica un 70.89% de la variabilidad. Como en el caso anterior, este primer eje explica la diferencia entre las muestras de malta y mosto. Por otro lado, el PCA2 explicando un 15.45% de la variabilidad, se ha asociado significativamente a la variable año y localidad.

Por último, en el análisis de los ejes del PCA de la comparación entre los mostos y sus correspondientes cervezas (**Tabla 6.47(C)**) no se ha determinado ninguna asociación significativa en la variabilidad del PCA1, puesto que el 68.32% quedaría explicado por la clara diferencia entre los mostos y las cervezas. El PCA2 explica el 13.63% de la variabilidad y se asociaría significativamente a la variable año y localidad.

Por medio de estos resultados, podemos observar como las variables año y zona de cultivo son las de mayor implicación sobre las muestras y fracciones de estudio, pudiendo indicar que el mayor efecto sobre las diferencias obtenidas comprende tanto las condiciones ambientales y de cultivo como las condiciones del proceso, coincidiendo con lo observado por Moll et al. (1979) en su estudio. A pesar de no haber detectado un efecto significativo del genotipo en este estudio, existen autores que, recientemente, han podido detectar una influencia genotípica sobre el perfil aromático de las cervezas, tales como Bettenhausen et al. (2018), Bettenhausen et al. (2020) y Sayre-Chavez et al. (2022). Esta contrariedad, podría venir dada por el uso de variedades comerciales de cebada muy bien adaptadas a las condiciones ambientales en las cuales se han cultivado para los estudios, puesto que son zonas de cultivo de uso común. Asimismo, también se ha empleado un método de micro-malteado y de

elaboración de cerveza a pequeña escala distinto al método usado en los estudios citados anteriormente.

De igual forma, estos hallazgos incitan a seguir realizando estudios que traten de explicar con mayor detalle la implicación de cada etapa de elaboración de la cerveza, desde las involucradas en el malteado como el macerado, fermentación y maduración posterior.

DISCUSIÓN GENERAL



7. DISCUSIÓN GENERAL

En primer lugar, con el micro-malteado de las muestras de cebada por medio del método alternativo evaluado en esta Tesis se elaboran maltas con resultados más representativos de las calidades industriales en comparación con las obtenidas en planta piloto. Este hecho ha permitido atribuir ciertas diferencias observadas en las maltas a las condiciones del proceso industrial, además de proponerse como una herramienta viable para la anticipación de la predicción de la calidad de la producción en la industria. El hecho que cada campaña de cultivo sea distinta, supone un gran reto para las malterías, desencadenando la necesidad de disponer de herramientas y/o métodos para poderse anticipar a las necesidades de cada variedad y poder ajustar así las condiciones del malteado. Frente a esta necesidad, es importante poder extrapolar los resultados obtenidos mediante el micro-malteado al proceso industrial, por lo que los resultados obtenidos al micro-maltear cebada por medio de bolsas de malla sugieren la viabilidad de este método como herramienta de anticipación. Cabe resaltar que es un método que requiere una alta manipulación manual, por lo que pueden darse alteraciones de la calidad de la malta final y que los resultados se vean fácilmente sesgados si no se sigue exhaustivamente la metodología.

Respecto el método empleado para elaborar los mostos cerveceros, debido a que no existe un método considerado estándar, en esta Tesis ha permitido reducir a la mitad el tiempo necesario para realizar todas las elaboraciones experimentales y, a pesar de que existen ciertas discrepancias en la repetibilidad de los equipos, han resultado ser unos equipos útiles y comparables para el objetivo de este proyecto. En relación con la fermentación, la necesidad de realizar una segunda fermentación en botella con la finalidad de carbonatar las cervezas resultantes ha podido originar levadura residual en el producto e interferir en los análisis de los compuestos involucrados en el aroma y sabor. Sin duda, tal y como resaltan Bettenhausen et al. (2020), la principal dificultad es que la cerveza resulta ser una bebida compleja que se ve influenciada tanto por interacciones químicas como mecánicas, por lo que aunque el proceso se mantenga estable, se pueden llegar a obtener resultados inesperados e indeseables. Por todo ello, resulta interesante emplear la técnica *Hot Steep* para la evaluación sensorial, tal y como emplearon Morrissy et al. (2022a) y Windes et al. (2021) en sus trabajos. De esta manera se podrían llevar a cabo evaluaciones sensoriales sin interferencia de la levadura tras la fermentación.

Ciertamente, la mayoría de literatura consultada ha utilizado métodos de elaboración en planta piloto con una producción de entre 1.2-2.5 hL por elaboración (Bettenhausen et al., 2020; Bettenhausen et al., 2018) o ha llevado a cabo evaluaciones sensoriales por medio de la técnica *Hot Steep* (Morrissy et al., 2022a; Windes et al., 2021), por lo que cierta contrariedad entre los resultados obtenidos en esta Tesis y la literatura consultada podría venir dada por los equipos empleados. Definitivamente, aun siendo un producto complejo de describir sensorialmente, realizar evaluaciones sensoriales de la cerveza permite detectar posibles interferencias en las propiedades organolépticas atribuidas al proceso de elaboración y/o fermentación, ayudando así a su estudio. Así como realizar catas con paneles entrenados y

con paneles formados por consumidores habituales, puede resultar interesante para evaluar más precisamente la influencia sobre la percepción organoléptica.

Aun todo ello, se ha podido evaluar la modificación de los aminoácidos entre las muestras de mosto y cerveza tras la fermentación, así como evaluar el impacto sobre los compuestos implicados en el aroma.

Tras evaluar el impacto de la fertilización nitrogenada sobre el perfil fenólico de las muestras de cebada como sus correspondientes maltas, así como sobre el perfil de aminoácidos y compuestos aromáticos de los mostos cerveceros y cervezas, los resultados parecen mostrar un efecto importante, sobre todo sobre la cebada. Para las muestras de malta, mosto y cerveza, el efecto nitrogenado se ha visto considerablemente reducido para los genotipos estudiados, coincidiendo con lo reportado anteriormente por Moll et al. (1979), quienes consideraron las condiciones de proceso las de mayor repercusión sobre la calidad. En las cuatro fracciones estudiadas (cebada, malta, mosto y cerveza), el genotipo no ha resultado ser una variable con gran repercusión al analizar individualmente los parámetros de estudio, sin embargo, tras realizar los análisis multivariantes, sí se ha detecta un efecto genotípico significativo asociado a la variabilidad entre muestras, sobre todo en las maltas y mostos. Peculiarmente, y bajo mi punto de vista, estas dos fracciones son las que podrían tener una mayor repercusión del proceso, la malta por todas las transformaciones que suceden en el grano a lo largo del malteado y el mosto debido a la gran actividad enzimática que supone el macerado. Visto que se han realizado los análisis de varianza con las medias de análisis y con las medias entre réplicas de malteado, la variable año ha estado confundida entre las condiciones ambientales propias de cada campaña de cultivo y las condiciones de malteado. Por ello, la significancia de la variable año, no solo indicaría la influencia ambiental, sino que también la implicación del proceso sobre la variabilidad en el contenido fenólico, el contenido de aminoácidos y de compuestos aromáticos volátiles. En esta Tesis no se ha estudiado en detalle la implicación de cada etapa del malteado ni de la obtención del mosto sobre los anteriores perfiles, pero, dado los resultados obtenidos, sería interesante estudiarlo en profundidad.

Debemos tener en cuenta que el mosto cervecero no es más que un medio de cultivo que permite a la levadura absorber nutrientes para su crecimiento que, a través del metabolismo de ésta, se originan subproductos metabólicos que se depositan de nuevo en el mosto, aportando así características aromáticas a la cerveza resultante (Pires et al., 2014). Por ello, existe la creencia que cualquier cambio en la composición del mosto puede desencadenar diferentes respuestas por parte de la levadura y/o verse alterado su crecimiento, suceso que tendría una repercusión directa sobre la cerveza resultante de la fermentación (Pires et al., 2014). Cabe resaltar que en esta Tesis no se ha estudiado el contenido de azúcares ni el tipo presente en los mostos cerveceros y, aunque hay estudios que los describen por tener un papel clave durante la fermentación y producción alcohólica, otros autores como Dekoninck et al. (2012) no los consideraron compuestos implicados en la formación de alcoholes superiores. No obstante, sí se ha determinado su influencia sobre el contenido final de ésteres de etilo y diacetilo (Dekoninck et al., 2012).

Por medio de los resultados obtenidos, se ha observado que, a pesar de partir de cebadas malteadas con diferencias significativas sobre los parámetros de calidad, tras el macerado y elaboración del mosto cervecero se produce una reducción del componente genético de estas diferencias. De igual modo ocurre en las cervezas, que como se ha expuesto en el apartado 6.4 de Resultado y discusión, ha resultado ser la fracción con menor influencia de las variables estudiadas. De modo que, en vista de lo observado en las muestras estudiadas parece que, a lo largo de los procesos implicados en la elaboración de la cerveza, las diferencias entre genotipos se van equiparando y resultan en un producto final sin grandes alteraciones fisicoquímicas ni aromáticas. Teniendo en cuenta los parámetros comunes en dos o más fracciones, se ha calculado la heredabilidad (H^2) media para cada fracción estudiada, los resultados se muestran en la **Tabla 7.1** junto al error estándar de la media (SED) y su representación gráfica en la **Figura 7.1**.

Como se puede observar en la **Tabla 7.1** y en la **Figura 7.1**, la malta, con una H^2 media de 0.60, parece ser la fracción con mayor componente genético de las fracciones estudiadas. En cambio, la cerveza, con una H^2 media de 0.05, sería la fracción con menor componente genético y, por tanto, con una mayor influencia ambiental. Por otro lado, la cebada y el mosto, con valores de H^2 medios de 0.34 y 0.26 respectivamente, el bajo componente genético que presentan no se diferencia significativamente entre ambas fracciones, pero sí frente la malta y la cerveza. En otras palabras, la fracción con menor influencia genética y, por tanto, mayor influencia ambiental, parece ser la malta, diferenciándose estadísticamente de la resta de fracciones estudiadas. En la misma línea, la cerveza ha sido la fracción con menor influencia genética de todas.

Estos resultados señalan una clara ventaja a nivel de producción en cervecería, dado que las diferencias genotípicas son más importantes en la malta y no en la cerveza. Parece ser que, por la naturaleza de las etapas comprendidas en la elaboración de la cerveza, las posibles diferencias en la materia prima, que podrían tener un impacto en el perfil aromático del producto, terminan equiparándose y, al final, se obtienen cervezas con aromas similares aun partiendo de distintos genotipos cultivados en distintas zonas.

Tabla 7.1. Heredabilidad (H^2) de los parámetros comunes en dos o más fracciones, heredabilidad (H^2) media y error estándar de la media (SED) para cada fracción estudiada.

Cebada		Malta		Mosto		Cerveza	
Parámetro	H^2	Parámetro	H^2	Parámetro	H^2	Parámetro	H^2
				Amargos	0.00	Amargos	0.00
β -glucanos	0.83	β -glucanos	0.81	β -glucanos	0.68	β -glucanos	0.00
		Color	0.77	Color	0.63	Color	0.00
		FAN	0.00	FAN	0.50	FAN	0.00
		pH	0.79	pH	0.90	pH	0.77
PT	0.76	PT	0.78				
HBA	0.00	HBA	0.69				
CinA	0.34	CinA	0.70				
CouA	0.78	CouA	0.83				
CafA	0.00	CafA	0.86				
FerA	0.46	FerA	0.72				
Cat	0.00	Cat	0.19				
Olig	0.00	Olig	0.04				
Lut	0.56	Lut	0.85				
Api	0.00	Api	0.30				
				Asp	0.33	Asp	0.00
				Glu	0.67	Glu	0.00
				Ala	0.17	Ala	0.00
				Arg	0.65	Arg	0.00
				Asn	0.87	Asn	0.00
				Cis	0.83	Cis	0.00
				Fen	0.00	Fen	0.00
				Gli	0.00	Gli	0.00
				Gln	0.00	Gln	0.25
				Hip	0.00	Hip	0.00
				His	0.00	His	0.00
				Ile	0.00	Ile	0.00
				Leu	0.00	Leu	0.00
				Lis	0.00	Lis	0.00
				Met	0.00	Met	0.00
				Pro	0.00	Pro	0.00
				Ser	0.00	Ser	0.00
				Tir	0.00	Tir	0.00
				Tre	0.00	Tre	0.00
				Trp	0.52	Trp	0.25
				Val	0.00	Val	0.00
H^2 media	0.34	H^2 media	0.60	H^2 media	0.26	H^2 media	0.05
SED	0.35	SED	0.32	SED	0.34	SED	0.16

PT: proteína total; HBA: ácidos hidroxibenzoicos; CinA: ácido cinámico; CouA: ácido cumárico; CafA: ácido cafeico y derivados; FerA: ácido ferúlico y derivados; Cat: catequinas; Olig: oligómeros; Lut: luteolina y derivados; Api: apigenina y derivados; FAN: aminonitrógeno libre; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Ala: alanina; Arg: arginina; Asn: asparagina; Cis: cistina; Fen: fenilalanina; Gli: glicina; Gln: glutamina; Hip: hidroxiprolina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lis: lisina; Met: metionina; Pro: prolina; Ser: serina; Tir: tirosina; Tre: treonina; Trp: triptófano; Val: valina.

