



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



**FACULTAD DE  
CIENCIAS**



**“Cerveza artesanal: innovaciones biotecnológicas en cervecería  
y sobre su impacto en la microbiota y salud intestinal”**

**MAGALY RODRÍGUEZ SAAVEDRA**

**Tesis doctoral**

Octubre 2021

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



**“Cerveza artesanal: innovaciones biotecnológicas en cervecería  
y sobre su impacto en la microbiota y salud intestinal”**

Memoria presentada por:

**MAGALY RODRÍGUEZ SAAVEDRA**

Para optar al grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

Directoras:

**DRA. MARÍA VICTORIA MORENO-ARRIBAS**

**DRA. DOLORES GONZÁLEZ DE LLANO**

Madrid, octubre del 2021

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**







**M. VICTORIA MORENO ARRIBAS, INVESTIGADORA CIENTÍFICA DEL CSIC y DOLORES GONZÁLEZ DE LLANO, CIENTIFICA TITULAR DEL CSIC, EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN,**

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada: **“Cerveza artesanal: innovaciones biotecnológicas en cervecería y sobre su impacto en la microbiota y salud intestinal”**, que presenta D<sup>a</sup>. Magaly Rodríguez Saavedra para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, UAM-CSIC), y como directoras de la misma autorizan su presentación.

Madrid, 27 de octubre de 2021



Este trabajo ha sido financiado por:



**Ministerio de Ciencia e Innovación**

**Del Gobierno de España**

Proyecto Retos de Investigación  
PID2019-108851RB-C21



**Ministerio de Educación de la**

**República de Perú**

Beca a la Excelencia Académica:  
"Presidente de la República"

Entidades colaboradoras:



Consultoría cervecera **Brewworkers**





## AGRADECIMIENTOS

A las doctoras María Victoria Moreno-Arribas y Dra. Dolores González de Llano; Vivi y Loly, respectivamente, directoras de esta Tesis Doctoral, e investigadoras del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM).

A Vivi, por estar siempre dispuesta a recibir con las puertas abiertas a muchos estudiantes extranjeros que vienen a este hermoso país, España, en busca de experiencias científicas enriquecedoras; por la confianza que depositó en mí durante estos 3 años dedicados a la realización de este trabajo, por darme autonomía en la realización de diversas actividades de mi tesis, por darme la oportunidad de formar parte de diversas actividades de divulgación que fueron muy gratificantes para mí y por la gestión realizada para la obtención de financiación a través del Proyecto Retos de Investigación: PID2019-108851RB-C21.

A Loly, por sus consejos, por su entrega y dedicación en la revisión de mis trabajos escritos, por estar siempre allí cuando la necesitaba, por darme ánimos de seguir adelante, por su confianza en mis propuestas de trabajo, por escucharme y entenderme en momentos difíciles, por ser de las personas en las que puedes decirle directamente las cosas con total confianza, sin temor, y sabiendo de antemano que te dará un consejo en base a su experiencia y lo mejor, que es siempre acertada. Gran parte de mi tesis te lo debo a ti y espero haber estado a la altura de una doctoranda, como la que tú mereces.

A mis alumnos de TFG y TFM, Karla Morato, Celia García, Karla Pérez y Guillermo Minatti y a mis compañeros del grupo de Biotecnología Enológica Aplicada (BEA) del CIAL del que he sido parte, a Irene Gil, Irene Z, Alba T., Iris P., María P., Celia C., Natalia M., Raquel D. y a Diego T., por el compañerismo y porque de alguna manera contribuyeron con mi trabajo.

A mis colegas cerveceros, a David Castro, a los *beer sommeliers* John y Yann de Brewworkers y en especial al cervecero casero Tomás Benito, a todos ellos por haberme apoyado incondicionalmente en todas mis consultas e inquietudes y en la elaboración y cata de las cervezas.

Al expresidente Ollanta Humala, por su gran aporte a la comunidad científica y a la educación peruana, por haber cumplido su promesa de implementar el Programa de Becas “Presidente de la República”, en el Perú.

Y con broche de oro, a mi familia, en especial a mi hijo Sebastián y a mi madre Lidia Lucila, por haberme apoyado siempre en realizar mis pasiones como la investigación científica y por seguir apoyándome en mis nuevos proyectos.



*“No perdáis la curiosidad, haceos preguntas... y  
mantened el rumbo sin importar cuán sinuoso  
pueda ser el camino por delante”*

*Katalin Karikó*

Pionera en el desarrollo de vacunas de ARN frente a la COVID19



*A mis padres, Lidia y Mauricio;  
y a mi hijo Sebastián David*



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AB</b>	Aminas biógenas
<b>ABV</b>	Alcohol por volumen
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ASBC</b>	<i>American Society of Brewing Chemists</i>
<b>ASV</b>	<i>Amplicon Sequence Variants</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BAL</b>	Bacterias ácido-lácticas
<b>BJCP</b>	<i>Beer Judge Certification Program</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>B/F</b>	Ratio Bacteroidetes / Firmicutes
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CIP</b>	<i>Cleaning in Place</i>
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EBC</b>	<i>European Brewery Convention</i>
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>FAN</b>	amino nitrógeno libre
<b>GC-ToF-MS</b>	<i>Gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry</i>
<b>G/NG</b>	Crecimiento/Sin crecimiento
<b>hL</b>	Hectolitros
<b>IDB</b>	Digerido intestinal de cerveza
<b>mg GAE</b>	mg equivalentes de ácido gálico
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa
<b>IBU</b>	Unidades internacionales de amargor
<b>IPA</b>	Indian Pale Ale
<b>IS</b>	Control interno de PCR
<b>MALDI-TOF MS</b>	<i>Matrix-Assisted-Laser Desorption / Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
<b>MRS</b>	Medio de cultivo de Man Rogosa Sharpe



<b>MRSm</b>	Medio de cultivo de Man Rogosa Sharpe modificado
<b>MYGP</b>	Medio de cultivo <i>Malt yeast glucose peptone</i>
<b>NAMB</b>	Bebida sin alcohol a base de malta
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<b>NMDS</b>	Escalamiento multidimensional no métrico
<b>OIV</b>	Organización Internacional de la Viña y el Vino
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>POF</b>	<i>Phenolic off-flavor</i>
<b>RLB</b>	Regresión logística binaria
<b>simgi®</b>	SIMulador GastroIntestinal dinámico
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>VIF</b>	Factor de inflación de varianza
<b>VPN</b>	Valor Predictivo Negativo
<b>VPP</b>	Valor Predictivo Positivo
<b>YFE</b>	Extracto fermentable por levaduras
<b>YPD</b>	Yeast Peptone Dextrose
<b>YM</b>	Yeast Malt Dextrose
<b>4VG</b>	4-vinilguaiacol
<b>4VF</b>	4-vinilfenol
<b>4VS</b>	4-vinilestireno



*Índice*



# Índice

RESUMEN.....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Cerveza industrial y artesanal.....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Materias primas de la cerveza.....	11
1.1.2. Proceso de elaboración de la cerveza .....	15
1.1.2.1. Obtención del mosto cervecero .....	15
1.1.2.2. Fermentación.....	17
1.1.2.3. Carbonatación .....	18
1.1.2.4. Estabilización y Envasado.....	19
1.1.3. Estrategias de la industria cervecera: el auge de la cerveza artesanal .....	19
1.1.4. Investigaciones en torno a la cerveza .....	22
<b>1.2. Microbiología y Biotecnología de la Cerveza .....</b>	<b>25</b>
1.2.1. Levaduras en la producción de cerveza .....	25
1.2.1.1. Generalidades.....	25
1.2.1.2. Levaduras del género <i>Saccharomyces</i> .....	26
1.2.1.3. Levaduras no-convencionales en la industria cervecera.....	28
1.2.1.4. Contribución de las levaduras a las propiedades sensoriales de la cerveza .....	30
1.2.2. Contaminantes microbianos en la producción de cerveza.....	31
1.2.2.1. Generalidades.....	31
1.2.2.2. Bacterias lácticas alterantes de la cerveza.....	33
1.2.2.3. Factores que afectan al crecimiento de microorganismos/BAL en la cerveza .....	35
1.2.2.4. Habilidad de las bacterias lácticas para crecer en cerveza.....	36
1.2.2.5. Producción de aminos biógenos por las BAL en cerveza .....	39
1.2.2.6. Métodos de predicción de la susceptibilidad a la contaminación microbiana.....	40
<b>1.3. Cerveza y salud humana .....</b>	<b>43</b>
1.3.1. Generalidades.....	43
1.3.2. Polifenoles como compuestos bioactivos de la cerveza .....	46
1.3.3. Melanoidinas de la cerveza .....	51
1.3.4. Fibra en la cerveza .....	52
1.3.5. La microbiota intestinal.....	54
1.3.6. Interacción de los compuestos de la cerveza y la cerveza con la microbiota intestinal.....	57
<b>2. INTERÉS GENERAL Y OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>

<b>3. CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PRESENTE EN UNA CERVECERÍA ARTESANAL Y SU IMPACTO EN LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA CERVEZA .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1. Planteamiento.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>71</b>
3.2.1. Selección de la cervecería artesanal y proceso de producción de la cerveza .....	71
3.2.2. Monitorización, aislamiento e identificación de las BAL.....	72
3.2.2.1. Monitorización, aislamiento e identificación de BAL en el aire de la cervecería ....	73
3.2.2.2. Monitorización, aislamiento e identificación de BAL en la superficie de equipos... 74	
3.2.2.3. Monitorización, aislamiento e identificación de las BAL en los productos intermedios y envasados.....	75
3.2.2.4. Identificación fenotípica.....	75
3.2.2.5. Identificación por espectrometría de masas MALDITOF y secuenciación.....	75
3.2.3. Adaptación y crecimiento de las BAL en una bebida tipo cerveza.....	76
3.2.4. Producción de exopolisacáridos (EPS).....	76
3.2.5. Efectos de los factores intrínsecos de la cerveza sobre el crecimiento bacteriano....	77
3.2.6. Determinación del potencial deteriorante de los aislados bacterianos en la cerveza artesanal .....	78
3.2.7. Detección de genes relacionados con la resistencia al lúpulo .....	79
3.2.8. Detección de genes relacionados con la producción de aminas biógenas .....	80
3.2.9. Determinación de la capacidad de producción de aminas biógenas en cerveza .....	80
3.2.7. Análisis Estadístico .....	81
<b>3.3. Resultados.....</b>	<b>81</b>
3.3.1. Monitorización aislamiento e identificación de las BAL.....	81
3.3.2. Adaptación y crecimiento de las BAL en una bebida tipo cerveza.....	84
3.3.3. Caracterización de las BAL desde un enfoque de calidad microbiológica .....	84
3.3.3.1. Producción de exopolisacáridos.....	84
3.3.3.2. Efectos de los factores intrínsecos de la cerveza sobre el crecimiento de las BAL ..	85
3.3.3.3. Capacidad deteriorante y genes relacionados con la resistencia al lúpulo .....	86
3.3.4. Caracterización de las BAL desde un enfoque para la seguridad alimentaria.....	86
3.3.4.1. Producción de aminas biógenas y genes aminoácido-descarboxilasas.....	86
<b>4. CAPÍTULO II. DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA PARA PREDECIR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN CERVEZAS ARTESANALES .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1. Planteamiento.....</b>	<b>92</b>

<b>4.2. Materiales y métodos</b> .....	<b>92</b>
4.2.1. <i>Microorganismos de estudio y crecimiento en una bebida tipo cerveza</i> .....	93
4.2.1.1. <i>Selección de los microorganismos y adaptación a la bebida tipo cerveza</i> .....	93
4.2.1.2. <i>Estimación de la fase estacionaria temprana de los microorganismos</i> .....	94
4.2.2. <i>Generación de los resultados G/NG en las cervezas-ajustadas para el primer grupo de datos del modelo</i> .....	94
4.2.2.1. <i>Análisis fisicoquímico y microbiológico de las cervezas artesanales</i> .....	94
4.2.2.2. <i>Preparación de cervezas ajustadas a diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos</i> .....	95
4.2.2.3. <i>Evaluación G/NG del primer grupo de datos del modelo</i> .....	96
4.2.3. <i>Generación de los resultados G/NG en cervezas artesanales comerciales para el segundo grupo de datos del modelo</i> .....	97
4.2.3.1. <i>Selección de cervezas artesanales comerciales</i> .....	96
4.2.3.2. <i>Evaluación G/NG en cervezas artesanales para el segundo grupo de datos</i> .....	96
4.2.4. <i>Desarrollo del modelo</i> .....	97
4.2.5. <i>Validación del modelo</i> .....	98
<b>4.3. Resultados</b> .....	<b>99</b>
4.3.1. <i>Adaptación de los microorganismos a una bebida tipo cerveza y determinación de su fase estacionaria temprana</i> .....	99
4.3.2. <i>Datos del modelo: resultados G/NG en cervezas ajustadas y en cervezas artesanales comerciales</i> .....	100
4.3.2.1. <i>Datos del primer grupo: resultados G/NG en las cervezas ajustadas a diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos</i> .....	100
4.3.2.2. <i>Datos del segundo grupo: resultados G/NG en cervezas comerciales</i> .....	101
4.3.3. <i>Modelo generado</i> .....	103
4.3.3.1. <i>No-multilinealidad</i> .....	103
4.3.3.2. <i>Fiabilidad del modelo</i> .....	104
4.3.4. <i>Validación del modelo</i> .....	106