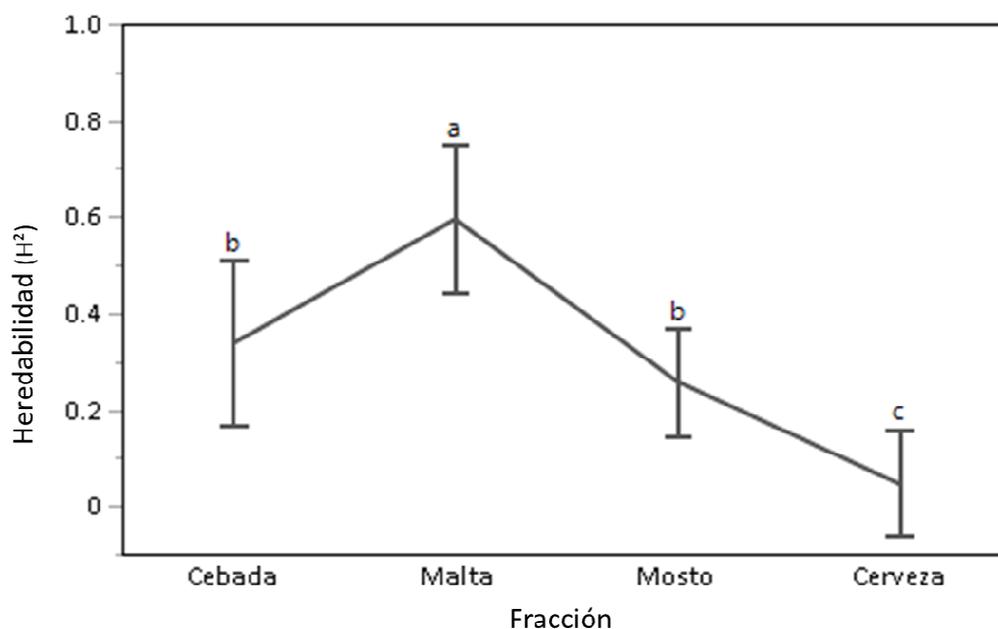


Figura 7.1. Gráfico de las medias de mínimos cuadrados de las heredabilidades por fracciones estudiadas. Se han seleccionado aquellos parámetros comunes en dos o más fracciones. Cebada: n=11; Malta: n=14; Mosto: n=26; Cerveza: n=26. Las distintas letras indican diferencias significativas entre fracciones (Tukey-Kramer HSD, $\alpha=0.05$).

Si nos centramos en el genotipo, parece tener un efecto considerablemente importante sobre la calidad de la cebada y de la malta, pero no se ha detectado en los mostos ni cervezas. Contrariamente, el año y zona de cultivo han sido dos variables que sí han mostrado un efecto tanto sobre los parámetros de calidad como sobre los compuestos implicados en el aroma de la cerveza. Aun así, dado que la variable año está sesgada por las condiciones de malteado y elaboración de la cerveza, a través de los resultados obtenidos podríamos atribuir una mayor implicación del proceso y no del genotipo y/o zona de cultivo. Estas observaciones han coincidido con las obtenidas por Guido et al. (2007), quienes tampoco observaron ninguna correlación entre los compuestos aromáticos y los parámetros de la malta en los genotipos estudiados. Una peculiaridad que cabe resaltar es el efecto significativo de la interacción entre la localidad y el genotipo, mostrando la posible diferencia en la adaptabilidad al ambiente entre las variedades estudiadas. Algo similar describieron recientemente Sayre-Chavez et al. (2022), puesto que en su estudio observaron una potencial relación entre el aroma y sabor de la cerveza con genes involucrados en la capacidad maltera de la cebada, indicando también que cada genotipo puede adaptarse de manera distinta tanto a las condiciones de malteado como frente las de elaboración de mosto y cerveza.

Así pues, los distintos genotipos de cebada incluidos en esta Tesis presentan una gran variabilidad frente al proceso de malteado, al contrario que frente a la elaboración del mosto y obtención de cerveza, procesos con un bajo componente genético, y, por ende, mayormente influenciados por las condiciones ambientales.

Por último, hay que destacar que uno de los propósitos de esta Tesis ha sido evaluar la posible existencia del concepto *terruño* en la cerveza, tal y como ya es conocido en el vino, aunque

para ello ha faltado poder evaluar sensorialmente las muestras de cerveza elaborada. Aun así, los datos y resultados incluidos en este trabajo parecen indicar que, a nivel analítico, la zona de cultivo y el manejo de este pueden tener un gran impacto sobre los parámetros de calidad de la malta final, el perfil fenólico de la cebada y malta, el perfil de aminoácidos de los mostos y cervezas y sobre los compuestos aromáticos volátiles presentes en la cerveza.

CONCLUSIONES



8. CONCLUSIONES

OBJETIVO I

- Se ha validado el método alternativo propuesto para micro-maltear por medio de bolsas de malla enterradas en lotes industriales.
- Los resultados han sido más representativos de la calidad de los lotes industriales respecto los obtenido por medio de un método de micro-malteado en planta piloto conocido y ampliamente empleado.
- No se ha detectado interacción alelopática entre los genotipos de los lotes industriales y los de las bolsas de malla.
- La calidad de la malta obtenida por medio de las bolsas de malla ha resultado ser independiente de la caja de germinación y del genotipo del lote industrial.
- Por medio del micro-malteado en bolsas de malla fue posible determinar la magnitud relativa de los efectos genotípicos y ambientales.
- Este método alternativo es una herramienta válida de predicción en la producción puesto que los hallazgos dan la posibilidad de realizar proyectos con diferentes variedades de cebada y un gran número de muestras.

OBJETIVO II

- A pesar de observar ciertas discrepancias entre los mostos elaborados por los dos equipos, se han podido identificar diferencias entre años de cultivo.
- La variabilidad entre los dos equipos PicoBrew podría atribuirse al efecto que el malteado pudo tener sobre las muestras de malta, que podría compensarse elaborando mostos con muestras patrón para conocer el rango de desviación en cada parámetro de calidad.
- Debe controlarse de forma exhaustiva tanto el proceso de elaboración como la fermentación para obtener resultados fiables. Por ello la variable repetición industrial ha sido importante en este modelo.

OBJETIVO III

- En las muestras de cebada, la variable año se ha asociado significativamente al PCA1 del análisis multivariante explicando cerca del 55% de la variabilidad entre muestras

para las diez familias fenólicas estudiadas. Asimismo, en las correspondientes maltas, su efecto significativo ha explicado un 51% de la variabilidad.

- La fertilización con nitrógeno ha resultado tener un efecto significativo sobre el perfil fenólico tanto en los genotipos de cebada como en sus correspondientes maltas.
- Contrariamente a las expectativas, para el conjunto de genotipos utilizados en esta Tesis, los efectos genotípicos fueron notablemente bajos, coincidiendo con otros trabajos consultados.
- La variabilidad en el contenido de los compuestos fenólicos puede venir dada tanto por condiciones controlables, como el manejo del cultivo y/o las condiciones de malteado, como por condiciones incontrolables, como los factores climáticos específicos del año de cultivo.
- Es importante seguir estudiando el efecto específico de las condiciones climáticas y las condiciones de cada etapa del malteado (remojo, germinación y secado-tostado) para comprender mejor los factores que influyen en la síntesis y/o degradación de los compuestos fenólicos como estrategia de producción.
- Dado el importante aumento fenólico tras el malteado, sería de gran interés evaluar la evolución de los compuestos fenólicos durante la elaboración del mosto cervecero y fermentación de éste.
- En las muestras de mosto cervecero y cerveza, la variable año ha resultado ser la de mayor impacto significativo sobre el perfil de aminoácidos y los compuestos aromáticos volátiles.
- La implicación de la fertilización nitrogenada ha sido relativamente baja en los mostos cerveceros e inexistente en las cervezas.
- El efecto del genotipo se ha dado significativamente sobre algunos parámetros analizados en los mostos, pero, tras la fermentación, no se ha detectado en las cervezas resultantes.
- Los resultados parecen indicar que, mediante los procesos enzimáticos durante la elaboración del mosto y la acción de la levadura durante la fermentación, las diferencias entre las cebadas de partida se equiparan y es posible obtener un producto final equilibrado.
- Cabe destacar la cuantía de condiciones que recoge la variable año, desde las condiciones climáticas propias de cada año de cultivo hasta las condiciones de malteado, confundándose su efecto entre condiciones controlables e incontrolables.

Por esta razón, sería interesante realizar estudios con condiciones estables de malteado entre réplicas para discernir más claramente entre el componente ambiental y el de proceso.

OBJETIVO IV

- Para los genotipos y localidades estudiadas en esta Tesis, las variables de mayor impacto han resultado ser el año y la zona de cultivo. Así como se ha determinado una alta implicación de las condiciones de proceso, tanto las involucradas en el malteado como las correspondientes a la elaboración de mosto y cerveza.
- Parece ser que el genotipo tendría una menor implicación en la calidad del producto final respecto la zona de cultivo y las condiciones del proceso de malteado y elaboración de la cerveza.
- A través de los resultados obtenidos, parece ser que, tras la elaboración de los mostos cerveceros, fermentación y maduración de la cerveza, el producto final queda compensado y se minoran las diferencias entre las muestras de materia prima.
- Se ha observado una disminución considerable del efecto significativo de todos los factores genotípicos y ambientales estudiados a lo largo de las etapas de producción desde la cebada hasta la cerveza.
- Al comparar las muestras de cebada con las muestras de malta, el componente genético aumentaba mientras el ambiental disminuía. Entre las muestras de mosto cervecero y cerveza ha ocurrido lo contrario.
- Sobre los parámetros de calidad de las cebadas y maltas, se ha dado una gran implicación del año y zona de cultivo, resultando menor importante el efecto del genotipo.
- El aumento del componente genético tras el malteado evidencia la distinta adaptabilidad y comportamiento entre las distintas variedades a las condiciones de malteado.
- Cuando la malta se procesa para obtener mosto, la significación del factor año ha disminuido considerablemente.
- Los aminoácidos han resultado verse mayormente afectados por la zona de cultivo que por el año y/o genotipo, pudiéndose atribuir a las condiciones ambientales propias de cada localidad incluida en esta Tesis.

- Parece ser que, cuanto mayor es el grado de transformación, menor es la importancia de los factores genotípicos y mayor los ambientales, puesto que se ha observado una disminución del efecto del genotipo desde la cebada hasta la cerveza, mientras que el efecto de la localidad se ha mantenido constante.
- Alguna de las interacciones del ANOVA significativas en los mostos, desaparecen en el de las cervezas.
- Los compuestos aromáticos se han visto influenciados significativamente por el año, evidenciando una implicación tanto de las condiciones ambientales como de las condiciones de proceso.

En resumen, más allá del rechazo de ciertas variedades por sus aptitudes germinativas, por parte de los malteros, o perfil aromático, por parte de los cerveceros, esta Tesis pone en manifiesto que las posibles diferencias en la materia prima según genotipo desaparecen en el producto final, facilitando la producción de estándares comerciales propios de cada marca. Por ello, parece difícil desarrollar en cervecería un modelo análogo al *terruño* propio de la vinificación.

BIBLIOGRAFÍA



9. BIBLIOGRAFÍA

- Aastrup S (1979). The effect of rain on β -glucan content in barley grains. *Carlsberg Research Communications*, 44(6), 381-393.
- AEMET OpenData - Agencia Estatal de Meteorología. Gobierno de España. Disponible en: https://www.aemet.es/es/datos_abiertos/AEMET_OpenData (10 de marzo de 2021).
- Anbessa Y & Juskiw P (2012) Review: Strategies to increase nitrogen use efficiency of Spring Barley. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(4), 617-625.
- Ang JK & Bamforth CW (2014). Foam inhibitors from specialty malts. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 193-200.
- Agu RC, Bringham TA & Brosnan JM (2012). Effect of batch-to-batch variation on the quality of laboratory and commercially malted Oxbridge Barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(1), 49-56.
- Agu RC & Palmer GH (2003). Pattern of nitrogen distribution in barley grains grown in the field. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2), 110-113.
- Almeida RB, Almeida e Silva JB, Lima UA, Assis AN & Silva DP (2004). *Cerevisia*, 29, 147-154. Citado en Fontana M & Buiatti S (2009). Amino acids in beer. En *Beer in health and disease prevention*. Academic Press, 273-284.
- Alvarez Prado S, Gallardo JM, Serrago RA, Kruk BC & Miralles DJ (2013). Comparative behavior of wheat and barley associated with field release and grain weight determination. *Field Crops Research*, 144, 28-33.
- Arigò A, Česla P, Šilarová P, Calabrò ML & Česlová L (2018). Development of extraction method for characterization of free and bonded polyphenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Czech Republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 245, 829-837.
- Aron PM & Shellhammer TH (2010). A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 369-380.
- ASBC (2016). Hot Steep Malt Sensory Evaluation Method. *ASBC Methods of Analysis*. Disponible en: <https://www.asbcnet.org/Methods> (28 de febrero de 2023).
- Atkinson JM & Bendelow VM (1976). Automated malting equipment for quality selection in barley breeding programs. *Canadian Journal of Plant Science*, 56, 1007-1010.
- Äyrápää T (1971). Biosynthetic Formation of Higher Alcohols by Yeast. Dependence on the Nitrogenous Nutrient Level of the Medium. *Journal of the Institute of Brewing*, 77, 266-276.

- Baethgen WE, Christianson CB & Lamothe AG (1995). Nitrogen fertilizer effects on growth, grain yield, and yield components of Malting Barley. *Field Crops Research*, 43(2-3), 87-99.
- Baker DL (1954). Pilot brewery design for malt research. Proceedings. *American Society of Brewing Chemists*, 12(1), 128-140.
- Bamforth CW & Kanauchi M (2001). A simple model for the cell wall of the starchy endosperm in barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(4), 235-240.
- Banasik OJ (1973). Micro-Brewing and its use in malting barley development. *Farm Research*, 23-27.
- Barnabás B, Jäger K & Fehér A (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, 31(1), 11-38.
- Barriga BP, Fuentes PR, Carrillo L & Jobet FC (1983). Heredabilidad de algunos caracteres agronómicos y morfofisiológicos en triticale hexaploide. *Agro Sur*, 11(1), 43-48.
- Bathgate BGN (1983). The relationship between malt 'friability' and wort viscosity. *Journal of the Institute of Brewing*, 89, 416-419.
- Bendelow VM (1959). Prediction of barley malting quality: A comparison of a micromalting method and barley analysis. *American Society of Brewing Chemists*, 17(1), 118-121.
- Bettenhausen HM, Barr L, Broeckling CD, Chaparro JM, Holbrook C, Sedin D & Heuberger A (2018). Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. *Food Research International*, 113, 487-504.
- Bettenhausen HM, Benson A, Fisk S, Herb D, Hernandez J, Lim J, Queisser SH, Shellhammer TH, Vega V, Yao L, Heuberger AL & Hayes P (2020). Variation in sensory attributes and volatile compounds in beers brewed from genetically distinct malts: An integrated sensory and non-targeted metabolomics approach. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(2), 136-152.
- Bettenhausen HM, Barr L, Omerigic H, Yao L & Heuberger AL (2021). Mass spectrometry metabolomics of hot steep malt extracts and association to sensory traits. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(4), 394-406.
- Bewley JD (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9(7), 1055-1066.
- Bhattacharya A, Sood P & Citovsky V (2010). The roles of Plant Phenolics in defence and communication during agrobacterium and Rhizobium infection. *Molecular Plant Pathology*.
- Boulton C & Quain D (2008). Brewing yeast and fermentation. *John Wiley & Sons*.
- Bourne DT & Wheeler RE (1982). Laboratory prediction of brewhouse extract and performance. *Journal of the Institute of Brewing*, 88, 324-328.

- Bravi E, Marconi O, Perretti G & Fantozzi P (2012). Influence of barley variety and malting process on lipid content of malt. *Food Chemistry*, 135(3), 1112-1117.
- Brányik T, Vicente AA, Dostálek P & Teixeira JA (2008). A review of flavour formation in continuous beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 3-13.
- Brennan CS, Harris N, Smith D & Shewry PR (1996). Structural differences in the mature endosperms of good and poor malting barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, 24(2), 171-177.
- Buiatti S (2009). Beer composition: An overview. *Beer in health and disease prevention*, 213-225.
- Burkhart BA, Dickson AD & Hunt WN (1953). A pilot brewing comparison of commercial and laboratory malts. *American Society of Brewing Chemists*, 11(1), 34-45.
- Burkhart BA, Ottis OJ & Dickson AD (1960). A Micro Brewery for the Early Quality Evaluation of Hybrid Barley Selections. *American Society of Brewing Chemists*, 123.
- Bustos-Korts D, Romagosa I, Borràs-Gelonch G, Casas AM, Slafer GA & Eeuwijk F (2018). Genotype by Environment Interaction and Adaptation en *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*, Springer, 1-44.
- Bvochora J, Danner H, Miyafuji H, Braun R & Zvauya R (2005). Variation of sorghum phenolic compounds during the preparation of opaque beer. *Process Biochemistry*. 40(3-4), 1207-1213.
- Cai S, Han Z, Huang Y, Chen Z, Zhang G & Dai F (2015). Genetic Diversity of Individual Phenolic Acids in Barley and Their Correlation with Barley Malt Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 7051-7057.
- Calderini DF & Dreccer MF (2003). Choosing Genotype, Sowing Date and Plant Density for Malting Barley. En Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL & Romagosa I (Ed.), *Barley science: Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and Quality*, 413-443.
- Campbell GL, Rosnagel BG, Classen HL & Thacker PA (1989). Genotypic and environmental differences in extract viscosity of barley and their relationship to its nutritive value for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 26(3-4), 221-230.
- Carvalho DO, Curto AF & Guido LF (2015). Determination of phenolic content in different barley varieties and corresponding malts by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Antioxidants*, 4(3), 563-576.
- Carvalho DO, Gonçalves L & Guido L (2016). Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 927-943.

- Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Grossi M, Valè G & Stanca AM (2003). Genetic Bases of Barley Physiological Response to Stressful Conditions. En Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL & Romagosa I (Ed.), *Barley science: Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and Quality*, 307-360.
- Chandra GS, Proudlove MO & Baxter ED (1999). The structure of barley endosperm—an important determinant of malt modification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(1), 37-46.
- Charalambous G (1981). Involatile constituents of Beer. En *Brewing Science*, J.R.A. Pollock, ed: London, Academic Press, 2, 167-254
- Chenu K (2015). Characterizing the crop environment – nature, significance and applications. En Sadras VO & Calderini DF (Ed.), *Crop Physiology*, segunda ed. Academic Press, San Diego, 321-348.
- Cohen S & Kennedy J (2010). Plant Metabolism and the Environment: Implications for Managing Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(7), 620-643.
- Cozzolino D & Degner S (2016). An overview on the role of lipids and fatty acids in barley grain and their products during Beer Brewing. *Food Research International*, 81, 114-121.
- Day FE (1956). Small Scale Brewing in the Laboratory. *Journal of the Institute of Brewing*, 62, 107.
- Decouard B, Bailly M, Rigault M, Marmagne A, Arkoun M, Soulay F, Caius J, Roux CPL, Louahlia A, Jacquard C, Esmaeel Q, Chardon F, Masclaux-Daubresse C & Dellagi A (2022). Genotypic variation of nitrogen use efficiency and amino acid metabolism in Barley. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Dekoninck TM, Verbelen PJ, Delvaux F, Van Mulders SE & Delvaux FR (2012). The importance of wort composition for yeast metabolism during accelerated brewery fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(3), 195-204.
- Díaz AB, Durán-Guerrero E, Lasanta C & Castro R (2022). From the Raw Materials to the Bottled Product: Influence of the Entire Production Process on the Organoleptic Profile of Industrial Beers. *Foods*, 11(20), 3215.
- Dicko MH, Gruppen H, Traoré AS, van Berkel WJ & Voragen AG (2005). Evaluation of the effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activities in sorghum varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2581-2588.
- Dickson AD & Burkhart BA (1956). Evaluation of barley varieties for malting quality. *American Society of Brewing Chemists*, 14(1), 143-155.
- Dietel HW (1965). Kleinmalzungs und Kleinbrauversuche mit neuen Gerstensorten. *Brauwissenschaft*, 18:48.

- Dong L, Hou Y, Li F, Piao Y, Zhang X, Zhang X, Li C & Zhao C (2015). Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 915-921.
- Dvořáková M, Guido LF, Dostálek P, Skulilová Z, Moreira MM & Barros AA (2008a). Antioxidant properties of free, soluble ester and insoluble-bound phenolic compounds in different barley varieties and corresponding malts. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 27-33.
- Dvořáková M, Douanier M, Jurková M, Kellner V & Dostálek P (2008b). Comparison of antioxidant activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts with the content of free phenolic compounds measured by high performance liquid chromatography coupled with CoulArray detector. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(2), 150-159.
- Eagles HA, Bedggood AG, Panozzo JF & Martin PJ (1995). Cultivar and environmental effects on malting quality in Barley. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46(5), 831-844.
- Edney MJ, O'Donovan JT, Turkington TK, Clayton GW, McKenzie R, Juskiw P, Lafond GP, Brandt S, Grant CA, Harker KN, Johnson E & May W (2012). Effects of seeding rate, nitrogen rate and cultivar on Barley Malt Quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(13), 2672-2678.
- Engert N, John A, Henning W & Honermeier B (2012). Effect of Sprouting on the Concentration of Phenolic Acids and Antioxidative Capacity in Wheat Cultivars (*Triticum Aestivum* Ssp. *Aestivum* L.) in Dependency of Nitrogen Fertilization. *Journal of Applied Botany Food Quality*, 84(1), 111.
- Evans DE, Goldsmith M, Redd KS, Nischwitz R & Lentini, A (2012). Impact of mashing conditions on extract, its fermentability, and the levels of wort free amino nitrogen (FAN), β -glucan, and lipids. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(1), 39-49.
- Evers T & Millar S (2002). Cereal Grain Structure and development: Some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, 36(3), 261-284.
- Fernandez-Orozco R, Li L, Harflett C, Shewry PR & Ward JL (2010). Effects of environment and genotype on phenolic acids in wheat in the HEALTHGRAIN diversity screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9341-9352.
- Ferreira I & Guido L (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A Review. *Fermentation*, 4(2), 23.
- Fincher GB (2011). Biochemistry, physiology, and genetics of endosperm mobilization in germinated barley grain. En *Barley, production, improvement, and uses*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell SE. Ullrich, 449-477.
- Fitzsimons JW & Kneen E (1954). Influence of malt modification on pilot brewing. *American Society of Brewing Chemists*, 12(1), 31-44.

- Fix G (2000). *Principles of Brewing science: A Study of Serious Brewing Issues*. Brewers Publications, CO, USA, 99-100.
- Fontana M & Buiatti S (2009). Amino acids in beer. En *Beer in health and disease prevention*. Academic Press, 273-284.
- Fox GP, Osborne B, Bowman J, Kelly A, Cakir M, Poulsen D, Inkerman A & Henry R (2007). Measurement of genetic and environmental variation in barley (*Hordeum vulgare*) grain hardness. *Journal of Cereal Science*, 46, 82-92.
- Fox GP (2010). Chemical composition in barley grains and malt quality. *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*, 63-98.
- Frank T, Scholz B, Peter S & Engel KH (2011). Metabolite profiling of barley: Influence of the malting process. *Food Chemistry*, 124(3), 948-957.
- Gallardo E, De Schutter DP, Zamora R, Derdelinckx G, Delvaux FR & Hidalgo FJ (2008). Influence of lipids in the generation of phenylacetaldehyde in wort-related model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3155-3159.
- Gamel T & Abdel-Aal E-SM (2012). Phenolic acids and antioxidant properties of barley wholegrain and pearling fractions. *Agricultural and Food Science*, 21(2), 118-131.
- Gammoh S, Alu'datt MH, Alhamad MN, Rababah T, Al-Mahasneh M, Qasaimeh A, Johargy A, Kubow S & Hussein NM (2018). The effects of protein-phenolic interactions in wheat protein fractions on allergenicity, antioxidant activity and the inhibitory activity of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Food Bioscience*, 24, 50-55.
- Gastl M, Kupetz M & Becker T (2020). Determination of cytolytic malt modification – part I: Influence of variety characteristics. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(1), 53-65.
- Gibson B, Vidgren V, Peddinti G & Krogerus K (2018). Diacetyl control during brewery fermentation via adaptive laboratory engineering of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(12), 1103-1112.
- Gómez BG & Edney MJ (2011). A high maltose broth method for studying effects of amino acids on fermentability. *Journal of American Society of Brewing Chemistry*, 69(3), 127-132.
- Gordon R, Power A, Chapman J, Chandra S & Cozzolino D (2018a). A review on the source of lipids and their interactions during beer fermentation that affect beer quality. *Fermentation*, 4(4), 89.
- Gordon R, Chapman J, Power A, Chandra S, Roberts J & Cozzolino D (2018b). Comparison of ultrasound-assisted extraction with static extraction as pre-processing method before gas chromatography analysis of cereal lipids. *Food Analytical Methods*, 11, 3276-3281.