<b>5. CAPÍTULO III. SELECCIÓN Y APLICACIÓN DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES COMO LEVADURAS FERMENTATIVAS EN MONOCULTIVO PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL</b> .....	<b>111</b>
5.1. <b>Planteamiento</b> .....	<b>111</b>
5.2. <b>Materiales y métodos</b> .....	<b>111</b>
5.2.1. <i>Selección de levaduras no-Saccharomyces</i> .....	111
5.2.2. <i>Capacidad de fermentación de maltosa</i> .....	113

5.2.3.	<i>Primera etapa de caracterización de levaduras</i> .....	113
5.2.3.1.	<i>Actividad sulfito-reductasa</i> .....	113
5.2.3.2.	<i>Producción de compuestos fenólicos simples</i> .....	113
5.2.3.3.	<i>Análisis del olor y sabor en fermentación a escala de laboratorio</i> .....	114
5.2.4.	<i>Segunda caracterización de levaduras</i> .....	115
5.2.4.1.	<i>Asimilación y fermentación de azúcares</i> .....	115
5.2.4.2.	<i>Crecimiento de las levaduras en presencia de lúpulo y etanol</i> .....	115
5.2.4.3.	<i>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa</i> .....	116
5.2.4.4.	<i>Prueba de floculación</i> .....	116
5.2.4.5.	<i>Cinética de fermentación</i> .....	116
5.2.5.	<i>Elaboración de cerveza a escala piloto con la cepa <i>L. thermotolerans</i> CIAL37</i> ...	117
5.2.5.1.	<i>Propagación de la levadura y fermentación del mosto</i> .....	117
5.2.5.2.	<i>Análisis de mosto y cerveza</i> .....	117
5.2.5.3.	<i>Análisis de compuestos volátiles por GC-ToF-MS</i> .....	118
5.2.5.4.	<i>Análisis sensorial</i> .....	119
5.2.6.	<i>Análisis estadístico</i> .....	119
<b>5.3.</b>	<b><i>Resultados</i></b> .....	<b>119</b>
5.3.1.	<i>Capacidad de fermentación de maltosa</i> .....	119
5.3.2.	<i>Primera caracterización de levaduras</i> .....	119
5.3.3.	<i>Segunda caracterización de levaduras</i> .....	121
5.3.3.1.	<i>Asimilación y fermentación de azúcares</i> .....	121
5.3.3.2.	<i>Crecimiento en presencia de lúpulo y etanol</i> .....	122
5.3.3.3.	<i>Actividad <math>\beta</math>-glucosidasa</i> .....	124
5.3.3.4.	<i>Floculación de las levaduras</i> .....	124
5.3.3.5.	<i>Cinéticas de fermentación</i> .....	124
5.3.4.	<i>Elaboración a escala piloto de un lote de cerveza con <i>L. thermotolerans</i> CIAL37</i>	126
5.3.4.1.	<i>Propagación y fermentación del mosto con <i>L. thermotolerans</i> CIAL37</i> .....	126
5.3.4.2.	<i>Análisis de mosto y cerveza</i> .....	127
5.3.4.3.	<i>Compuestos volátiles de la cerveza elaborada con <i>L. thermotolerans</i> CIAL37</i> ....	127
5.3.4.4.	<i>Análisis sensorial de la cerveza elaborada con <i>L. thermotolerans</i> CIAL37</i> .....	129

<b>6.</b>	<b>CAPÍTULO IV. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL E IMPACTO DE LA CERVEZA EN LA COMPOSICIÓN Y METABOLISMO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL</b> .....	<b>134</b>
6.1.	<b><i>Planteamiento</i></b> .....	<b>134</b>
6.2.	<b><i>Materiales y Métodos</i></b> .....	<b>135</b>
6.2.1.	<i>Muestras de cervezas</i> .....	136
6.2.2.	<i>Fluidos gastrointestinales simulados</i> .....	136
6.2.3.	<i>Diseño experimental y funcionamiento del simgi®</i> .....	136



6.2.4. Fermentación colónica .....	137
6.2.5. Análisis de la comunidades microbianas.....	138
6.2.5.1. Recuentos bacterianos en medios de cultivo .....	138
6.2.5.2. Extracción de ADN y secuenciación del ADN ribosómico 16S .....	139
6.2.6. Evaluación del metabolismo microbiano.....	140
6.2.6.1. Análisis de ácidos grasos de cadena corta por GC-MS.....	140
6.2.6.2. Producción de amonio.....	140
<b>6.3. Resultados.....</b>	<b>141</b>
6.3.1. Evolución del microbioma intestinal tras la ingesta de cerveza.....	141
6.3.1.1. Recuento de las poblaciones microbianas.....	141
6.3.1.2. Análisis de la diversidad .....	143
6.3.1.3. Análisis a nivel de filo de los perfiles microbianos.....	145
6.3.1.4. Análisis a niveles de familia y género de los perfiles microbianos .....	147
6.3.2. Cambios en la actividad metabólica de la microbiota intestinal.....	156
6.3.2.1. Concentración de ácidos grasos en el intestino .....	156
6.3.2.2. Concentración de amonio en el intestino .....	157
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>162</b>
<b>7.1. Implicaciones de las bacterias lácticas en la calidad y seguridad de la cerveza artesanal.....</b>	<b>164</b>
<b>7.2. Herramienta de predicción de la susceptibilidad de la cerveza artesanal al crecimiento microbiano.....</b>	<b>171</b>
<b>7.3. Selección y aplicación de levaduras no-Saccharomyces como levaduras fermentativas en monocultivo para la elaboración de cerveza artesanal .....</b>	<b>177</b>
<b>7.4. Impacto de la digestión gastrointestinal de la cerveza en la función y salud intestinal .....</b>	<b>186</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>199</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>204</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>242</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>262</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>267</b>



*Resumen/Abstract*



**RESUMEN**

La cerveza se ha posicionado en los últimos años como una de las principales bebidas consumidas a nivel mundial. Aunque la globalización caracteriza a este sector en la actualidad y la cuota de mercado continúa siendo de las grandes empresas cerveceras, la expansión y diversificación del sector ha fomentado la entrada de cerveceros artesanales, que han marcado un cambio y nuevos desafíos en la estructura de esta industria. A diferencia de otras bebidas de malta y de la industrial, la cerveza artesanal generalmente no contempla los procesos de filtración ni pasteurización en su fabricación para evitar que se destruyan las levaduras y otros componentes principales de la cerveza final y garantizar un perfil aromático y sabor distintivo. Por estas razones, las cervezas artesanales se caracterizan por ser bebidas más ricas en compuestos con potencial bioactivo, lo que motiva el interés científico en evaluar sus propiedades saludables. Desde el punto de vista de la calidad y seguridad alimentaria, la contaminación microbiológica puede marcar la diferencia entre las cervezas industriales y las artesanales. En lo que se refiere a las características sensoriales del producto, personalizar un estilo de cerveza o proporcionar un nuevo estilo, las principales oportunidades provienen de la capacidad para innovar en la fermentación a través de la investigación y desarrollo de nuevas levaduras y la caracterización de sus capacidades fermentativas hacia la selección de cepas que permitan modular la composición y características sensoriales de las cervezas resultantes.

Centrada en la cerveza artesanal y en el principal desafío de los cerveceros artesanales, el desarrollo de nuevos productos, la presente Tesis Doctoral ha tenido como objetivo contribuir con innovaciones en cervecería, tanto desde el punto de vista biotecnológico, incluyendo el estudio de bacterias lácticas deteriorantes, como de nuevas especies de levaduras, y también a nivel de sus potenciales efectos en la microbiota intestinal humana, como target de los compuestos bioactivos de la cerveza responsables de sus efectos en la salud.

En primer lugar, se ha realizado un estudio pionero en el que de forma integral se identifican los puntos críticos de una planta cervecera artesanal y posibles riesgos en lo referido al deterioro por bacterias lácticas, incluyendo la monitorización *in situ* de 60 puntos durante todo el proceso de producción de la cerveza, la adaptación de los aislados a los factores intrínsecos del producto y la verificación de su potencial para deteriorar la cerveza envasada. *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* fueron los géneros más prominentes, y la especie *L. brevis* evidenció la mayor capacidad deteriorante de la cerveza, por su capacidad de crecer en todas las condiciones estudiadas, incluyendo altas concentraciones de etanol y ambientes ácidos e incluso altamente lupulados. Dos de los aislados de *L. brevis* presentaron, además, genes asociados con la resistencia al lúpulo (*horA*, *horC* e *hitA*) y con la producción de aminas biógenas (*tdc*, *hdc* y *odc*), confirmándose la producción de tiramina y putrescina. Una

vez identificadas las principales especies de bacterias lácticas y sus riesgos, se llevó a cabo el desarrollo de un modelo de regresión logística binomial de tipo G/NG mediante la combinación de parámetros fisicoquímicos: pH, unidades de amargor y contenido de etanol. El modelo G/NG clasificó correctamente 276 de los 331 casos analizados, con una buena sensibilidad y bondad de ajuste (87 % y 83,4 %, respectivamente) y en la validación externa, su capacidad de predicción fue del 100 %. Este modelo puede proporcionar una herramienta de uso práctico para predecir la susceptibilidad al deterioro microbiano de la cerveza artesanal.

Esta Tesis Doctoral también ha abordado la selección de nuevas levaduras no-*Saccharomyces*, mediante un enfoque holístico que implica la evaluación de sus características fermentativas, metabólicas y sensoriales. De las 141 cepas de levaduras de origen enológico analizadas para evaluar su potencial como monocultivos fermentativos, se seleccionaron inicialmente cuatro cepas (*Torulaspota delbrueckii* CIAL29 y CIAL34, y *Lachancea thermotolerans* CIAL37 y NOO32) con características fermentativas y sensoriales destacadas, incluyendo su aptitud para desarrollar fermentaciones secundarias, usuales en cervecerías artesanales. El uso de la cepa seleccionada, *L. thermotolerans* CIAL37, presentó características biotecnológicas y sensoriales relevantes basadas en su capacidad para producir cantidades considerables de ácido láctico y cítrico, alcohol isobutílico e isoamílico, isovaleraldehído, etil isobutanoato, etil butanoato y etil hexanoato, que estaban por encima del umbral de percepción y eran responsables del perfil sensorial agradable y complejo de la cerveza, destacando un sabor afrutado/cítrico y *sour*. Además, esta cepa de levadura contribuyó a la claridad de la cerveza y permitió la formación de una espuma persistente. La aplicación de esta cepa a escala de laboratorio muestra aptitudes para el desarrollo de un futuro ensayo de prueba de concepto a escala industrial para elaborar estilos de cerveza con *flavor sour*, y con un contenido de etanol relativamente bajo o moderado.

De igual forma este trabajo también ha integrado un estudio relativo a las propiedades saludables de la cerveza artesanal, asumiendo el aumento de la preocupación por la salud por parte de los consumidores y la necesidad de estudios en este ámbito siempre controvertido por las consecuencias negativas del contenido en alcohol. Para ello, se ha realizado un ensayo de simulación *in vitro* de la ingesta de tres cervezas comerciales en el SIMulador GastroIntestinal dinámico simgi®, y los resultados han revelado un efecto potencialmente prebiótico de la cerveza sobre distintos grupos taxonómicos de interés asociados a efectos beneficiosos en el organismo, a nivel de familia y género, y que se veía también reflejado en la funcionalidad metabólica de la microbiota. Específicamente, este estudio ha permitido observar diferentes efectos de la cerveza sobre las comunidades microbianas intestinales y la producción de los metabolitos en función de las materias primas y la forma de elaboración

utilizadas, e indica por primera vez el impacto de la cerveza sobre la microbiota intestinal, como un factor a considerar en la evaluación de sus propiedades para la salud humana.