- Gorzolka K, Kölling J, Nattkemper TW & Niehaus K (2016) Spatio-Temporal Metabolite Profiling of the Barley Germination Process by MALDI MS Imaging. *PLoS ONE*, 11(3).
- Gothard PG, Morgan AG & Smith DB (1980a). Evaluation of a micro-malting procedure used to aid a plant breeding programme. *Journal of the Institute of Brewing*, 86, 69-73.
- Gothard PG, Clark MJ & Gordon AC (1980b). The effect of modification period upon the ability of a micro-malting procedure to select barleys for malting quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 86, 299-301.
- Goupy P, Hugues M, Boivin P & Amiot MJ (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1625-1634.
- Guido LF, Rodrigues PG, Rodrigues JA, Gonçalves CR & Barros AA (2004). The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chemistry*, 87(2), 187-193.
- Guido LF, Curto AF, Boivin P, Benismail N, Gonçalves CR & Barros AA (2007). Correlation of malt quality parameters and beer flavor stability: multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 728-33.
- Guo X, Sarup P, Jensen JD, Orabi J, Kristensen NH, Mulder FA, Jahoor A & Jensen J (2020). Genetic variance of metabolomic features and their relationship with malting quality traits in spring barley. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Gupta M, Abu-Ghannam N & Gallagher E (2010). Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 318-328.
- Gutiérrez Osnaya LJ (2019). Influencia del proceso de germinación sobre los cambios microestructurales del almidón de cebada. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de ciencias agropecuarias. Repositorio de la UAEH Biblioteca digital.
- Halstead M, Morrissy C, Fisk S, Fox G, Hayes P & Carrijo D (2022). Barley grain protein is influenced by genotype, environment, and Nitrogen Management and is the major driver of Malting Quality. *Crop Science*, 63(1), 115-127.
- Hammond JRM (1993). The yeasts: yeast technology. *Academic*, London, (5), 8-67.
- Harrison TJ & Rowlands H (1932). Laboratory malting equipment. *Journal of the Institute of Brewing*, 38, 502-508.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam M, Roychowdhury R & Fujita M (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643-9684.

- Haslemore RM, Tunnicliffe CG, Slack CR & Shaw S (1985). An automated micro-malting unit for quality assessment in a barley breeding programme. *Journal of the Institute of Brewing*, 91, 101-105.
- Hayes PM, Corey AE, Mundt C, Toojinda T & Vivar H (2003). Registration of 'tango' barley. *Crop Science*, 43(2), 729-731.
- He Y, Dong J, Yin H, Zhao Y, Chen R, Wan X, Chen P, Hou X, Liu J & Chen L (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and Ester Formation of beer - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163.
- Heggart HM, Margaritis A, Pilkington H, Stewart RJ, Dowhanick M & Russell I (1999). Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *Technical Quarterly of Master Brewers Association of the Americas*, 36, 383-406.
- Henderson J & Brooks A (2010). Improved amino acid methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 columns for a variety of Agilent LC instrumentation and separation goals. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-4547EN.pdf> (4 de enero de 2023).
- Henry RJ & McLean BT (1984). Effect of sample size on the micro-malting of barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 767-772.
- Herb D, Filichkin T, Fisk S, Helgerson L, Hayes P, Meints B, Jennings R, Monsour R, Tynan S, Vinkemeier K, Romagosa I, Moscou M, Carey D, Thiel R, Cistue L, Martens C & Thomas W (2017a) Effects of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Variety and Growing Environment on Beer Flavor. *Journal of American Society of Brewing Chemistry*, 75(4), 345-353.
- Herb D, Filichkin T, Fisk S, Helgerson L, Hayes P, Benson A, Vega V, Carey D, Thiel R, Cistue L, Jennings R, Monsour R, Tynan S, Vinkemeier K, Li Y, Nguygen A, Onio A, Meints B, Moscou M, Romagosa I & Thomas W (2017b). Malt modification and its effects on the contributions of barley genotype to beer flavor. *Journal of American Society of Brewing Chemistry*, 75(4), 354-362.
- Hernanz D, Nuñez V, Sancho AI, Faulds CB, Williamson G, Bartolomé B & Gómez-Cordovés C (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4884-4888.
- Hirst MB & Richter CL (2016). Review of Aroma Formation through metabolic pathways of *saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(4), 361-370.
- Horvat D, Šimić G, Drezner G, Lalić A, Ledenčan T, Tucak M, Plavšić H, Andrić L & Zdunić Z (2020). Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activity of Major Cereal Crops. *Antioxidants*, 9(6), 527.
- Hough JS, Briggs DE & Stevens R (1971). *Malting and brewing science*. London: Chapman and Hall Ltd, 36-536.

- Hong Y, Ni S-J & Zhang G-P (2020). Transcriptome and metabolome analysis reveals regulatory networks and key genes controlling barley malting quality in responses to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 152, 1-11.
- Hong Y & Zhang GP (2020). The influence of drought stress on malt quality traits of the wild and cultivated barleys. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(8), 2009-2015.
- Howard K, Gayler K, Eagles H & Halloran G (1996). The relationship between D hordein and malting quality in barley. *Journal of Cereal Science*, 24, 47-53.
- Huerta Zurita R, Zamora Díaz MR, Solano Hernández S & López Cano ML (2018). Friabilidad de malta y predicción de calidad en el mejoramiento genético de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(4), 577-590.
- Igartua E, Hayes PM, Thomas WTB, Meyer R & Mather DE (2002). Genetic control of quantitative grain and malt quality traits in barley. *Journal of Crop Production*, 5(1-2), 131-164.
- Inns EL, Buggie LA, Booer C, Nursten HE & Ames JM (2011). Effect of modification of the kilning regimen on levels of free ferulic acid and antioxidant activity in Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9335-9343.
- Ivor LMc (2019). The role of gibberellin in germination of barley (15.2.3): CIE A Level Biology Revision notes. Disponible en: <https://www.savemyexams.co.uk/a-level/biology/cie/19/revision-notes/15-control--coordination/15-2-control--coordination-in-plants/15-2-3-the-role-of-gibberellin-in-germination-of-barley/> (20 de noviembre de 2022).
- Iyuke S, Madigoe E & Maponya R (2008). The Effect of Hydroxycinnamic Acids and Volatile Phenols on Beer Quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(4), 300-305.
- James N & Stahl U (2014). Amino Acid Permeases and their Influence on Flavour Compounds in Beer. *BrewingScience*, 67, 120-127.
- Jenner CF (1994). Starch synthesis in the kernel of wheat under high temperature conditions. *Functional Plant Biology*, 21, 791-806.
- Jones M & Pierce JS (1964). Absorption of amino acids from wort by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 70, 307-315.
- Jongberg S, Andersen ML & Lund MN (2020). Characterisation of protein-polyphenol interactions in beer during forced aging. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(4), 371-381.
- Joshi R (2018). Role of enzymes in seed germination. *International Journal of Creative Research Thoughts*, 6(2), 1481-1485.
- Kneen E (1955). *Brewers' Digest*, 30(5), 53. Citado en Banasik OJ (1973). Micro-Brewing and its use in malting barley development. *Farm Research*, 23-27.

- Kobayashi N, Kaneda H, Kano Y & Koshino S (1993). The production of linoleic and linolenic acid hydroperoxides during mashing. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(5), 371-375.
- Kremer RJ & Ben-Hammouda M (2009). Allelopathic Plants. 19. Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Allelopathy Journal*, 24(2), 225-242.
- Krogerus K & Gibson BR (2013). Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2, 3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6919-6930.
- Kuczyńska A, Cardenia V, Ogradowicz P, Kempa M, Rodriguez-Estrada MT & Mikołajczak K (2019). Effects of multiple abiotic stresses on lipids and sterols profile in barley leaves (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 215-224.
- Kunze W & Manger Hans-Jürgen (2006). Tecnología para cerveceros y malteros. Berlin: *VLB Berlin*, 35-55; 110-196.
- Laidig F, Piepho H-P, Rentel D, Drobek T & Meyer U (2017). Breeding progress, genotypic and environmental variation and correlation of quality traits in malting barley in German official variety trials between 1983 and 2015. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(11), 2411-2429.
- Lentz M (2018). The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*, 4(1), 20.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW & Feeney PJ (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26.
- Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC & Brooks M (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*- the main character in Beer Brewing. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1018-1036.
- Loviso CL & Libkind D (2018). Síntesis y Regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la Levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436-446.
- Loviso CL & Libkind D (2019). Síntesis y Regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la Levadura en la cerveza: Alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386-397.
- Lu J, Zhao H, Chen J, Fan W, Dong J, Kong W, Sun J, Cao Y & Cai G (2007). Evolution of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity during Malting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10994-11001.
- Luck G, Liao H, Murray NJ, Grimmer HR, Warminski EE, Williamson MP, Lilley TH & Haslam E (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37(2), 357-371.

- Ma D, Sun D, Li Y, Wang C, Xie Y & Guo T (2014). Effect of nitrogen fertilisation and irrigation on phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of winter wheat grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1039-1046.
- Maillard M & Berset C (1995). Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1789-1793.
- Marconi O, Sileoni V, Sensidoni M, Amigo Rubio JM, Perretti G & Fantozzi P (2011). Influence of barley variety, timing of nitrogen fertilisation and Sunn Pest infestation on malting and brewing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 820-830.
- Martínez M, Motilva M, López de las Hazas M, Romero M, Vaculova K & Ludwig I (2018). Phytochemical composition and β -glucan content of barley genotypes from two different geographic origins for human health food production. *Food Chemistry*, 245, 61-70.
- Martínez-Subirà M, Romero MP, Moralejo M, Macià A, Puig E, Savin R & Romagosa I (2021a). Post-anthesis thermal stress induces differential accumulation of bioactive compounds in field-grown barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(15), 6496-6504.
- Martínez-Subirà M, Moralejo M, Puig E, Romero MP, Savin R & Romagosa I (2021b). Impact of rising temperature in the deposition patterns of bioactive compounds in field grown food barley grains. *Plants*, 10(3), 598.
- McMillan T, Tidemann BD, O'Donovan JT & Izydorczyk MS (2020). Effects of plant growth regulator application on the malting quality of Barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 2082-2089.
- Meilgaard MC (1976). Wort composition: with special reference to the use of adjuncts. *Master Brewers Association of the Americas*, 13(2), 78-90.
- Meilgaard MC, Dalgliesh CE & Clapperton JF (1979). Beer flavour terminology. *Journal of the Institute of Brewing*, 85(1), 38-42.
- Mikyška A, Hrabák M, Hašková D & Šrogl J (2002). The Role of Malt and Hop Polyphenols in Beer Quality, Flavour and Haze Stability. *Journal of the Institute of Brewing*. 108(1), 78-85.
- Miralles DJ, Abeledo LG, Alvarez Prado S, Chenu K, Serrago RA & Savin R (2021). Barley. En *Crop physiology. Case histories for major crops*. London: Academic Press in an imprint of Elsevier. 165-195.
- Molina-Cano JL (1989). LA CEBADA. Morfología, fisiología, genética, agronomía y usos industriales. España: Ediciones Mundi-Prensa.

- Molina-Cano JL, Ramo T, Ellis RP, Swanston HB, Uribe-Echeverria T & Perez-Vendrell AM (1995). Effect of grain composition on water uptake by malting barley: A genetic and environmental study. *Journal of the Institute of Brewing*, 101(2), 79-83.
- Moll M, Flayeux R & Bastin M (1979). Relationships between barley, malt, and beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37(1), 25-9.
- Moll M, Flayeux R & Carnielo M (1982). New methods for the evaluation of barley and malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 40(4), 155-158.
- Montanari L, Mayer H, Marconi O & Fantozzi P (2009). Minerals in beer. En *Beer in health and disease prevention*. Academic Press, 359-365.
- Morrissy CP, Féchir M, Bettenhausen HM, Van Simaey KR, Fisk S, Hernandez J, Mathias K, Benson A, Shellhammer T & Hayes P (2022a). Continued exploration of barley genotype contribution to base malt and beer flavor through the evaluation of Lines Sharing Maris Otter® parentage. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 80(3), 201-214.
- Morrissy CP, Halstead MA, Féchir M, Carrizo D, Fisk SP, Johnson V, Bettenhausen HM, Shellhammer TH & Hayes PM (2022b). Barley Variety and Growing Location Provide Nuanced Contributions to Beer Flavor Using Elite Germplasm in Commercial-Type Malts and Beers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1-12.
- Mpofu A, Sapirstein HD & Beta T (2006). Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1265-1270.
- Muñoz-Amatriaín M, Cuesta-Marcos A, Endelman JB, Comadran J, Bonman JM, Bockelman HE, Chao S, Russell J, Waugh R, Hayes PM & Muehlbauer GJ (2014). The USDA Barley Core Collection: Genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies. *PLoS ONE*, 9(4).
- Narwal S, Kumar D & Verma RP (2016). Effect of genotype, environment and malting on the antioxidant activity and phenolic content of Indian Barley. *Journal of Food Biochemistry*, 40(1), 91-99.
- Nie C, Wang C, Zhou G, Dou F & Huang M (2010). Effects of malting conditions on the amino acid compositions of final malt. *African Journal of Biotechnology*, 9(53), 9018-9025.
- Noël S, Liégeois C, Lermusieau G, Bodart E, Badot C & Collin S (1999). Release of Deuterated Nonenal during Beer Aging from Labeled Precursors Synthesized in the Boiling Kettle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4323-4326.
- Olaniran AO, Hiralal L, Mokoena MP & Pillay B (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: Production, regulation and Control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13-23.

- Orallo (2013). Rueda de Sabores y aromas de la cerveza. *El Rincón del Cervecerero*. Disponible en: <https://elrincondelcervecero.com/rueda-sabor-aroma-cerveza/> (28 de febrero de 2023).
- Orús A (2022a). Principales Países Productores de Cebada en el Mundo, Statista. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/1124490/principales-paises-productores-de-cebada-en-el-mundo/> (14 de noviembre de 2022).
- Orús A (2022b). Extensión de cultivo de cebada en la Unión Europea por país en 2020, Statista. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/1124423/superficie-cultivada-cebada-paises-union-europea/> (14 de noviembre de 2022).
- Oscarsson M, Andersson R, Åman P, Olofsson S & Jonsson A (1998). Effects of cultivar, nitrogen fertilization rate and environment on yield and grain quality of barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), 359-366.
- Özcan MM, Aljuhaimi F & Uslu N (2018). Effect of malt process steps on bioactive properties and fatty acid composition of barley, green malt and malt grains. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 226-232.
- Ozdal T, Capanoglu E & Altay F (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970.
- Parker JH & Lejeune AJ (1956). Prospects for new and improved varieties of Malting Barley. *American Society of Brewing Chemists*, 14(1), 70-76.
- Passarella VS, Savin R, Abeledo LG & Slafer GA (2003). Malting quality as affected by Barley Breeding (1944–1998) in Argentina. *Euphytica*, 134(2), 161-167.
- Paynter BH & Harasymow SE (2010). Variation in grain β -glucan due to site, cultivar and nitrogen fertiliser in Western Australia. *Crop and Pasture Science*, 61(12), 1017.
- Pejin J, Grujić O, Čanadanović-Brunet J, Vujić Đ & Tumbas V (2009). Investigation of Phenolic Acids Content and Antioxidant Activity in Malt Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 67(2), 81-88.
- Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T & Vicente AA (2014). Yeast: The soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937-1949.
- Pollock JRA (1981). *Brewing Science*. Academic Press, New York, 2, 121-157.
- Poreda A, Bijak M, Zdaniewicz M, Jakubowski M & Makarewicz M (2015). Effect of wheat malt on the concentration of metal ions in wort and brewhouse by-products. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(2), 224-230.
- Procopio S, Qian F & Becker T (2011). Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*, 233(5), 721-729.

- Prystupa P, Bergh R, Ferraris G, Loewy T, Ventimiglia L, Gutierrez Boem FH & Couretot L (2008). Fertilización nitrogenada y azufrada en cebada cervecera cv. Scarlett. *Informaciones Agronómicas*, 38, 5-11.
- Przulj N, Momcilovic V, Simic J & Miroslavjevic M (2014). Effect of growing season and variety on quality of spring two-rowed barley. *Genetika*, 46(1), 59-73.
- Rao S, Schwarz LJ, Santhakumar AB, Chinkwo KA & Blanchard CL (2018). Cereal phenolic contents as affected by variety and environment. *Cereal Chemistry*, 95(5), 589-602.
- Ramo T (1991). *Influencia de la variedad de cebada, de su abonado nitrogenado y de la adición de ácido giberélico durante el proceso de malteado, sobre la calidad de la malta para cerveza* (Tesis de doctorado no publicada). Universidad Politécnica de Catalunya, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Lerida.
- Romagosa I & Fox PN (1993). Genotype × environment interaction and adaptation. In: Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I., Cerezo, M. (eds) Plant Breeding. *Plant Breeding Series*. Springer, Dordrecht, 373-390.
- Rutger JN, Schaller CW, Dickson AD & Williams JC (1966). Variation and covariation in agronomic and malting quality characters in barley I. Heritability estimates. *Crop Science*, 6, 231-234.
- Saerens SM, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM & Delvaux FR (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454-461.
- Savin R & Nicolas ME (1996). Effects of short periods of drought and high temperature on grain growth and starch accumulation of two malting barley cultivars. *Functional Plant Biology*, 23(2), 201.
- Savin R, Stone PJ, Nicolas ME & Wardlaw IF (1997a). Grain growth and malting quality of barley. 1. Effects of heat stress and moderately high temperature. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48(5), 615-624.
- Savin R, Stone PJ, Nicolas ME & Wardlaw IF (1997b). Grain growth and malting quality of barley. 2. Effects of temperature regime before heat stress. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48(5), 625-634.
- Savin R & Molina-Cano JL (2003). Changes in Malting Quality and Its Determinants in Response to Abiotic Stresses. En Slafer GA, Molina-Cano JL, Savin R, Araus JL & Romagosa I (Ed.), *Barley science: Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and Quality*, 523-550.
- Savin R, Cossani CM, Dahan R, Ayad JY, Albrizio R, Todorovic M, Karrou M & Slafer GA (2022). Intensifying cereal management in dryland Mediterranean agriculture: Rainfed wheat and barley responses to nitrogen fertilisation. *European Journal of Agronomy*, 137, 126518.

- Sandegren E (1951). European Brewery Convention (Brighton), 228. Citado en Äyrápáá T (1971). Biosynthetic Formation of Higher Alcohols by Yeast. Dependence on the Nitrogenous Nutrient Level of the Medium. *Journal of the Institute of Brewing*, 77, 266-276.
- SARGA - Sociedad Aragonesa de Gestión Agroambiental S.L.U. Disponible en: <http://www.sarga.es/> (10 de marzo de 2021).
- Sayre-Chavez B, Bettenhausen H, Windes S, Aron P, Cistué L, Fisk S, Helgerson L, Heuberger AL, Tynan S & Hayes P (2022). Genetic basis of barley contributions to beer flavor. *Journal of Cereal Science*, 104, 103430.
- Schwarz P & Li Y (2011). Malting and brewing uses of barley. En *Barley, production, improvement, and uses*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell SE. Ullrich, 478-493.
- Schmitt M & Budde A (2011). Malting extremely small quantities of barley. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(4), 191-199.
- Sfat MR & Mohr WH (1956). Master Brewers. *American Communications Association*, 17(3,4), 4.
- Sharma R & Verma R (2010). Effect of irrigation, nitrogen and varieties on the productivity and grain malting quality in Barley. *Cereal Research Communications*, 38(3), 419-428.
- Shrestha RK & Lindsey LE (2019). Agronomic management of malting barley and research needs to meet demand by the Craft Brew Industry. *Agronomy Journal*, 111(4), 1570-1780.
- Skendi A & Papageorgiou M (2018). Influence of kilning temperature on chemical composition of a greek barley malt and its wort properties. *Millenium*, 2, 49-58.
- Slafer GA & Rawson HM (1994). Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors. A re-examination of some assumptions made by physiologists and modelers. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21, 393-426.
- Stuart I, Loi L & Fincher G (1988). Varietal and environmental variations in (1-3,1-4)- β -glucan levels and (1-3,1-4)- β -glucanase potential in barley: Relationships to malting quality. *Journal of Cereal Science*, 7(1), 61-71.
- Stewart S, Sanders R, Ivanova N, Wilkinson KL, Stewart DC, Dong J, Hu S, Evans DE & Able JA (2022). The influence of malt variety and origin on Wort flavor. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1-17.
- Stone, P. J., & Savin, R. (1999). Grain quality and its physiological determinants. En Satorre EH & Slafer GA (Ed.), *Wheat: Ecology and physiology of yield determination*. Food Product Press, 85-120.

- Swanston JS & Taylor K (1990). The effects of different steeping regimes on water uptake, germination rate, milling energy and hot water extract. *Journal of the Institute of Brewing*, 96(1), 3-6.
- Swanston JS, Newton AC, Hoad SP & Spoor W (2006). Variation across environments in patterns of water uptake and endosperm modification in barley varieties and variety mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(5), 826-833.
- Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, Kanamori H, Kawasaki S & Takeda K (2008). Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 4062-4067.
- Thompson-Witrick KA & Pitts E (2020). Nitrogen content in craft malts: Effects on total ester concentration in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(4), 308-313.
- Tian W, Wilson T, Chen G, Guttieri M, Nelson N, Fritz A, Smith G & Li Y (2021). Effects of environment, nitrogen, and sulfur on total phenolic content and phenolic acid composition of winter wheat grain. *Cereal Chemistry*, 98(4), 903-911.
- Titica M, Landaud S, Trelea IC, Latrille E, Corrieu G & Cheruy A (2000). Modeling of the kinetics of higher alcohol and ester production based on CO₂ Emission with a view to control of beer flavor by temperature and top pressure. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58(4), 167-174.
- Truelsen E (1987). Chemical composition of barley varieties with different nutrient supplies IV. Concentration of nitrogen, amide and amino acids in two-year experiments. *Danish Reseach Service fos Plant and Soil Science*, 91, 255-262.
- Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H & Derdelinckx G (2006). The chemistry of beer aging—a critical review. *Food Chemistry*, 95(3), 357-381.
- Venkateshwar M, Chaitanya K, Altaf M, Mahammad EJ, Hameeda B & Reddy G (2010). Influence of micronutrients on yeast growth and β-D-fructofuranosidase production. *Indian Journal of Microbiology*, 50, 325-331.
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour J-P, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS & Delvaux FR (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110-118.
- Vesely P, Duncombe D, Lusk L, Basarova G, Seabrooks J & Ryder D (2004). *Technical Quartely Master Brewers Association*, 41, 282-292.
- Wainwright T (1971). *Proceedings of the EBC Congress*, Estoril, Portugal, 437. Citado en Fontana M & Buiatti S (2009). Amino acids in beer. En *Beer in health and disease prevention*. Academic Press, 273-284.

- Walters M, Heasman A & Hughes P (1997). Comparison of (+)-Catechin and Ferulic Acid as Natural Antioxidants and Their Impact on Beer Flavor Stability. Part 1: Forced-Aging. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55(2), 83-89.
- Wang J, Chen J, Dai F, Wu FB, Yang JM & Zhang GP (2007). Protein fractions in barley grains as affected by some agronomic factors and their relationships to malt quality. *Cereal Research Communications*, 35(1), 129-140.
- Wannenmacher J, Gastl M & Becker T (2018). Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and Beer Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 953-988.
- Wei K, Dai F, Wu F & Zhang G (2009). The variation of β -amylase activity and protein fractions in barley grains as affected by genotypes and post-anthesis temperatures. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(3), 208-213.
- Whitmore ET & Sparrow DHB (1957). Laboratory micro-malting technique. *Journal of the Institute of Brewing*, 63, 397-398.
- W indes S, Bettenhausen HM, Simaey s KR, Clawson J, Fisk S, Heuberger AL, Lim J, Queisser SH, Shellhammer TH & Hayes P (2020). Comprehensive analysis of different contemporary barley genotypes enhances and expands the scope of barley contributions to beer flavor. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(3), 281-305.
- Woffenden H, Ames J & Chandra S (2001). Relationships between Antioxidant Activity, Color, and Flavor Compounds of Crystal Malt Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11):5524-5530.
- Yang B & Schwarz PB (1998). Application of Nitrogen-Purging of Malt Extracts to Measure Two Dimethylsulfide Precursors by Headspace Gas Chromatography. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56(3), 81-84.
- Younis OS & Stewart GG (1998). Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 104(5), 255-264.
- Youssef MKE, El-Fishawy FA, Ramadan ESAEN & El-Rahman AM (2012). Assessment of total lipid fractions and fatty acids composition in raw, germinated barleys and talbina products. *Food and Public Health*, 2(1), 16-23.
- Zadoks JC, Chang TT & Konzak CF (1974). A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research*. 14, 415-421.
- Zhao H, Fan W, Dong J, Lu J, Chen J, Shan L, Lin Y & Kong W (2008). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*, 107(1), 296-304.