### ABSTRACT

In recent years, beer has positioned itself as one of the main beverages consumed worldwide. Although globalization currently characterizes this sector and the market share continues to be dominated by the large beer companies, the expansion and diversification of the sector has encouraged the entry of craft brewers, who have marked a change and introduced new challenges in the structure of this industry. Unlike other malt and industrial beverages, craft beer generally does not include filtration or pasteurization processes in its manufacture in order to prevent the yeasts and other main components of the final beer from being spoiled and to ensure an aromatic profile and distinctive flavor. For these reasons, craft beers are beverages richer in compounds with bioactive potential, which motivates scientific interest in evaluating their healthy properties. From the point of view of quality and food safety, microbiological contamination can make the difference between industrial and craft beers. As far as the sensory characteristics of the product are concerned, and the customizing of a style of beer or providing a new style, the main opportunities lie in the ability to innovate in fermentation through the research and development of new yeasts and the characterization of their fermentative capacities towards the selection of strains that allow modulating the composition and sensory characteristics of the beers produced.

This thesis focused on craft beer and the main challenge of craft brewers - which is the development of new products - is aimed at contributing to innovations in the brewery industry from both a biotechnological point of view (studies of beer spoilage lactic bacteria and new yeast species) and the potential effects of beer on the human intestinal microbiota, as a target of the bioactive compounds of beer responsible for its effects on health.

Firstly, a pioneering study was performed, that identified in a comprehensive way the critical points of a craft brewery plant and the possible risks, in terms of spoilage by lactic acid bacteria. This included 60 points of *in situ* monitoring throughout the beer production process, the adaptation of the isolates to the intrinsic factors of the product and the verification of their ability to spoil packaged beer. *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* were the most noticeable genera, and the species *L. brevis* showed the greatest beer spoilage capacity, due to its ability to grow in all the assayed conditions, including high concentrations of ethanol and acidic and even highly hopped environments. Two of the *L. brevis* isolates also presented genes associated with hop resistance (*horA*, *horC* and *hitA*) and with the production of biogenic amines (*tdc*, *hdc* and *odc*), confirming the production of tyramine and putrescine.

Once, the main species of lactic acid bacteria and their risks were identified, a growth/no growth (G/NG) binary logistic regression model to predict these 19 susceptibilities was developed by combining physicochemical parameters (pH, bitterness units and ethanol content). The G/NG model correctly classified 276 of the 331 cases analyzed, with good sensitivity and goodness of fit (87 % and 83,4 %, respectively) and its predictability was 100% on external validation. This G/NG model can provide a practical tool for predicting the susceptibility to microbial spoilage of craft beer.

This thesis has also addressed the selection of new no-*Saccharomyces* yeasts, through a holistic approach that involves the evaluation of their fermentative, metabolic, and sensory characteristics. Out of the 141 yeasts strains of oenological origin that were analyzed to evaluate their potential as fermentative monocultures, four strains were initially selected (*Torulaspora delbrueckii* CIAL29 and CIAL 34, and *Lachancea thermotolerans* CIAL 37 and NOO32) with outstanding fermentative and sensory characteristics, including their ability to develop secondary fermentations, usually performed in craft breweries. The use of the selected strain, *L. thermotolerans* CIAL37, presented relevant biotechnological and sensory characteristics based on its ability to produce considerable amounts of lactic and citric acid, isobutyl and isoamyl alcohol, isovaleraldehyde, ethyl isobutanoate, ethyl butanoate, and ethyl hexanoate, which were above the threshold of perception and were responsible for the pleasing and complex sensory profile of the beer, highlighting a fruity/citric and sour flavor. Additionally, this yeast strain contributed to the beer clarity and allowed the formation of a persistent foam. The application of this strain at laboratory scale shows an aptitude for the development of a future proof-of-concept trial on an industrial scale to brew novel sour beers with a relatively low or moderate ethanol content.

In addition, this work includes a study related to the healthy properties of craft beer, taking into account increasing consumer concern for health and the need for studies in this controversial topic due to the adverse effects of beverage alcohol content. Given this, an *in vitro* simulation of the digestion of three commercial beers in the dynamic GastroIntestinal Simulator, simgi® was performed. The results revealed a potentially prebiotic effect of beer on different taxonomic groups related to the beneficial health effects, with regard to family and genus, which was also reflected in the metabolic functionality of the microbiota. Specifically, this study has shown different effects of beer on intestinal microbial communities and the production of metabolites depending on the raw materials and elaboration process used, while for the first time the overall impact of craft beer on the intestinal microbiota is indicated, as a factor to consider in the evaluation of its properties for human health.





## *Introducción*



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Cerveza industrial y artesanal

La cerveza, al igual que el vino, se consideran entre las bebidas más antiguas. En la Antigüedad eran sinónimos de civilización, considerándose como una bebida de altas clases sociales para festines rituales y actividades ceremoniales. Los primeros vestigios de la elaboración de cerveza se encontraron en un pueblo de cazadores-recolectores, en los alrededores de la cueva Raqefet del monte Carmel en Israel, con una antigüedad de casi 13 mil años (L. Liu et al., 2018). Posteriormente, en la antigua Mesopotamia, el país entre los dos ríos Éufrates y Tigris (que cubre aproximadamente el actual país de Iraq), la cerveza constituyó uno de los alimentos básicos de la población. Raciones de cerveza e ingredientes para su fabricación constituían entonces el sueldo de los trabajadores a lo largo de su historia, por ejemplo, se utilizó la cerveza como pago salarial en la construcción de las pirámides de Egipto.

Hoy en día la cerveza es la bebida alcohólica más consumida en el mundo y la tercera bebida más popular después del agua y el té (Salanță, Coldea, Ignat, Pop, Tofană, Mudura, Borșa, Pasqualone, & Zhao, 2020). El consumo medio de cerveza per cápita supera los 100 L por año en algunas regiones de Europa (WHO, 2018), mientras que en España se sitúa en torno a los 89 L por año (Kozłowski et al., 2021).

El *Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*, (BOE 17 de diciembre de 2016) en su Artículo 3 “Definiciones relativas a los productos y a los métodos de fabricación” define a la cerveza como: “Alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales”. Así mismo en una normativa anterior se definía la cerveza como: “Bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción.

Se pueden realizar varias clasificaciones de los muchos tipos de cerveza existentes en el mercado, dependiendo del criterio de clasificación seleccionado. En función del contenido de sus materias primas, de la graduación alcohólica y otras características se tipifican distintos tipos de cerveza (Real Decreto 678/2016):

1. Cerveza de cereales: cuando en el mosto cervecero la presencia de malta de cebada sea inferior al 50 % respecto al total de la malta y llevará la denominación de «Cerveza de» seguida del nombre del cereal con mayor contenido en peso.
2. Cerveza extra: cerveza con un extracto seco primitivo superior o igual al 15 % en masa.
3. Cerveza especial: cerveza con un extracto seco primitivo superior o igual al 13 % en masa e inferior al 15 % en masa.
4. Cerveza negra: cerveza que supere las 50 unidades de color, conforme al método analítico de la *European Brewery Convention* (EBC).
5. Cerveza de bajo contenido en alcohol: cerveza cuya graduación alcohólica esté comprendida entre el 1 y el 3 % en volumen.
6. Cerveza sin alcohol: cerveza cuya graduación alcohólica sea menor al 1 % en volumen.

El tipo de fermentación utilizado para la elaboración de la cerveza es probablemente la característica que permite diferenciar los distintos tipos de cerveza en cuanto a su estilo y reconocimiento por el consumidor. Según sus características, se distinguen cervezas de:

7. Baja fermentación (*lager*): se elaboran a temperaturas bajas, alrededor de los 0 - 4 °C y la levadura que se emplea es *Saccharomyces pastorianus*, que se sedimenta en el fondo de la cerveza para su fermentación. Tras finalizar el proceso de la primera fermentación, las cervezas obtenidas pasan a ser almacenadas en tanques de maduración en frío (cerca de 0 °C), donde se dejan reposar durante varias semanas o incluso meses. La cerveza *lager* se caracteriza, entre otras propiedades, por el olor a malta y la carencia de olores afrutados, aunque cada vez hay más cervezas de estilo *lager* con una gran complejidad y singularidad. El estilo Pilsen creado en la ciudad de *Plzen* (República Checa) en 1842, fue la primera cerveza de baja fermentación dorada y transparente de la historia, cuyo aspecto atractivo y delicado sabor consiguió conquistar al público. Con el paso del tiempo, es el estilo más reproducido e imitado en la industria cervecera mundial.
8. Alta fermentación (*ale*): se elaboran a temperaturas superiores a las de baja fermentación, en el rango de 15 - 24 °C con levadura de fermentación superior hidrofóbica, principalmente cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Además, estas cervezas presentan sabores y aromas afrutados que están relacionadas con la presencia de ésteres y productos secundarios. Hay un mayor número de estilos de

cervezas de alta que de baja fermentación. Se pueden dividir en subcategorías según la Guía *Beer Judge Certification Program* (Strong & England, 2015).

9. Espontánea: la fermentación se produce de forma natural y espontánea, sin necesidad de inocular levadura en el mosto, ya que el proceso es llevado a cabo por levaduras silvestres que se encuentran en el aire o en el ambiente, en contacto con el mosto contenido en las cubas de fermentación abiertas utilizadas para la elaboración de este tipo de cervezas. Estas cervezas contienen un porcentaje de malta de trigo combinado con malta de cebada, y en algunas variedades también se incluyen diferentes frutas como ingredientes, en especial cereza o frambuesa. En este caso, también reciben la denominación de cervezas *lambics*.

Con los avances en la producción mundial de cerveza y sus consumidores cada vez más exigentes, surgen nuevos desafíos en la búsqueda de tecnologías y enfoques más novedosos en el sector. Por ello, las cerveceras artesanales van de la mano de las nuevas tendencias en el desarrollo e innovación de las cervezas ocupando un mercado creciente con una amplia gama de productos y estilos. El *Real Decreto 678/2016* define a la fabricación artesanal como: “Elaboración mediante un proceso que se desarrolle de forma completa en la misma instalación y en el que la intervención personal constituye el factor predominante, bajo la dirección de un maestro cervecero o artesano con experiencia demostrable y primando en su fabricación el factor humano sobre el mecánico, obteniéndose un resultado final individualizado, que no se produzca en grandes series, siempre y cuando se cumpla la legislación que le sea aplicable en materia de artesanía.” Las cervezas artesanales, en general tienen un sabor distintivo, un valor de calidad único y propiedades sensoriales particulares (Humia et al., 2019).

### **1.1.1. Materias primas de la cerveza**

Las materias primas esenciales para la elaboración de la cerveza son: malta, lúpulo, agua y levadura. Recientemente, la elaboración de nuevos estilos cerveceros ha introducido nuevas materias primas (frutas, cereales, como la avena) para competir en mercados internacionales, por ejemplo, con la elaboración de cervezas tipo *sour* o ácidas.

La malta es el ingrediente principal del mosto cervecero, proporciona varios atributos clave que definen a la cerveza, como el color, *flavor*, cuerpo y proporciona los azúcares necesarios para que, a través de la fermentación por levaduras, se produzca el alcohol. Aunque

son varios los granos de cereales que pueden ser malteados (cebada, trigo, centeno, maíz y arroz), los que generalmente presentan menos problemas técnicos.

La malta se obtiene a partir de variedades de cebada especialmente cultivadas para este fin, cuyos granos pasan por etapas de remojo, germinación y secado/tostado. La malta base está compuesta por hidratos de carbono (70 %), proteínas (10 %), fibra (10 %), lípidos (3 %), minerales, vitaminas y oligoelementos (Bamforth, 2003). Se pueden obtener diversos tipos de malta (Figura 1, A - D), dependiendo del tiempo y temperatura aplicados durante el tostado, además según el tipo y proporción de uno o varios tipos de malta. Así, la malta puede conferir a la cerveza aromas a bizcocho, miel, canela, pan, chocolate, cacao, café, torrefacto y/o ahumado, entre otros (Parr et al., 2021). La malta además proporciona compuestos proteicos que intervienen en la estabilidad de la espuma de la cerveza (Figura 1E) (Niu et al., 2018). Junto a la malta se utilizan otras fuentes de carbohidratos llamados “adjuntos cerveceros” como el trigo, maíz, arroz, avena, centeno, fécula de patata, almíbares derivados de la caña de azúcar, remolacha azucarera, caramelo, azúcar invertido y otros azúcares (Bogdan & Kordialik-Bogacka, 2017).