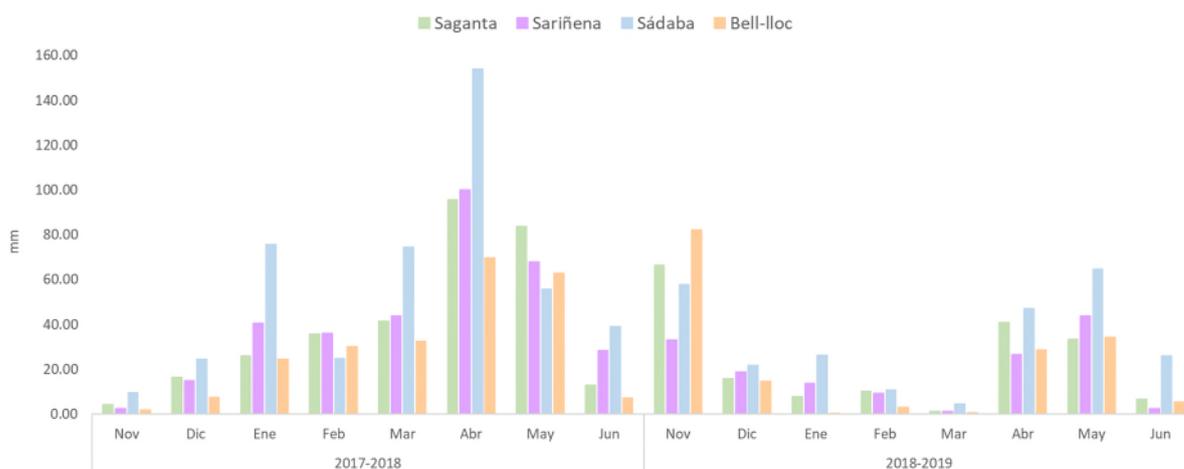
- Zhao H & Zhao M (2011). Effects of mashing on total phenolic contents and antioxidant activities of malts and worts. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), 240-247.
- Zhou B, Jin Z, Schwarz P & Li Y (2020). Impact of genotype, environment, and malting conditions on the antioxidant activity and phenolic content in US malting barley. *Fermentation*, 6(2), 48.

ANEJO



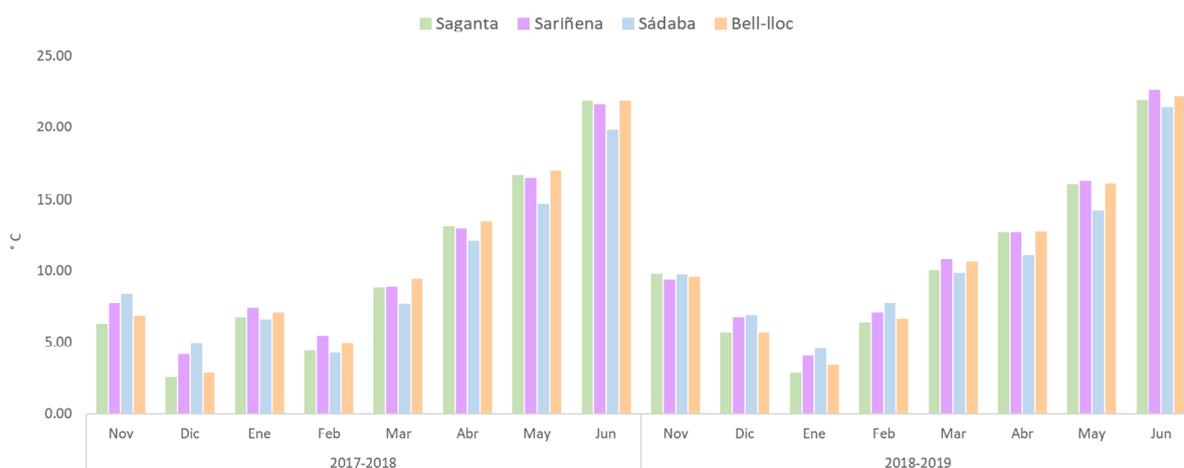
10. ANEJO

Figura 10.1. Precipitación mensual durante los meses de cosecha en las cuatro zonas de cultivo para ambos años estudiados.



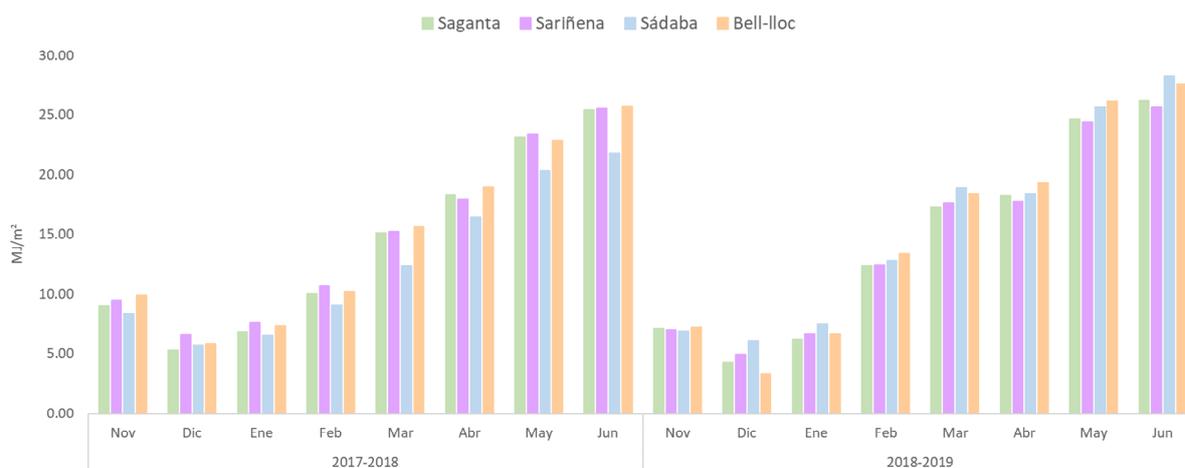
Nov: noviembre; Dic: diciembre; Ene: enero; Feb: febrero; Mar: marzo; Abr: abril; May: mayo; Jun: junio.

Figura 10.2. Temperatura media mensual durante los meses de cosecha en las cuatro zonas de cultivo para ambos años estudiados.



Nov: noviembre; Dic: diciembre; Ene: enero; Feb: febrero; Mar: marzo; Abr: abril; May: mayo; Jun: junio.

Figura 10.3. Radiación media mensual durante los meses de cosecha en las cuatro zonas de cultivo para ambos años estudiados.



Nov: noviembre; Dic: diciembre; Ene: enero; Feb: febrero; Mar: marzo; Abr: abril; May: mayo; Jun: junio.

Small Mesh-Bags within Industrial Malting Batches as a Simple Non-Expensive Alternative Micro-Malting Technique

Neus Prieto-Diez, Tomás Ramo, Ignacio Romagosa & María-Paz Romero

To cite this article: Neus Prieto-Diez, Tomás Ramo, Ignacio Romagosa & María-Paz Romero (2022): Small Mesh-Bags within Industrial Malting Batches as a Simple Non-Expensive Alternative Micro-Malting Technique, Journal of the American Society of Brewing Chemists, DOI: [10.1080/03610470.2022.2052784](https://doi.org/10.1080/03610470.2022.2052784)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/03610470.2022.2052784>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 18 Apr 2022.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)



Small Mesh-Bags within Industrial Malting Batches as a Simple Non-Expensive Alternative Micro-Malting Technique

Neus Prieto-Diez^a , Tomás Ramo^{a,b} , Ignacio Romagosa^{b,c}  and María-Paz Romero^{b,c} 

^aAltería La Moravia, Damm Group, Lleida, Spain; ^bUniversity of Lleida, Lleida, Spain; ^cAGROTECNIO Center, Lleida, Spain

ABSTRACT

In malting and brewing, early assessment of small batches of barley is of great interest. Thus, micro-malting methods on a laboratory scale are needed in order to determine the potential quality of raw materials, particularly of new advanced barley genotypes or registered varieties grown under alternative environmental conditions, as well as for countless R&D projects. However, the applicability of laboratory-scale results to industry is often poor and the necessary equipment expensive. The aim of this experiment was to validate and optimize a simple alternative micro-malting mesh-bag-based method to be more representative of the industrial quality than other micro-malting based methods. Comparing the new alternative method on the laboratory and industrial scale, it was observed that, in absolute terms, the quality of the malt obtained through standard micro-malting laboratory equipment is overrated compared with that obtained through the other two methods. Furthermore, the relative malt quality through the mesh-bag was closer to the industrial sample quality. There were no significant statistical allelopathic interactions between alternative bagged genotypes and genotypes used in the commercial batches. Through this alternative micro-malting method, there is the possibility to study the varietal and environmental effects on the malt quality. This alternative micro-malting bag scale was inexpensive, easy to implement, safe, and more representative of actual industrial scale data.

KEYWORDS

Genotype × environment interaction; malt quality; malting process; micro-malting

Introduction

Carrying out the malting process industrially is a challenge, because each lot of any variety grown under different environmental conditions is unique. To be able to evaluate the quality of any potential malting barley genotype before using it on an industrial scale is very important to avoid wasting many tons of product. That is why micro-malting methods have been implemented, consisting of malting very small amounts of raw material (from hundreds of g to a few kg) on a laboratory scale.^[1,2] Micro-malting started more than 100 hundred years ago, but the validity of the results was not generally accepted until after the middle of the last century when micro-malting trials, carried out to assess new barley genotypes, began to appear.^[3] Such was the impact of this technique that equipment was developed to automate the micro-malting process and increase the sample capacity.^[1,4-6] Several drawbacks to micro-malting on the laboratory scale were detected, such as the unfeasibility of accurately reproducing the industrial process^[1,7] or the low repeatability between the different samples, quite often associated with their actual physical position within the micro-malting equipment.^[6] Thus, although the results obtained were in principle thought to be satisfactory, repeatability on an industrial scale was not.^[1,2,6,8]

The need to identify new varieties of malting barley, to optimize new cultivation techniques, to investigate the quality of barley from different cultivation areas is increasing every day. Gothard et al.^[9,10] used the micro-malting technique to detect varietal differences and to evaluate the effect of malting time on the malt quality. Swanston and Taylor^[11] studied the effect of steeping regimes on water uptake and germination rates. Numerous other studies have evaluated the micro-malting technique with a range of sample sizes.^[2,11,12] However, many of these studies were not evaluated with industrial batches and too often their results were questionable if the final goal was to extrapolate to an industrial scale.

The main goal of this study was to assess, validate, and optimize a micro-malting method based on burying small mesh-bags in commercial germination boxes, with the goal of emulating the industrial scale and obtaining better predictive ability than using standard micro-malting laboratory equipment. Different combinations of genotypes in small mesh-bags malted within sets of commercial malt boxes were analyzed to compare the relative malting attributes of micro-malted and industrial malts and to rule out any allelopathic interactions. Furthermore, a large set of alternative standard malting genotypes grown in different year × location combinations were used to determine their genetic and

environmental variability in order to assess the statistical repeatability of this new method and to compare the absolute and relative means of the commercial industrial malt quality parameters for each barley variety with those obtained by this alternative micro-malting technique.

Experimental

Experiment one

Three alternative malting procedures using commercial grain samples from three barley varieties (Pewter, Shakira, and Shuffle) were studied. Before malting, all the samples were checked for moisture, total protein, and total starch (with a FOSS Infratec™ 1241 Grain Analyser) and germinative capacity (EBC Method 3.5.1). The alternative malting procedures consisted of (1) a standard micro-malting laboratory procedure, (2) industrial scale, and (3) a proposed alternative micro-malting mesh-bag method. The malting conditions for each procedure were as follows.

Micro-malting equipment: One hundred grams of barley grain were malted under pilot scale conditions. These were 26h of steeping at 15° C with up to 42% of moisture (11-h wet steep, 2-h dry step, 7-h wet step, 2-h dry step, 2-h wet step and 2-h dry step), germinating for 5 days at 15° C, kilning for 24h (3h at 50° C, 16h at 60° C, 2h at 68° C, 3h at 88° C), and deculmed by hand.

Industrial equipment: The industrial steeping conditions were 16h at 15° C (6-h wet step, 9-h dry step, 1-h wet step). Germination and kilning were conducted in Saladin boxes. The germination lasted 5 days at 15° C and kilning 21.5h (1h at 50° C, 3h at 55° C, 11h at 62° C, 2h at 65°

C, 2h at 72° C, 2.5h at 85° C). The malts were deculmed by friction and screened with a Schmidt-Seeger MES63-400 separator.

Mesh-bags in industrial equipment: Three kilograms of barley grain were placed in 42×60 cm polyethylene monofil golden yellow bags with knotted drawstrings. These samples were malted in triplicate. As shown in [Figure 1](#), the mesh-bags were hung in the conical steeping tank with the commercial batch and then buried in the germination box, following the industrial scale pattern explained above. To discard potential interactions with the commercial lots, the experiment was carried out in three industrial boxes. Each of the boxes contained a different variety (Pewter, Shakira, or Shuffle). Each repetition was buried in a different random position, as shown in [Figure 2](#), according to a Latin-square design. Deculming was conducted by hand.

All the malted samples were analyzed for pH, boiled wort color (EBC), extract (%), total protein (%), soluble protein (%), Kolbach index (EBC), diastatic power (WK/dm), FAN (ppm), and viscosity (mPa/s). Friability (%) was only analyzed for the industrial and bag malt samples. All the analyses were performed according to standard EBC methods.^[13] The samples were ground in a Bugler-Miah DLFU mill with a gap between the grinding discs of 0.2 mm and the Congress wort was made according to the EBC Method 4.5.1.