**Figura 1.** Malteado, tipos de malta y sus propiedades en cervecería. (A), cebada en campo; (B), remojo de granos; (C), germinación; (D), tres tipos de malta con diferente grado de tostado; (E), propiedades que otorga la malta a la cerveza.

El lúpulo (*Humulus lupulus*) otorga una de las características organolépticas más apreciadas de la cerveza, el amargor, principalmente por los  $\alpha$ -ácidos (humulona, cohumulona y adhumulona) provenientes de las resinas del cono de la planta (Kishimoto et al., 2021). Este amargor contribuye a equilibrar el dulzor conferido por la malta. El lúpulo contiene resinas (10 - 25 %), proteínas (12 - 22 %) y también aceites esenciales (0,4 - 2,0 %) que otorgan a la cerveza aromas cítricos, florales (geraniol, linalool), herbáceos/frutales (limoneno, mirceno,  $\beta$ -pireno) (Astray et al., 2020). El lúpulo también favorece la filtración del mosto, la formación y retención de la espuma, y contribuye a la sensación en boca (*mouthfeel*) y estabilidad coloidal y microbiológica; esta última por la formación de sustancias antimicrobianas durante la cocción del mosto. Para su uso en cervecería se manufacturan y distribuyen principalmente en tres formas sólidas: flores desecadas, tabletas de flores desecadas y comprimidas (*plug*), y polvo de flor y flores desecadas, trituradas y prensadas (*pellets*). Adicionalmente, se comercializa en forma de extracto líquido de lúpulo isomerizado, el cual se puede añadir durante o después de la cocción.

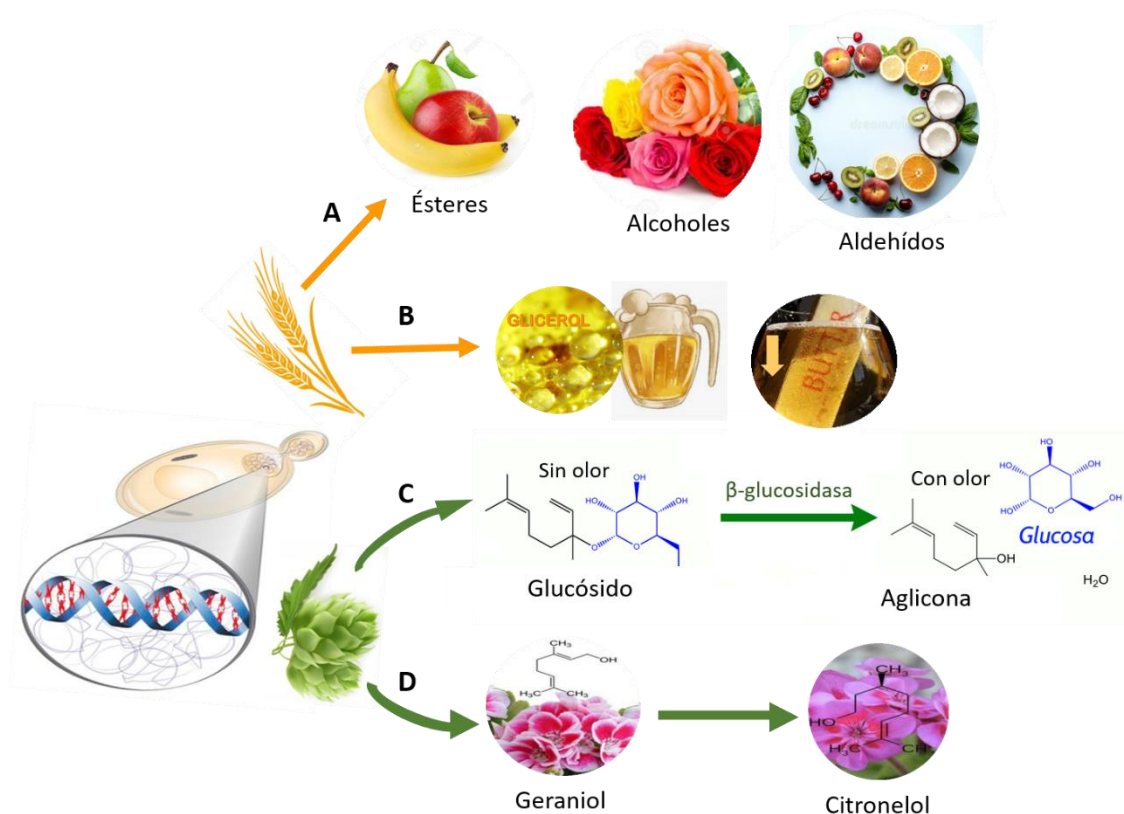
La industria cervecera forma parte del grupo de empresas que utilizan más agua en su proceso productivo, por lo tanto, el agua es un elemento esencial que juega un papel fundamental en la totalidad de las operaciones. Al tratarse del componente mayoritario de la cerveza (85 - 92 %) la composición química del agua influye de forma directa en sus propiedades sensoriales. El agua cervecera contiene iones disueltos como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+1}$ ,  $\text{K}^{+1}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^{-1}$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$ , que influyen de forma indirecta sobre las reacciones enzimáticas y coloidales que se producen durante el proceso de elaboración (Belitz et al., 2009). El calcio es necesario para diversas actividades enzimáticas; mejora la formación del turbio (*trub*) caliente (proteína coagulada, polifenoles, carbohidratos y lúpulo gastado); forma y precipita al oxalato y carbonato cálcico; disminuye el pH en la maceración y cocción; favorece el metabolismo y floculación de la levadura; y su concentración es clave en la dureza y la alcalinidad residual. El magnesio es un nutriente vital para las levaduras y necesario para la isomerización de la humulona en iso-humulona. El bicarbonato funciona como agente tamponante, amortiguando las variaciones de pH. El cloruro en bajas cantidades destaca el dulzor de la malta; y el sodio, puede contribuir a proporcionar cuerpo a la cerveza (Eumann, 2006).

Además de ser la materia prima mayoritaria de la cerveza, el agua es un producto indispensable para el funcionamiento de gran número de operaciones. Los principales usos del agua en la elaboración de cerveza son: a) limpieza de equipos e instalaciones; b) incorporación al producto; c) circuitos de refrigeración y calderas; d) envasado y e) operaciones sanitarias.



Por tanto, es de destacar la importancia que tiene tanto desde el punto de vista de la calidad del producto como por la influencia que puede tener en el proceso de producción.

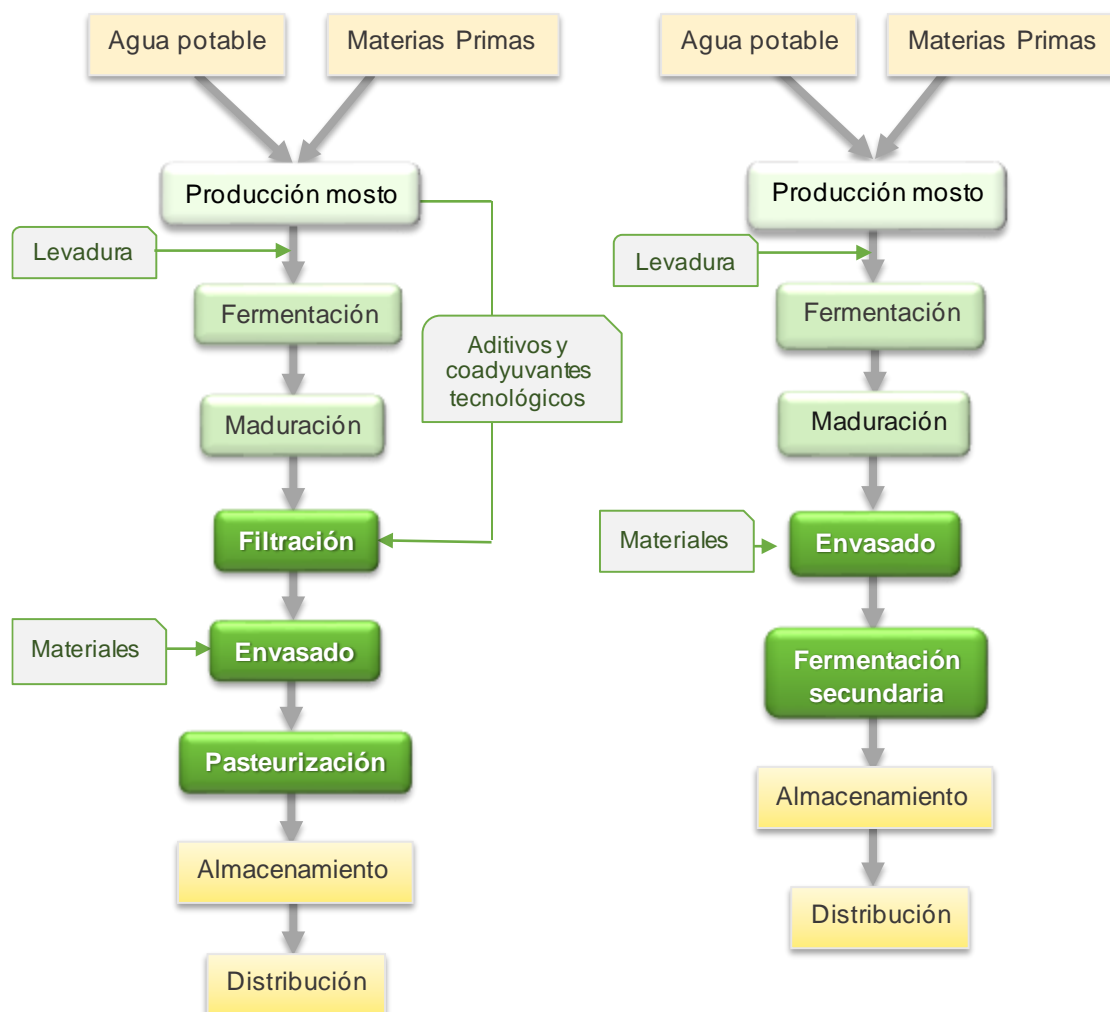
Las levaduras son el factor clave en el proceso de elaboración de la cerveza, metabolizan los azúcares asimilables del mosto en etanol, dióxido de carbono, y definen las características organolépticas y de calidad del producto final. Las levaduras más usadas para la elaboración de cerveza pertenecen al género *Saccharomyces*, distinguiéndose *S. pastorianus* y *S. cerevisiae*. Dependiendo de las características genéticas y metabólicas de la levadura, ésta puede producir diversos compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ésteres, aldehídos; y glicerol, principalmente a partir de los compuestos provenientes de la malta (Figura 2), así como transformar compuestos aromáticos del lúpulo a otros compuestos con distinto aroma. Algunas cepas de levaduras con actividad  $\beta$ -glucosidasa pueden transformar los compuestos inodoros del lúpulo a compuestos aromáticos (Kanauchi & Bamforth, 2012; Loviso & Libkind, 2018, 2019).



**Figura 2.** Principales productos del metabolismo de la levadura derivados de la malta y el lúpulo y su contribución a las características organolépticas de la cerveza. (A), ésteres (aromas a frutas), alcoholes superiores (flores); aldehídos (frutos tropicales); (B), glicerol (cuerpo de la cerveza); (C), glucósidos del lúpulo y agliconas; (D), compuestos aromáticos.

### 1.1.2. Proceso de elaboración de la cerveza

El proceso de elaboración de la cerveza se ha ido desarrollando a lo largo de miles de años y se puede dividir en cuatro etapas: obtención del mosto, fermentación, carbonatación, y estabilización y envasado. Sin embargo, a lo largo de los años, y con el fin de obtener productos y variedades de la máxima calidad y seguridad ha evolucionado la forma en la que se realizan cada una de las etapas. En la Figura 3 se muestra el diagrama de flujo de una cerveza industrial y una cerveza artesanal.



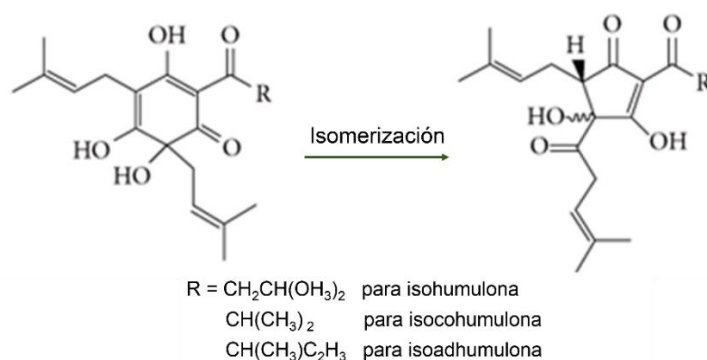
**Figura 3.** Diagrama de flujo de una cerveza industrial y una cerveza artesanal.

#### 1.1.2.1. Obtención del mosto cervecero

Esta etapa conlleva los pasos de molienda, maceración, filtración, cocción y enfriamiento del mosto. La molienda se realiza para separar la cáscara de la malta, dejándola lo más intacta posible para que actúe como medio de filtración del mosto; y para

romper/pulverizar el endospermo, evitando la generación de polvo fino que podría obstruir dicha filtración. En la maceración, la actividad de las enzimas líticas presentes en la malta, generan fuentes de nitrógeno: proteínas solubles, péptidos y aminoácidos; carbohidratos: dextrinas y azúcares fermentables; vitaminas; ácidos grasos y esteroides, así como fuentes inorgánicas: ácido fosfórico, P, S, Mg y otros minerales. Esta actividad depende del tiempo, la temperatura y pH del macerado, pudiéndose obtener mostos con variaciones en el extracto fermentable, viscosidad, color y contenido proteico. El mosto posteriormente es filtrado para eliminar los restos de cascarilla y granos a través de filtros de lecho o de prensa, resultando un mosto libre de partículas en suspensión, preparado para su hervido (Willaert, 2007).

La cocción se realiza por acción del calor durante 1,5 - 2 h de hervido para estabilizar el mosto ya que se inactivan enzimas, disminuye la carga microbiana proveniente de las materias primas, elimina sustancias volátiles, coagula proteínas, extrae componentes solubles del lúpulo y concentra el mosto. La cocción es la etapa ideal para la adición del lúpulo, ya que los  $\alpha$ -ácidos sufren un cambio estructural o isomerización (Figura 4), originando compuestos solubles fundamentalmente iso- $\alpha$ -ácidos (iso-humulona, iso-cohumulona e iso-adhumulona). Estos presentan actividad antimicrobiana y son más solubles y amargos que sus respectivos precursores. Los  $\beta$ -ácidos igualmente se isomerizan, pero como su solubilidad es muy baja, su contribución al amargor es casi despreciable. Terminada la cocción se aplica la clarificación mediante un remolino decantador (Whirlpool), para separar el turbio (*trub*) caliente, resultando el mosto cervecero (Tabla 1).



**Figura 4.** Isomerización de  $\alpha$ -ácido a iso- $\alpha$ -ácido. Tomado de (Silva & Faria, 2008).

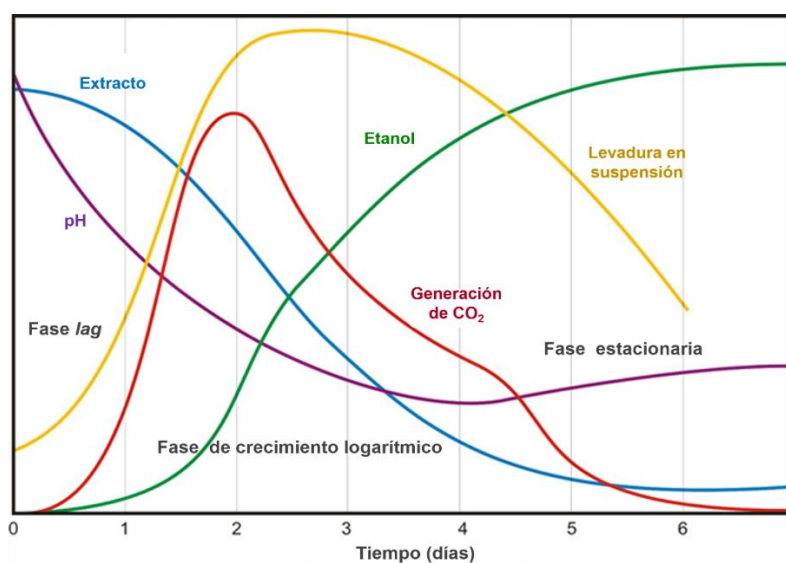
A continuación, el mosto pasa por un proceso de enfriamiento hasta una temperatura propicia de inoculación para la levadura (8 - 20 °C), mediante enfriadores de tipo intercambiador de calor o refrigerantes. Al mosto frío se le inyecta aire estéril u oxígeno requerido para el crecimiento de la levadura (6 - 8 ppm de  $\text{O}_2$  disuelto) a través de un aireador que genere burbujas muy finas, para evitar el efecto tóxico del  $\text{O}_2$  puro sobre la levadura (O'Rourke, 2002).

**Tabla 1.** Composición de los azúcares característicos del mosto cervecero (Stewart, 2006).

Sacárido	Fórmula química	Composición porcentual (%)
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	10 – 15
Fructosa	$C_6H_{12}O_6$	1 – 2
Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1 – 2
Maltosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	50 – 60
Maltotriosa	$C_{18}H_{32}O_{16}$	15 – 20
Grandes sacáridos	$H_2O + (C_6H_{10}O_5)_n$	20 – 30

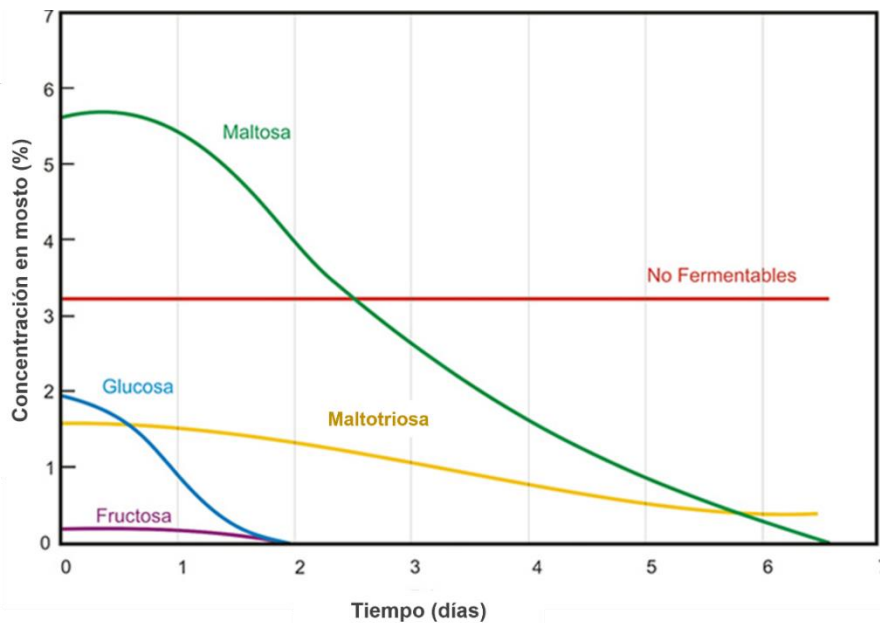
### 1.1.2.2. Fermentación

La fermentación es probablemente el proceso decisivo para la calidad y propiedades organolépticas de la cerveza. El ciclo de crecimiento de la levadura cuando se añade al mosto, es una típica curva de crecimiento, que consta de una fase *lag* donde la levadura consume oxígeno (síntesis de lípidos y esteroides), se adapta a su entorno (nuevas enzimas) y ocurre el inicio del crecimiento; y continúa con una fase logarítmica de crecimiento donde se activa la división celular y se logra la máxima capacidad de fermentación, produciéndose los metabolitos primarios: etanol y  $CO_2$  por metabolización rápida de los azúcares fermentables. Además, hay una disminución de la densidad del mosto y del pH, que aproximadamente baja de 5,3 a 4,3, debido al catabolismo de los aminoácidos con la pérdida de nitrógeno y la formación de ácidos orgánicos como los ácidos láctico, propiónico y pirúvico. Por último, la levadura pasa a una fase estacionaria donde la fermentación es lenta, no hay más crecimiento; pero sí almacenamiento de glucógeno (Figura 5). En esta etapa la levadura elimina compuestos no deseables como el diacetilo, que le confiere a la cerveza un olor similar a mantequilla.



**Figura 5.** Representación gráfica de la evolución de los principales parámetros fisicoquímicos y microbiológicos durante la fermentación por *Saccharomyces* sp. Adaptado de (Stewart et al., 2017).

Respecto a la asimilación de azúcares, la levadura utiliza los principales azúcares del mosto en orden secuencial (Figura 6). La maltosa y la maltotriosa son los azúcares más abundantes y, por lo general, solo se absorberán después del agotamiento de los monosacáridos (Y. He et al., 2014).



**Figura 6.** Representación gráfica de la atenuación de los azúcares fermentables del mosto durante la fermentación. Tomado de (Stewart et al., 2017).

Tras unos días de fermentación la mayor parte de levadura se recupera y puede ser reutilizada para futuras fermentaciones dependiendo de su viabilidad y vitalidad. Una vez terminada la fermentación, la cerveza es almacenada para su maduración, bajando gradualmente la temperatura para favorecer la sedimentación de los sólidos en suspensión, quedando aún levadura activa suspendida y cierta turbidez en la cerveza (Buiatti et al., 2021). En la producción artesanal, la cerveza madura no se filtra o centrifuga, mientras que en la fabricación de cerveza industrial sí se realizan estas operaciones para reducir la cantidad de levadura y las sustancias que provocan turbidez (proteínas, polifenoles, pentosanos, resinas del lúpulo,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucanos). La filtración se realiza usando tierra de diatomeas, filtros de celulosa, o incluso se puede usar filtros de cartucho o de cerámica que representan una alternativa a la pasteurización, así como los filtros esterilizantes.

### 1.1.2.3. Carbonatación

La etapa de carbonatación se realiza por inyección de  $\text{CO}_2$  directamente sobre la cerveza industrial, o por carbonatación tradicional en las cervecerías artesanales, a través de una fermentación secundaria por adición de “mosto en fermentación” o por

acondicionamiento en botella. El nivel de carbonatación varía por cada estilo de cerveza y afecta directamente a la formación de la espuma, a la percepción visual y del *flavor* de la cerveza.

#### **1.1.2.4. Estabilización y Envasado**

Las grandes fábricas industriales pasteurizan la cerveza para inactivar enzimas y lograr la estabilidad microbiológica de la cerveza. La pasteurización por túnel se lleva a cabo mediante la exposición del producto envasado a agua caliente, ocasionando el incremento de temperatura de la cerveza (> 60 °C) durante 5 min por túnel, o previo al envasado se aplican temperaturas más altas durante un menor tiempo al líquido (pasteurización *flash*) por lo que cualquier contaminación microbiana después del envasado quedará dentro el producto. De ahí la necesidad de áreas blancas con un buen plan de limpieza y saneamiento, así como un efectivo plan de control microbiológico sobre todo en las líneas de envasado con pasteurización *flash* (Buiatti et al., 2021). Mientras que, en la producción de cerveza artesanal, además de no filtrarse, tampoco se pasteuriza, quedando levaduras viables y enzimas no inactivadas, por ello se conserva el *flavor* del producto recién terminado (Figura 3).

#### **1.1.3. Estrategias de la industria cervecera: el auge de la cerveza artesanal**

Tradicionalmente, las grandes industrias cerveceras concentraron sus esfuerzos en la estandarización del proceso de elaboración de la cerveza, la cual generalmente pertenecía al estilo Pilsen (*lager*), con acciones enfocadas en la higiene y seguridad del producto, así como en el uso de inóculos de cepas específicas, mayoritariamente de *S. pastorianus* obteniendo cervezas con carácter genérico y organolépticamente uniformes. La nueva gran oferta de cervezas inició un cambio de paradigma, erradicando la idea de que “todas las cervezas se parecen o son iguales”, revelando un lado más complejo y sofisticado de esta bebida milenaria. La complejidad sensorial ofertada pretende cubrir las expectativas de los consumidores tradicionales y ha logrado atraer a un nuevo público, así mismo influenciado por el estilo de vida saludable que busca alternativas en este tipo de bebidas elaboradas con cero o bajo contenido en alcohol. En España se ha observado un nuevo perfil del consumidor que busca nuevas experiencias y sensaciones, y la tendencia al consumo de productos más saludables, de carácter artesanal. Debido a la gran diversidad de cervezas que se comercializan en la actualidad, la clasificación del *Real Decreto 678/2016* queda insuficiente, por lo que dos organizaciones internacionales, el Programa de Certificación para Juez de Cerveza (BJCP) y *Brewers Association* han definido estilos de cervezas tradicionales. De acuerdo con la Guía de

Estilos Cerveceros del BJCP (Strong & England, 2015), los estilos de cervezas se pueden clasificar según su intensidad, color, tipo de fermentación, familia, época y región de origen. Sin embargo, lo más común es diferenciarlos por familias. En la Tabla 2, se detallan las características fisicoquímicas de las cervezas clasificadas por familia.