Experiment two

Six malting barley varieties (Basic, Pewter, Planet, Shakira, Shuffle, Traveler), grown at five locations and in two different years (2018 and 2019) were used for a large-scale validation of the proposed micro-malting method. The grain

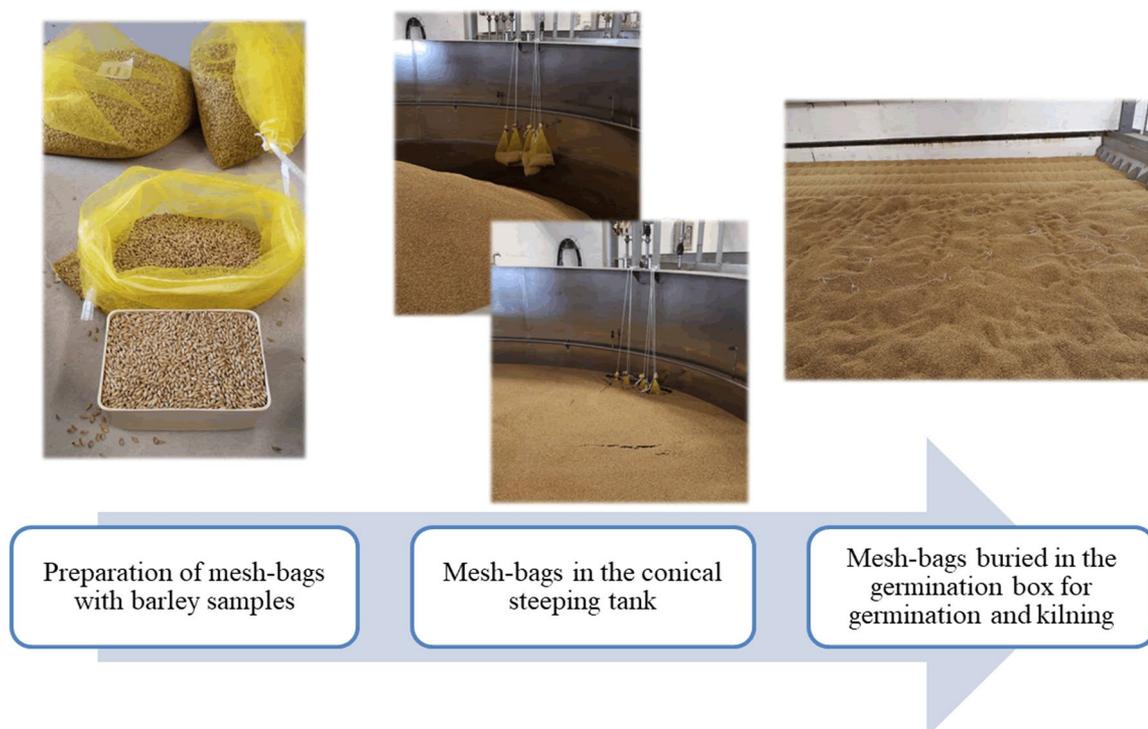


Figure 1. Micro-malting made in mesh-bags on industrial facilities.

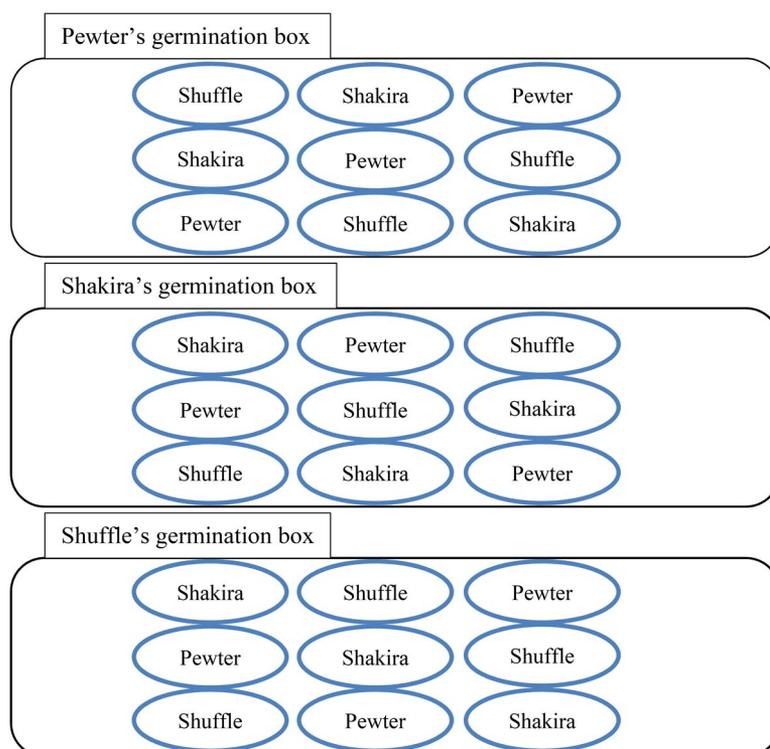


Figure 2. 3×3 Latin squares used within each of three commercial germination boxes in Experiment one.

samples were checked for moisture, total protein, and germinative capacity before being used. All the analyses were performed according to standard EBC Methods.^[13]

In 2018, the micro-malts were placed in the following industrial process: 18 h of steeping at 15° C (4-h wet step, 13-h dry step, 1-h wet step), germination lasted for 99 h at 18° C and kilning 21.5 h (1 h at 50° C, 3 h at 55° C, 11 h at 62° C, 2 h at 65° C, 2 h at 72° C, 2.5 h at 85° C). In 2019, steeping took 20 h at 15° C (4-h wet step, 15-h dry step, 1-h wet step), germination lasted 112 h at 18° C, and kilning 21.5 h (1 h at 50° C, 3 h at 55° C, 11 h at 62° C, 2 h at 65° C, 2 h at 72° C, 2.5 h at 85° C). The malt samples were deculmed by friction with a Schmidt-Seeger MES63-400 separator. For this experiment, four kilograms of barley grain was put into in mesh-bags and then placed inside the industrial boxes, as shown in Figure 1. Malting was conducted in triplicate. Each repetition was buried randomly and in a different germination box according to a split plot design, with genotypes as the main plots and the environment as subplots. Deculming was conducted by hand.

All the malted samples were analyzed for pH, boiled wort color (EBC), extract (%), friability (%), total protein (%), soluble protein (%), Kolbach index (EBC), diastatic power (WK/dm), FAN (ppm), and viscosity (mPa/s). All the analyses were performed according to standard EBC Methods.^[13] The samples were ground in a Bugler-Miah DLFU mill with a gap of 0.2 mm between grinding discs and the Congress wort was made according to EBC Method 4.5.1.

The average data from the malting house database were used as reference values for each parameter and genotype.

Statistical analyses

All statistical analyses were conducted with JMP®Pro15 (SAS Institute Inc., Cary NC). Differences between treatments were assessed by analysis of variance (ANOVA) and through sets of statistical contrasts. Given the large number of variables to analyze and in order to limit Type-I Errors, p -values < 0.01 were required for statistical significance. The results for each variable are presented as the mean value ± Standard Error of the Difference (SED). In Experiment one, all factors were considered fixed. In Experiment two, the environment (location×year combinations) and its interaction with the genotypes were considered random.

Results and discussion

Supplementary Table S1 presents the results (means and standard error of the difference) of the quality parameters of the three genotypes malted inside mesh-bags processed in each of the industrial boxes. Table 1 shows the p -values for the analyses of variance in Experiment one and the statistical results for the interaction analysis between the genotype in the bag and the germination box and the position of the bag in the box. It was important to determine the possibility of allelopathic interaction^[14] within bags and industrial genotypes because the bags were buried in the industrial batches. It was also important not to have allelopathic interactions that could jeopardize the malting process in the micro-malted samples.

There were no significant allelopathic interaction for any of the malt quality parameters analyzed in this work.

Table 1. The *p*-values for the analyses of variance for malt quality parameters in Experiment one.

Source	dF	TP	Extract	Viscosity	SP	KI	FAN	DP	Friability	pH	BC
X position	2	0.5763	0.4807	0.1574	0.0471	0.0425	0.2832	0.0096	0.2051	0.9393	0.2859
Y position	2	0.3712	0.3333	0.8514	0.7572	0.7155	0.9192	0.0092	0.8130	0.9930	0.3138
Genotype in mesh-bag	2	0.2753	0.0867	0.0017	<0.0001	0.0001	0.1041	<0.0001	<0.0001	0.0185	0.3227
Industrial genotype	2	0.2392	0.3082	0.5365	0.7001	0.4637	0.9922	0.8798	0.0116	0.4024	0.1646
Interaction	4	0.4869	0.7977	0.537	0.6558	0.4376	0.5511	0.2116	0.7266	0.9206	0.5726

X and Y: effect of bag position in the industrial batch;

Industrial genotype: Potential influence of the genotype in the commercial malting box on the bagged genotype;

Interaction: Genotype in mesh-bag × industrial genotype;

dF: degrees of freedom; TP: total protein; SP: soluble protein; KI: Kolbach index; FAN: free amino nitrogen;

DP: diastatic power; BC: boiled wort color.

Regarding where the bag was buried in the germination box, it was observed that the only significant effect on the malt quality parameters studied in this work (Table 1) was in DP. This could be due to the structure of the germination box. There are some areas where the barley could be somewhat more humid during germination and this could accelerate the growth of the root and the grain metabolic process, producing more amylase enzymes.^[15] It might also have been due to being subjected to a slightly higher temperature during germination.^[16]

Table 1 shows that the new micro-malting bag scale method could detect significant differences between genotypes for a number of parameters, such as viscosity, KI, and DP, without any interaction between the genotype in mesh-bag and the one in the industrial boxes, thus validating this alternative micro-malting method. Furthermore, the detailed comparisons between data generated by the three malting methods provides additional support for this new micro-malting method.

The mean values and statistical analysis for the quality parameters of industrial, bag, and laboratory scale malts are presented in Supplementary Table S2. The laboratory scale showed slightly higher values for the extract, SP, KI, FAN, pH, and BC for all the genotypes. Henry and McLean^[12] considered the extract to be the most important parameter for brewing, as it represents the yield of substrates for fermentation in brewing. In our work, a higher extract was observed on the laboratory scale than on the industrial or bag malting scales. The laboratory scale overestimated this parameter. For TP, the laboratory and bag scales were significantly different from the industrial one. Regarding viscosity, the micro-bag scale was significantly different from the other two malting types showing the lowest results (Supplementary Table S2). In brewing, other parameters (e.g., FAN for yeast nutrition, DP for enzyme generation, and friability) are also important. For these, it appeared that the laboratory scale overestimated the FAN results and underestimated the DP results compared to the industrial scale (Supplementary Table S2).

Table 2 presents the contrast analysis between the three malting types that complements the previous results. It can

be seen that malt quality obtained from the industrial scale presented less significant differences with the micro-malting bag scale than with the laboratory scale.

Comparing the alternative micro-malting bag scale with the industrial scale, significant differences were observed for the TP, friability, and viscosity values (Table 2). As for differences observed for TP and friability, these parameters are indirectly related, the higher the protein content, the lower the friability and the higher the viscosity and WG.^[17] In the case of viscosity, Skendi and Papageorgiou^[18] observed a reduction in viscosity when the kilning temperature increased. In our results, viscosity was lower on the micro-malting bag scale (Supplementary Table S2), which could be due to the fact that the bags were buried near the surface of the germination box and the samples were exposed to higher temperatures. Bathgate^[19] observed an indirectly proportional relationship between friability and viscosity; the higher the friability, the lower the viscosity. This was also reflected in our malt samples (Supplementary Table S2).

When comparing the micro-malting bag and laboratory scales, significant differences were observed in the samples for the extract, viscosity, SP, KI, FAN, pH, and BC values (Table 2). If the industrial and laboratory scales are compared, there were significant differences in the extract, SP, KI, FAN, pH, and BC results (Table 2). Overall, the quality of the malt obtained through the laboratory scale was worse than the malt from the other malting types.

Figure 3 shows the Principal Component Analysis (PCA) results of the malt quality parameters for the three types of maltings and genotypes, where the first two axes explain about 91.61% of the total variance. PC1 explains about 75% of the total variability and it clearly discriminates between the malting methods, that is, the laboratory versus the industrial and mesh-bag scales. Figure 3 shows that the industrial and mesh-bag methods gave similar results, while the laboratory scale was on the opposite side. Furthermore, a clear difference in the malt quality was observed, especially for the extract, viscosity, SP, KI, FAN, and BC parameters, which were seen to be overestimated in the laboratory micro-malting method compared with the micro-malting bag scale in Experiment one. PC2 explained about 16% of

Table 2. The *p*-values for contrast analysis between the three malting types for malt quality parameters in Experiment one.