**Tabla 2.** Principales parámetros fisicoquímicos de las familias de cerveza definidas por la Guía de Estilos Cerveceros del BJCP. Adaptado de (Strong & England, 2015).

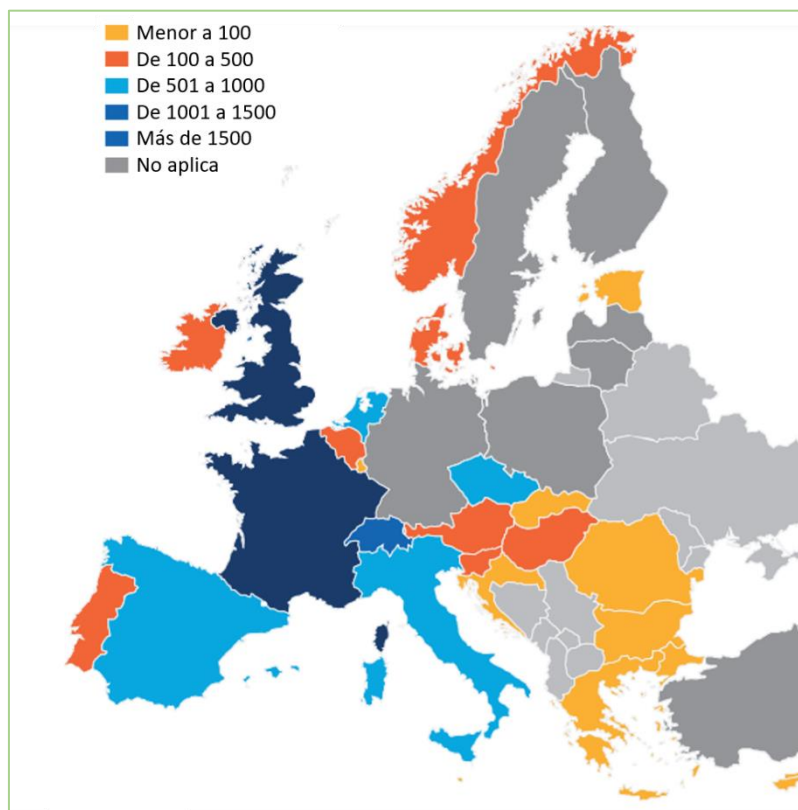
Familia	Amargor (IBU)		Alcohol (% ABV)		Densidad final	
	Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
Pale lager	8	35	2,4	6,3	1,004	1,015
Pilsner	22	45	4,2	6,0	1,008	1,017
Amber lager	8	45	4,4	6,3	1,008	1,017
Dark lager	8	34	4,2	6,0	1,008	1,017
Bock	16	35	6,3	14	1,011	1,035
Pale ale	8	50	3,8	7,5	1,002	1,018
Indian Pale Ale	40	120	5,0	10,0	1,008	1,018
Amber ale	10	50	2,5	8,5	1,007	1,018
Brown ale	10	40	2,8	6,2	1,008	1,015
Porter	18	50	4,0	9,5	1,008	1,024
Stout	20	90	4,0	12,0	1,007	1,030
Strong ale	17	100	5,5	12,0	1,005	1,040
Trigo	15	35	2,5	11,0	1,000	1,022

El auge de la fabricación artesanal ha transformado al sector cervecero, donde la gran innovación y variedad de estilos cerveceros ofertados actualmente en el mercado, ha provocado un creciente interés por parte de los consumidores e incluso de varias corporaciones cerveceras, que han apostado por adquirir participaciones mayoritarias en las cervecerías artesanales o han incluido los estilos más demandados en sus portafolios (Tabla 3).

**Tabla 3.** Adquisiciones de cervecerías artesanales por grandes cerveceras.

Cervecería Artesanal	Compañía dueña o con participación
La Virgen (España); Patagonia (Argentina); Barbarian (Perú)	AB Inbev (Bélgica-Brasil)
La Sagra (España)	Molson Coors (EE. UU.-Canadá)
La Cibeles (España)	Heineken Internacional (Holanda)
Nómada (España); Founders y Avery Brewery (EE. UU.)	Mahou-San Miguel (España)
Carlow Brewing Cia. (Irlanda)	Hijos de Rivera (España)

Se estima que existen alrededor de 10 mil cervecerías artesanales en el mundo, de las cuales el 86 % se localizan en Europa y EE. UU. La Figura 7 muestra el número de cervecerías activas en 2019 en algunos países de Europa. La obtención de estadísticas globales precisas de las cervecerías artesanales que reflejen el mercado actual es compleja debido a que hasta el momento no se ha unificado el concepto de cerveza artesanal en el mundo.



**Figura 7.** Número de compañías cerveceras activas en 2019 en Europa. Tomado de (The Brewers of Europe, 2020).

España ostenta una posición destacada en cuanto a la producción de cerveza en Europa. Según datos del 2019, España ocupó el tercer puesto, tras elaborar 39,5 millones de hectolitros solo por detrás de Alemania y Polonia; y a nivel mundial es el décimo productor de cerveza (The Brewers of Europe, 2020). Es un sector creciente; pero debido a la pandemia Covid-19, la producción se vio muy afectada en 2020, mostrando un descenso de un 12 %. Además, España es el país con mayor crecimiento en el número de cervecerías artesanales, así en 2020, el número total de cerveceras inscritas fue de 503, siendo Cataluña la comunidad autónoma con mayor número de cervecerías (113), seguida de Andalucía (74), y Castilla y León (45). En cuanto a la exportación, la popularidad y la calidad de las cervezas españolas han generado un crecimiento de más de un 300 % en los últimos diez años, donde los principales destinos son Portugal, Reino Unido y China. Las importaciones también crecieron un 9.5 %, alcanzando los 5,3 millones de hectolitros en 2020.



En la actualidad el mercado español es líder en producción y consumo de cerveza sin alcohol dentro de la Unión Europea. Si bien, la cerveza sin alcohol se comercializa desde hace décadas en todo el mundo, en ningún país funciona como en España, donde el concepto “salir de cañas” es el acto en torno al que gira la convivencia social española. De hecho, en 2017, más del 15 % del consumo de cerveza en España fue del tipo ‘sin alcohol’.

#### **1.1.4. Investigaciones en torno a la cerveza**

El análisis de las publicaciones científicas pone de manifiesto el creciente interés de la investigación por la cerveza artesanal en todo el mundo. La búsqueda del término *craft beer*, en una de las principales bases de datos bibliográficas arroja 470 artículos en los últimos 30 años a fecha 02 de Oct del 2021 (Scopus, 2021). Alrededor del 95 % de los artículos han sido publicados a partir de 2010 hasta ahora y el mayor número de trabajos (95) se ha publicado en los últimos dos años (2020-21). En cuanto a la distribución geográfica de los investigadores que operan en el campo de la cerveza artesanal, la mayoría de ellos provienen de América del Norte que, junto con el Reino Unido, fueron los territorios donde comenzó la historia moderna de la microcervecería (Cabras & Bamforth, 2016). Según los datos de revisiones sistemáticas sobre este tema, alrededor del 35 % de los trabajos corresponden a publicaciones de investigadores de EE. UU., seguidos a gran distancia por los italianos (~ 15 %), británicos (~ 8 %), brasileños (~ 5 %), australianos (~ 5 %), alemanes (~ 4 %), franceses (~ 3,5 %), españoles (~ 3,5 %) y canadienses (~ 3 %). Curiosamente, los investigadores de otros países tradicionales y/o principales países cerveceros, como México, Bélgica, China, República Checa e Irlanda, han publicado menos del 2,2 % cada uno (Baiano, 2021).

La innovación en la cerveza, incluida la cerveza artesanal, se refiere principalmente a aspectos relativos al perfil y preferencias del consumidor, la sostenibilidad, las materias primas y nuevos ingredientes, el contenido de alcohol, los procesos y tecnologías con énfasis en la búsqueda de la diversidad de las levaduras y las características sensoriales del producto, así como los aspectos relativos a la seguridad alimentaria y la salud del consumidor, con el fin de personalizar un estilo de cerveza o proporcionar un nuevo estilo diferente dirigido a una gran variedad de consumidores. La Tabla 4 recoge una visión general de las investigaciones aplicadas que surgen en respuesta a los nuevos desafíos de la industria cervecera.

**Tabla 4.** Principales objetivos en los que se enfocan las investigaciones en el ámbito de la cerveza artesanal.

Temática	Descripción de los principales objetivos	Referencias
<b>Preferencias y hábitos de consumo</b>	Actitud frente a la compra de cerveza artesanal vs industrial; turismo cervecero, tendencias de consumo y representación social del consumo artesanal, influencia de los estilos, etiquetados, aceptación del producto de acuerdo con el origen de materias primas y fábrica.	(Rivaroli et al., 2022), (Atallah et al., 2021), (Duarte Alonso et al., 2021)
<b>Nuevas Materias Primas</b>	Uso de sustitutos a la malta, malteados y no malteados para hacer cerveza. Uso de vegetales como la batata e introducción de uva en el mosto cervecero.	(Santos et al., 2021), (Piva et al., 2021), (Einfalt, 2021)
<b>Salud</b>	Actividades biológicas de los componentes de la cerveza. Evaluación del consumo moderado de la cerveza sobre la salud. Uso de levaduras y bacterias con actividad probiótica para la elaboración de cerveza. Incremento de la actividad antioxidante de diversos estilos cerveceros y por adición de materias primas ricas en compuestos bioactivos (i.e. polifenoles). Cervezas fortificadas con proteínas o con vegetales para otorgar metabolitos con actividad funcional (brócoli- <i>isatiocianato</i> ).	(Nunes Filho et al., 2021), (Petrón et al., 2021), (Canónico et al., 2021), (Maia et al., 2020), (Gerhards et al., 2021), (Abellán et al., 2021), (González-Zancada et al., 2020)
<b>Seguridad alimentaria</b>	Detección y estrategias de prevención a contaminantes químicos y biológicos en cervezas artesanales como acrilamida, aminos biógenos, micotoxinas, microorganismos alterantes. Presencia de residuos plásticos y microplásticos en cerveza.	(Hernandes et al., 2020), (Schabo et al., 2020), (Shruti et al., 2021) (Peters et al., 2017)
<b>Mejora de procesos y nuevas tecnologías</b>	Reducción del impacto ambiental y residuos cerveceros, mejora de rendimientos, monitorizaciones automáticas, uso de inteligencia artificial para la mejora de la calidad de la cerveza, uso de técnicas de <i>machine learning</i> para la elaboración de estilos de cerveza.	(Cipollaro et al., 2021), (da Costa et al., 2021), (Gonzalez Viejo et al., 2020)
<b>Impacto sensorial Métodos avanzados de análisis</b>	Desarrollo y validación de nuevas herramientas de análisis dirigido y no dirigido (metabolómica) de compuestos con impacto organoléptico (aromas ( <i>fingerprinting</i> o 'huellas' volátiles de la cerveza) en diferentes etapas de elaboración de la cerveza.	(Vasas et al., 2021), (Palmioli et al., 2020), (Pieczonka et al., 2020), (Coelho et al., 2019)
<b>Nuevas levaduras e impacto en la calidad de la cerveza</b>	Uso de levaduras <i>Saccharomyces</i> y no- <i>Saccharomyces</i> , así como de las aisladas de diversas fuentes (miel, chicha, frutos, y otros). Uso de levaduras no convencionales en monocultivo, cultivo mixto o secuencial para la mejora del <i>flavor</i> de la cerveza.	(Giannakou et al., 2021), (Gutiérrez et al., 2018), (Callejo et al., 2019)

Aunque en general la cerveza se considera un producto alimentario relativamente seguro, no está exenta de riesgos asociados con el uso de ciertos aditivos y con la presencia de

algunos microorganismos alterantes y metabolitos microbianos producidos durante el proceso de elaboración. Desde el punto de vista higiénico, la contaminación microbiológica puede marcar la diferencia entre las cervezas industriales y las artesanales, especialmente en el caso de las no pasteurizadas y no filtradas. La cerveza puede contener contaminantes microbianos procedentes de varias fuentes. En particular, el crecimiento de bacterias lácticas alterantes en la producción de cerveza artesanal ha sido hasta el momento poco estudiado en la bibliografía, y se tratará con detalle en los Capítulos I y II de esta Tesis Doctoral.

Por otra parte, puesto que los consumidores habituales de cerveza están demandando productos que ofrezcan un sabor agradable y bien definido, es importante contar con metodologías y herramientas que permitan evaluar y determinar los diferentes compuestos del aroma y *flavor* que afectan a las características organolépticas para obtener un producto que no contenga sabores extraños. De la misma forma, que hay un interés creciente por métodos cada vez más sofisticados para la identificación de nuevas moléculas de aroma y sabor de los estilos tradicionales y más novedosos de cerveza. El análisis sensorial, cada vez más presente en el laboratorio junto con los métodos avanzados de análisis químico, revela la importancia de las moléculas presentes incluso a concentraciones muy bajas y la relevancia de las interacciones entre ellas. La genómica y la transcriptómica cada vez aportan datos más relevantes en la investigación sobre levaduras, y revelan la complejidad del consorcio microbiano, dando a los microbiólogos las claves para actuar frente a alteraciones de la cerveza con origen en sus microorganismos, así como para el uso óptimo de la biodiversidad natural de las especies involucradas en la fermentación y producir cervezas con nuevas propiedades.

En relación al desarrollo de levaduras para la elaboración de cerveza –uno de los aspectos recogidos en la presente Tesis Doctoral– las tendencias de la cerveza artesanal que están ganando popularidad incluyen: la investigación de nuevas levaduras eficientes de *S. cerevisiae*; la creación de híbridos sintéticos *S. cerevisiae*-non-*Saccharomyces* con comportamiento similar a las de las levaduras de cerveza; y la aplicación de levaduras silvestres o seleccionadas no-*Saccharomyces* solas, o en co-cultivo o fermentación secuencial con *S. cerevisiae* para la elaboración de cerveza artesanal (Iattici et al., 2020). La decisión de utilizar levaduras no-*Saccharomyces* está relacionada con el objetivo de modular mejor el pH, el contenido de alcohol, ácidos orgánicos, compuestos volátiles y otros compuestos derivados de la vía metabólica de la levadura, cambiando así las características sensoriales de las cervezas resultantes.

A medida que han ido avanzado las investigaciones han surgido nuevas inquietudes en torno a la cerveza. Sin olvidar que es un producto hedónico y que, por tanto, está siempre sujeto a las percepciones del consumidor, en las últimas décadas han cobrado especial importancia los efectos beneficiosos para la salud, en los que también se ha centrado la presente Tesis Doctoral. Con respecto a la eventual mejora de las propiedades saludables de la cerveza artesanal con respecto a la industrial, se acepta generalmente que las primeras, generalmente sin filtrar y sin pasteurizar, podrían asegurar una gran retención de compuestos beneficiosos para la salud, como los compuestos fenólicos y fibra (Rosales et al., 2021). Así, la relación con la microbiota intestinal podría ser diferente entre los distintos tipos de cerveza, con resultados variables para el huésped. Sin embargo, se dispone de muy poca información sobre el potencial impacto de las cervezas artesanales sobre la salud digestiva y la microbiota intestinal, que es otro de los objetivos que cubre esta Tesis Doctoral.

## **1.2. Microbiología y Biotecnología de la Cerveza**

### **1.2.1. Levaduras en la producción de cerveza**

#### **1.2.1.1. Generalidades**

Las levaduras son los organismos eucariotas más simples que existen. Pertenecen al Reino Fungi y dentro de él a la división Eumycota que agrupa a los hongos verdaderos, en concreto las levaduras se incluyen en las subdivisiones Ascomycotina, representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, (o levaduras esporógenas), y la Deuteromycotina, representadas por las levaduras incapaces de formar esporas (no esporógenas). Son hongos unicelulares con forma redonda, ovoide o cilíndrica y bajo determinadas condiciones, algunas especies pueden formar filamentos. Se reproducen asexualmente por gemación o bipartición y, si existe reproducción sexual, las esporas, denominadas ascosporas o basidiosporas, no se forman dentro de un cuerpo fructífero. Son organismos saprofitos que crecen sobre una gran variedad de sustratos de origen vegetal o animal, o bien son parásitos de plantas y animales. Son habitantes normales de nichos donde hay azúcares (flores, frutos y corteza de árboles), y es bien conocido que son responsables de muchas actividades beneficiosas para el hombre, por lo que se les ha utilizado durante milenios para producir alimentos fermentados y bebidas alcohólicas, e incluso antibióticos, vitaminas y enzimas. Las levaduras también son responsables de actividades perjudiciales que incluyen el deterioro de alimentos y productos manufacturados, y la producción de enfermedades infecciosas en el hombre y los animales.

En la elaboración de la cerveza, las levaduras realizan una contribución esencial, ya que a partir de tres ingredientes básicos: agua, malta y lúpulo, producen los diferentes compuestos metabólicos y aromáticos que caracterizan la gran diversidad de estilos de cervezas. La levadura ideal para la elaboración de cerveza debe tener las siguientes características: realizar una fermentación rápida y eficiente de los azúcares, y una consistente producción de compuestos de sabor y aroma; tolerar el estrés del etanol, temperatura y presión osmótica; tener adecuadas características de floculación, viabilidad y vitalidad al re-inocularla y mantener su estabilidad genética.

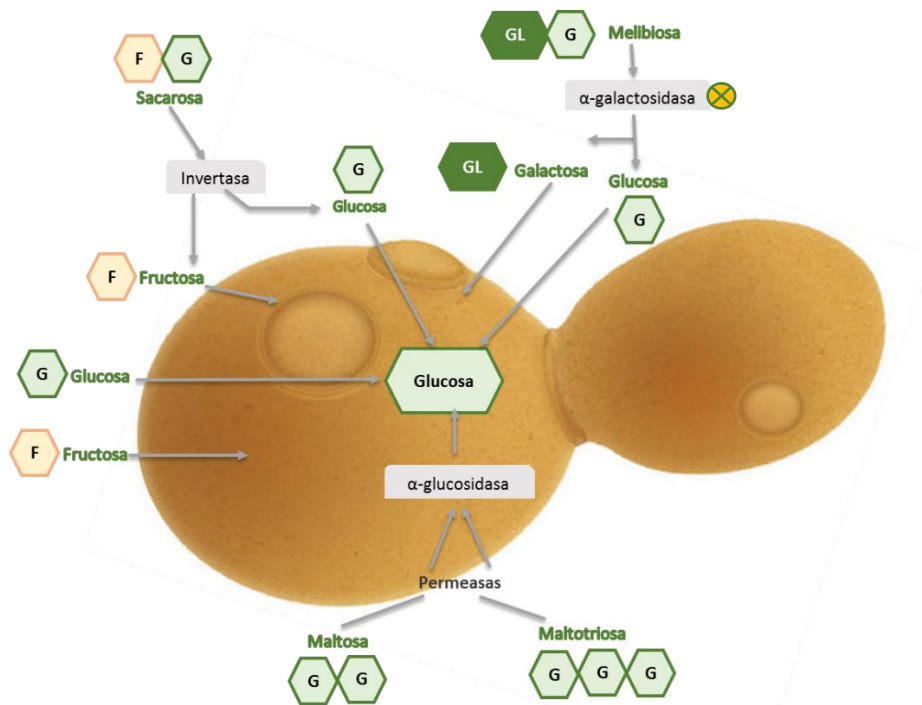
#### **1.2.1.2. Levaduras del género *Saccharomyces***

Desde su desarrollo, la producción de cerveza ha sido un proceso tradicional basado en la fermentación espontánea o en la inoculación con levaduras procedentes de una fermentación anterior. Aunque, como hemos visto en la sección anterior, existe una gran variedad de cervezas que se pueden dividir en dos grandes grupos, de acuerdo con las levaduras implicadas y con las condiciones de fermentación. La cerveza tipo “ale” es producida por levaduras que fermentan en la parte superior de los tanques (levaduras “*top-fermenting*”) y en ocasiones está seguida de un periodo de envejecimiento. La cerveza tipo “lager” es producida por levaduras que fermentan en el fondo de los tanques (levaduras “*bottom-fermenting*”) y seguido de un largo periodo de maduración a bajas temperaturas (“*lagering*”). Las levaduras tipo “ale” pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, mientras que las levaduras tipo “lager” pertenecen bien a la especie *S. bayanus* o *S. pastorianus* (ambos taxones híbridos entre *S. uvarum* y *S. eubayanus*, y *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*, respectivamente) (Libkind et al., 2011). Las nuevas tendencias en el uso de levaduras de especies diferentes de las convencionales, las ampliamente denominadas levaduras no-*Saccharomyces*, comprenden mayoritariamente la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol con una mayor aceptación sensorial, cervezas con compuestos funcionales y enfoques de *bioflavoring*, síntesis y regulación de los compuestos que inciden en el *flavor* (aroma y sabor) de la cerveza (Basso et al., 2016).

*Saccharomyces cerevisiae* es la especie predominante en diversos procesos de fermentación industriales además de la cerveza, como son la producción de pan, obtención de bebidas destiladas, elaboración del vino, producción de sidra, sake, así como de bebidas fermentadas tradicionales de diversas regiones del mundo (pulque, masato, *chicha*, cerveza de sorgo, vino de palma, etc.). Las actividades metabólicas de *S. cerevisiae* han sido explotadas por el hombre desde el desarrollo de la agricultura, por lo que se puede considerar el

microorganismo más importante desde el punto de vista económico (Favaro et al., 2019; Johnson, 2013). Por su parte, *S. pastorianus* es el principal organismo productor de cerveza *lager* en el mundo.

Estas especies de levaduras poseen una serie de características cruciales que hacen que sean preferibles a nivel industrial. En primer lugar, tienen una excelente capacidad de transformar la amplia gama de azúcares asimilables presentes en el mosto cervecero (Figura 8) produciendo dióxido de carbono y altas concentraciones de etanol, lo cual ayuda a proteger las bebidas contra el deterioro microbiano. Además, al ser la fermentación el modo preferido de su metabolismo, las células favorecen la fermentación sobre la respiración (efecto Crabtree) incluso al comienzo de la fermentación cuando el oxígeno todavía está disponible y tienen alta tolerancia al etanol (Steensels & Verstrepen K., 2014). Como consecuencia del metabolismo de estas levaduras también se producen metabolitos secundarios (aldehídos, ésteres y alcoholes) a muy bajas concentraciones con características sensoriales deseables. La inoculación de cultivos de levadura pura, monocultivos, proporciona un mejor control del proceso, asegura una fermentación rápida y completa y, como resultado, mejora la reproducibilidad del producto final y da una calidad constante.



**Figura 8.** Asimilación de azúcares por *Saccharomyces* spp.; (X), específico de *S. pastorianus*.

Adaptada de (Stewart et al., 2017).

### 1.2.1.3. Levaduras no-convencionales en la industria cervecera

Recientemente, la rápida expansión en el número de cervecerías artesanales y el surgimiento de nuevos estilos de cerveza, dentro de un mercado altamente competitivo, ha influido en el uso de materias primas alternativas y nuevas levaduras con el fin de realzar el *flavor* de la cerveza y diversificar portafolios con cervezas diferenciales y novedosas. En la actualidad, una forma de responder a estos nuevos patrones de consumo es la innovación con el uso de levaduras no-convencionales, ya que solo hay un pequeño número de ellas disponibles comercialmente para la elaboración de cerveza, a pesar de los grandes volúmenes producidos a nivel mundial ( $1910 \times 10^6$  hL, 2019). Por ello, la búsqueda de cepas silvestres de levaduras no convencionales, con potencial aplicación en la elaboración de cerveza que satisfagan estas necesidades, es un gran desafío para investigadores y la industria cervecera.

Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces*, se han propuesto algunas cepas como levaduras monocultivo, pertenecientes a las especies de *Torulaspota delbrueckii* (Canónico et al., 2016; Michel, Kopecká, et al., 2016; Tataridis et al., 2013; Toh et al., 2020); *Lachancea fermentati* (Bellut et al., 2020; Bellut, Michel, Hutzler, et al., 2019); *Lachancea thermotolerans* (Canónico et al., 2019; Domizio et al., 2016; Osburn et al., 2018; Toh et al., 2020; Zdaniewicz et al., 2020); *Makria gélida* (de Francesco et al., 2018); *Brettanomyces* (Colomer et al., 2020; Holt et al., 2018), *Saccharomyces jurei* (Giannakou et al., 2021); *Pichia anómala* y *Zygoascus meyeræ* (Larroque et al., 2021), y *Hanseniaspora uvarum* (Matraxia et al., 2021). En la Figura 9 se detallan las distintas especies de levaduras no convencionales, sus características y aplicaciones más relevantes para su uso potencial en la producción de cerveza.