Contrast	TP	Extract	Viscosity	SP	KI	FAN	DP	Friability	pH	BC
Industrial vs Bag scale	<0.0001	0.1595	<0.0001	0.0342	0.8269	0.0296	0.8043	0.0100	0.9570	0.9879
Industrial vs. Laboratory	0.0197	<0.0001	0.5433	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2659	0.0002	<0.0001	<0.0001
Bag scale vs. Laboratory	0.8251	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.3212	<0.0001	<0.0001	<0.0001

TP: total protein; SP: soluble protein; KI: Kolbach index; FAN: free amino nitrogen; DP: diastatic power; BC: boiled wort color.

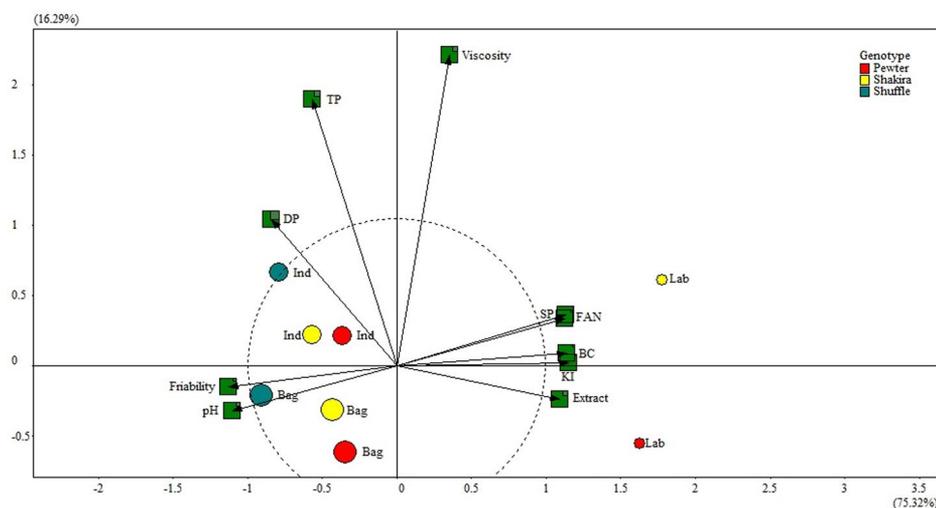


Figure 3. Principal Component Analysis (PCA) results of quality malt parameters for the three types of malting and genotypes in Experiment one. The color of the circles identifies the genotype.

Table 3. Repeatability and random variance component estimates on malt samples of six genotypes and five environments in Experiment two.

Random effect	TP	Extract	Viscosity	SP	KI	FAN	DP	Friability	pH	BC
H ²	0.38	0.59	0.56	0.91	0.76	0.77	0.84	0.31	0.83	0.81
Genotype	0.19	0.29	0.00	0.13	7.28	106.27	881.20	8.37	0.00	0.34
Environment	3.04	1.85	0.01	0.11	19.56	136.79	1055.11	161.93	0.01	0.63
Genotype × Environment	0.34*	0.51*	0.00	0.02	0.96	-62.50	129.86	-3.04	0.00	-0.07
Residual	0.13	0.36	0.00	0.04	5.67	354.63	1200.15	53.02	0.00	0.35

H²: repeatability; TP: total protein; SP: soluble protein; KI: Kolbach index; FAN: free amino nitrogen; DP: diastatic power; BC: boiled wort color. *: *p*-value < 0.01.

the total variability between the genotypes studied and it is relatively independent of the malting method and mainly driven by differences in viscosity and the TP between samples. Overall, Figure 3 showed that the relative varietal profiles were the same, particularly for the industrial and mesh-bag malting methods.

Experiment two was aimed at separating the environmental from the genotypic effects. For this, six different genotypes were used (three already used in Experiment one and three new ones) and these were grown in five different locations and over two years. For this, the broad sense heritability (H²), also called repeatability, was estimated. This indicates the relative importance of genotypic versus environmental effects for each parameter.^[20] Table 3 shows the magnitude of the G, E, and G × E variance components according to a random model and their corresponding broad heritability estimates only for the malt samples malted with the micro-malting bag scale method. The genetic component was particularly relevant for SP, KI, FAN, DP, pH, and BC with an H² of 0.91, 0.76, 0.77, 0.84, 0.83, and 0.81,

respectively. These malt quality parameters for the samples showed a low environmental influence, as Rutger et al.^[20] and Eagles et al.^[21] had demonstrated. For extract and viscosity, the results were 0.59 and 0.56, respectively. Thus, one can consider a similar environmental and genotypic effect. For the parameters TP and friability, the heritability was 0.38 and 0.31, respectively. This suggests a high environmental influence. By means of this result, the micro-malting bag scale procedure proposal could be considered valid. The new alternative micro-malting method allows one to detect differences between malts from different barley genotypes and crop locations.

Table 4 shows the statistical comparison between the average genotypic values for the alternative micro-malting bag scale and those of a large set of commercial batches for the same genotypes, carried out at the same period as the micro bag malts. It was observed that the micro-malting bag scale allowed one to detect a significant varietal effect (*p*-value < 0.01) on the malt quality parameters, such as SP, KI, FAN, DP, and BC, but without having a significant

Table 4. Significance of genotype and genotype × malting type (industrial versus bag scale) variance components for malt quality parameters using likelihood ratio (χ²).

Random term	TP		Extract		Viscosity		SP		KI		FAN		DP		Friability		pH		BC	
	χ ²	<i>p</i> -value																		
Genotype	4.42	0.04	3.27	0.07	2.62	0.11	19.86	<0.0001	14.65	0.0001	13.88	0.0002	12.86	0.0003	1.50	0.22	0.08	0.78	6.52	0.01
Genotype × Type	0.08	0.78	0.16	0.69	0.52	0.47	0.92	0.34	1.04	0.31	0.06	0.81	2.14	0.14	0.01	0.92	1.32	0.25	0.72	0.40

TP: total protein; SP: soluble protein; KI: Kolbach index; FAN: free amino nitrogen; DP: diastatic power; BC: boiled wort color.

Genotype×Type interaction effect for any of the parameters studied. This indicates that this alternative micro-malting method was reliable and safe, given the minimal quantities of grain within the commercial boxes (a few kg versus 200 t in our case). It does not interfere with the quality of the industrial batches.

Conclusions

Upon validation of this alternative micro-malting mesh-bag method buried in industrial batches, the findings showed that this method produces reliable malt samples, which are more representative of industrial malt quality than most currently used micro-malting methods on the laboratory scale. Moreover, in this work, the possibility of allelopathic interaction between genotypes in the bags with genotypes in the industrial germination boxes was analyzed and the results were negative. This indicates that the results of this alternative micro-malting bag method are independent of the genotype in the commercial germinating box. By means of the micro-malting procedure, the relative magnitude of the genotypic and environmental effects on malt quality parameters was determined. No relevant genotype×malting type interaction was detected. These findings open a way to carry out projects with different genotypes and barley varieties and to obtain more industrially applicable results.

Acknowledgments

This study was supported by the Generalitat de Catalunya under the Industrial Doctorate Project number 201892. In addition, the authors are grateful to Malteria la Moravia (Bell-lloc, Lleida, Catalonia, Spain) for providing the facilities to carry out the work and to Ramon Camarasa S.L. (Baldellou, Huesca, Spain), Cooperativa Los Monegros (Sariñena, Huesca, Spain), Roxana Savin (Agrotecnio, Lleida, Spain) and Ernesto Igartua (Aula Dei Exp. Station, CSIC, Zaragoza, Spain) for providing the plant material grown at their regular resting sites.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

ORCID

Tomás Ramo  <http://orcid.org/0000-0001-5967-1173>
 Neus Prieto  <http://orcid.org/0000-0002-3405-490X>
 Ignacio Romagosa  <http://orcid.org/0000-0001-6676-2196>
 María-Paz Romero  <http://orcid.org/0000-0001-9892-4874>

Literature cited

- [1] Harrison, T. J.; Rowlands, H. Laboratory Malting Equipment. *J. Inst. Brew.* **1932**, *38*, 502–508. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1932.tb05426.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1932.tb05426.x).
- [2] Schmitt, M.; Budde, A. Malting Extremely Small Quantities of Barley. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2011**, *69*, 191–199. DOI: [10.1094/ASBCJ-2011-0728-01](https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0728-01).
- [3] Banasik, O. J. Micro-Brewing and Its Use in Malting Barley Development. *Farm Res.* **1973**, *4*, 23–27.
- [4] Atkinson, J. M.; Bendelow, V. M. Automated Malting Equipment for Quality Selection in Barley Breeding Programs. *Can. J. Plant Sci.* **1976**, *56*, 1007–1010. DOI: [10.4141/cjps76-171](https://doi.org/10.4141/cjps76-171).
- [5] Bendelow, V. M. Prediction of Barley Malting Quality: A Comparison of a Micromalting Method and Barley Analysis. *Ann. Meet. Am. Soc. Brew. Chem.* **1959**, *17*, 118–121. DOI: [10.1080/00960845.1959.12006869](https://doi.org/10.1080/00960845.1959.12006869).
- [6] Haslemore, R. M.; Tunnicliffe, C. G.; Slack, C. R.; Shaw, S. An Automated Micro-Malting Unit for Quality Assessment in a Barley Breeding Programme. *J. Inst. Brew.* **1985**, *91*, 101–105. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1985.tb04313.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1985.tb04313.x).
- [7] Whitmore, E. T.; Sparrow, D. H. B.; Whitmore, E. T.; Sparrow, D. H. B. Laboratory Micro-Malting Technique. *J. Inst. Brew.* **1957**, *63*, 397–398. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1957.tb06277.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1957.tb06277.x).
- [8] Bourne, D. T.; Wheeler, R. E. Laboratory Prediction of Brewhouse Extract and Performance. *J. Inst. Brew.* **1982**, *88*, 324–328. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1982.tb04118.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1982.tb04118.x).
- [9] Gothard, P. G.; Morgan, A. G.; Smith, D. B. Evaluation of a Micro-Malting Procedure Used to Aid a Plant Breeding Programme. *J. Inst. Brew.* **1980**, *86*, 69–73. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1980.tb03960.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1980.tb03960.x).
- [10] Gothard, P. G.; Clark, M. J.; Gordon, A. C. The Effect of Modification Period upon the Ability of a Micro-Malting Procedure to Select Barleys for Malting Quality. *J. Inst. Brew.* **1980**, *86*, 299–301. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1980.tb06886.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1980.tb06886.x).
- [11] Swanston, J. S.; Taylor, K. The Effects of Different Steeping Regimes on Water Uptake, Germination Rate, Milling Energy and Hot Water Extract. *J. Inst. Brew.* **1990**, *96*, 3–6. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1990.tb01009.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1990.tb01009.x).
- [12] Henry, R. J.; McLean, B. T. Effect of Sample Size on the Micro-Malting of Barley. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 767–772. DOI: [10.1002/jsfa.2740350713](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350713).
- [13] Analytica-EBC. EBC-Analysis-Committee Eds. **1998**, Nurnberg, Germany: Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag.
- [14] Kremer, R. J.; Ben-Hammouda, M. Allelopathic Plants. 19. Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Allelopathy J.* **2009**, *24*, 225–242.
- [15] Joshi, R. Role of Enzymes in Seed Germination. *Int. J. Creat. Res. Thought.* **2018**, *6*, 1481–1485.
- [16] Hough, J. S.; Briggs, D. E.; Stevens, R. The Biochemistry of Malting. In: *Malting and Brewing Science*. Chapman and Hall: London, **1971**; pp 54–106
- [17] Huerta Zurita, R.; Zamora Díaz, M. R.; Solano Hernández, S.; López Cano, M. L.; Friabilidad de malta y Predicción de Calidad en el Mejoramiento Genético de Cebada Maltera (*Hordeum vulgare* L.). *Remexca.* **2018**, *5*, 577–590. DOI: [10.29312/remexca.v5i4.920](https://doi.org/10.29312/remexca.v5i4.920).
- [18] Skendi, A.; Papageorgiou, M. Influence of Kilning Temperature on Chemical Composition of a Greek Barley Malt and Its Wort Properties. *Mill.* **2018**, *2*, 49–58. DOI: [10.29352/mill0207.04.00202](https://doi.org/10.29352/mill0207.04.00202).
- [19] Bathgate, B. G. N. The Relationship between Malt ‘friability’ and Wort Viscosity. *J. Inst. Brew.* **1983**, *89*, 416–419. DOI: [10.1002/j.2050-0416.1983.tb04217.x](https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1983.tb04217.x).
- [20] Rutger, J. N.; Schaller, C. W.; Dickson, A. D.; Williams, J. C. Variation and Covariation in Agronomic and Malting Quality Characters in Barley I. Heritability Estimates. *Crop Sci.* **1966**, *6*, 231–234. DOI: [10.2135/cropsci1966.0011183X000600030004x](https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183X000600030004x).
- [21] Eagles, H. A.; Bedgood, A. G.; Panozzo, J. F.; Martin, P. J. Cultivar and Environmental Effects on Malting Quality in Barley. *Aust. J. Agric. Res.* **1995**, *46*, 831–844. DOI: [10.1071/AR950831](https://doi.org/10.1071/AR950831).