También se ha evaluado el efecto de cultivos mixtos que utilizan cepas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, bien co-inoculadas o por inoculación secuencial en el mosto de cerveza. Estos estudios incluyen *Pichia kluyveri* y *Brettanomyces* (Holt et al., 2018), *P. kluyveri* y *S. cerevisiae* (S. Saerens & Swiegers, 2014), *Zygotulaspota florentina* y *S. cerevisiae* (Holt et al., 2018), *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (Canónico et al., 2017), *Hanseniaspora guilliermondii* y *Hanseniaspora. opuntiae*, ambas con *S. cerevisiae* (Bourbon-Melo et al., 2021), *Dekkera bruxellensis* y *S. cerevisiae* (Coelho et al., 2020). En todos estos estudios, se ha descrito que el uso de especies de levaduras no-*Saccharomyces*, realza el *flavor* de la cerveza. Por ello tiene gran interés estudiar las actividades enzimáticas de las levaduras relacionadas con las propiedades organolépticas de la cerveza, como la actividad glucoamilasa o  $\beta$ -glucosidasa. Esta permite la biotransformación de precursores aportados por la malta o el lúpulo a través de la hidrólisis de enlaces glicosídico, en azúcares disponibles para fermentación y compuestos aromáticos (Haslbeck et al., 2018; Sharp et al., 2017).

	Características				Aplicaciones				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ale) *	●	●	○	○	○	○	○	○	Saccharomycetaceae
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Kveik) *	●	○	○	○	●	○	○	○	
<i>Saccharomyces eubayanus</i> *	○	●	○	○	●	○	○	○	
<i>Torulaspota delbrueckii</i> *	●	●	○	○	●	●	○	○	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	○	○	○	○	○	●	○	○	
<i>Lachancea thermotolerans</i> *	○	○	●	○	●	○	○	●	
<i>Lachancea fermentati</i> *	○	○	○	○	○	●	○	●	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	●	○	○	○	●	○	○	○	Saccharomycodaceae
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	●	○	○	○	○	●	○	○	
<i>Hanseniaspora uvarum</i> *	○	○	●	○	●	○	○	●	
<i>Hanseniaspora vineae</i>	○	○	○	○	○	○	○	●	Phaffomycetaceae
<i>Cyberlindnera mrakii</i>	○	○	○	○	○	●	○	○	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> *	●	●	○	○	●	○	○	●	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> *	●	●	●	●	●	○	●	○	Pichiaceae
<i>Brettanomyces anomalus</i> *	●	●	●	●	●	○	●	○	
<i>Pichia kluyveri</i> *	●	○	○	○	●	●	○	○	
<i>Pichia terricola</i>	○	○	●	○	●	○	○	○	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	○	○	●	○	●	○	○	○	Debaryomycetaceae
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	○	○	●	○	●	●	○	○	
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	○	○	○	○	○	○	○	●	Schizosaccharomycetaceae
<i>Mrakia gelida</i>	○	○	○	○	○	●	○	○	Mrakiaceae (Basidiomycota)
	Ésteres	Fenoles (POF)	β-glucosidasa	Glucosamilasa	Bioflavoring	NABLAB	Bajas calorías	Sour	

**Figura 9.** Levaduras no convencionales de interés para el sector cervecero. (POF), producción de compuestos fenólicos no deseados; (NABLAB), cervezas sin alcohol o bajas en alcohol; (\*), especies comercialmente disponibles; (●), presentan las características y/o aplicaciones detalladas; (○), no presentan las características y/o aplicaciones detalladas; (●), las características y/o aplicaciones detalladas son cepa-dependiente. Tomado de (Burini et al., 2021).

Por otra parte, es crítico evaluar su capacidad de formación de los grupos de compuestos que normalmente no son deseables en cerveza, como son los compuestos fenólicos *off-flavor*, denominadas levaduras POF+, así como de compuestos distintivos como los aromas y sabores afrutados y cítricos deseables, para elaborar cervezas de gran complejidad y singularidad.



#### 1.2.1.4. Contribución de las levaduras a las propiedades sensoriales de la cerveza

Aunque las materias primas son prácticamente uniformes para todos los estilos de cerveza, algunos aromas y sabores son únicos con respecto a las cervezas producidas tradicionalmente y parecen estar relacionados con el metabolismo de las cepas de levadura durante la maduración (Humia et al., 2019). La fracción volátil de la cerveza incluye más de 800 compuestos diferentes, pero solo algunas decenas tienen *flavor* activo (Olaniran et al., 2017). La gran mayoría de estos compuestos se producen durante la fermentación alcohólica (Pires et al., 2014) y son intermediarios metabólicos o subproductos de la levadura que inciden tanto de manera positiva como negativa en la calidad y el *flavor* final de la cerveza. Los compuestos que son responsables del aroma y sabor son principalmente los ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos, fenoles volátiles y los compuestos azufrados (Pires et al., 2014; Ravasio et al., 2018; Vanderhaegen et al., 2003; Verstrepen et al., 2003). Los ésteres se pueden dividir en ésteres de acetato (por ejemplo, acetato de isoamilo, isobutilo y feniletilo) y ésteres etílicos (por ejemplo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo) (Loviso & Libkind, 2018). En el caso de los alcoholes, la cerveza contiene aproximadamente 40 compuestos de alcoholes superiores incluyendo l-propanol, isobutanol, feniletanol, alcohol amílico e isoamílico (Loviso & Libkind, 2019). En recientes estudios se han descrito los compuestos del aroma producidos por algunas levaduras no-*Saccharomyces* y sus principales descriptores aromáticos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Compuestos del aroma producidos por algunas levaduras no-*Saccharomyces* y sus descriptores aromáticos.

Levadura	Compuestos del aroma	Descriptores aromáticos	Referencia
<i>Cyberlindnera</i> spp.	Acetato de isoamilo Acetato de etilo	Plátano, pera, afrutado. Solvente	(Bellut, Michel, Zarnkow, et al., 2019; van Rijswijck et al., 2019)
<i>B. anómala</i> <i>B. bruxellensis</i>	Ácido acético 4-Etilfenol 4-Etilguaiacol Ésteres de etilo	Vinagre Clavo Cuero Afrutado (piña)	(Colomer et al., 2020) (Basso et al., 2016)
<i>H. uvarum</i>	Acetato de isoamilo Acetato de etilo	Plátano, pera, afrutado. Solvente	(Matraxia et al., 2021)
<i>P. kluyveri</i>	Acetato de isoamilo Acetato de isobutilo	Plátano, pera. Afrutado	(Holt et al., 2018)
<i>T. delbrueckii</i>	Acetato de isoamilo Butirato de etilo Acetaldehído	Plátano Pera Manzana verde	(Holt et al., 2018) (Callejo et al., 2019)
<i>S. ludwigii</i>	3-metil-2-butanol Acetato de etilo e isoamilo	Afrutado Banana, dulce	(de Francesco et al., 2015) (Bellut & Arendt, 2019)

En conclusión, en la selección de levaduras con potencial cervecero es muy importante evaluar la capacidad de las distintas especies para producir los distintos compuestos aromáticos lo que permitirá conocer la posible aplicación de estas levaduras como cultivo puro o mixto en los diferentes estilos de cerveza con la finalidad de mejorar el perfil organoléptico y obtener sabores distintos. Por ejemplo, en (Callejo et al., 2019), evaluaron la calidad organoléptica de la cerveza producida con cuatro levaduras no convencionales: *Schizosaccharomyces pombe*, *T. delbrueckii*, *Saccharomycodes ludwigii* y *L. thermotolerans* como cultivos puros y como cultivo iniciador secuencial, fermentación secundaria después de *S. cerevisiae*, el cual generó mayor cantidad de ésteres y de alcoholes superiores confiriendo así unos mejores atributos sensoriales.

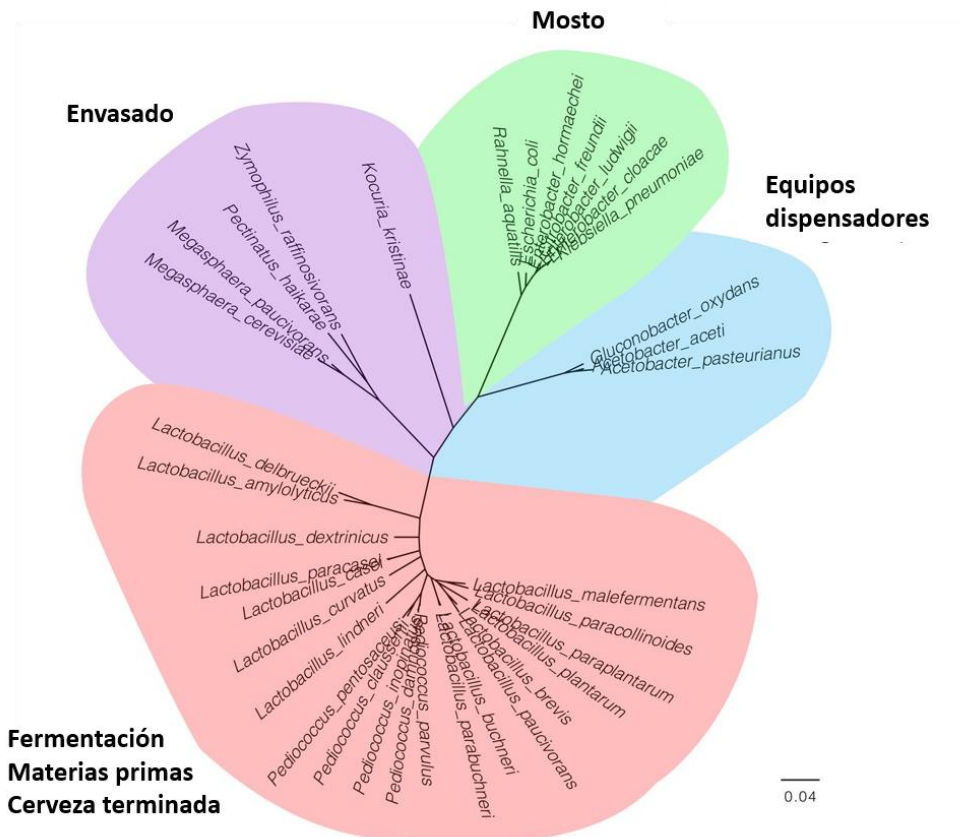
### **1.2.2. Contaminantes microbianos en la producción de cerveza**

#### **1.2.2.1. Generalidades**

La Figura 10 muestra los nichos ecológicos y principales grupos taxonómicos de las bacterias deteriorantes en cervecería: Lactobacillales, bacterias acéticas (Rhodospirillales), Enterobacteriaceae y Veillonellaceae. Actualmente no existe una estadística de los casos de contaminaciones microbianas en fábricas de cerveza artesanal, sin embargo, en el medio cervecero es bien conocido su existencia y se estima que un 70 % de las contaminaciones en cervezas son causadas por bacterias que pertenecen al grupo de las bacterias ácido-lácticas (BAL) (Gram positivas) (Garofalo et al., 2015), debido principalmente a que muchas de ellas han desarrollado resistencia a los compuestos antimicrobianos provenientes del lúpulo, pudiendo crecer en la cerveza y producir un exceso de ácido láctico, diacetilo, turbidez y *flavor* desagradable (Esmaeili et al., 2015) haciéndola imbebible en algunos casos.

En el grupo de las bacterias Gram negativas que deterioran la cerveza, existen especies anaerobias y aerobias. En el primer grupo se encuentra los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Propionispira*, *Selenomonas* (Juvonen, 2015); y en el segundo grupo a *Zymomonas*, ciertas especies de Enterobacteriaceae y bacterias acéticas como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Paradh, 2015). En la actualidad las contaminaciones de cerveza producidas por bacterias Gram negativas aerobias son bastante menos frecuentes en comparación a las que se producen por las BAL. *Pectinatus* y *Megasphaera* al ser estrictamente anaerobias afectan principalmente a las cervezas con contenidos en alcohol hasta 4,5 % ABV y fabricadas en cervecerías con sistemas de automatización modernos que mantienen muy bajos niveles de oxígeno creando un medio ambiente adecuado para su crecimiento. *Pectinatus* es una bacteria recurrente que no solo provoca sedimentos y turbidez, también genera un olor a huevo

podrido y un *flavor* extremadamente desagradable, asociado a la producción de sulfuro de hidrógeno (Rodríguez-Saavedra, González de Llano, et al., 2021). Ocasionalmente, la cerveza puede estar contaminada por poblaciones mixtas de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* y *Megasphaera*, y este deterioro ocurre en dos fases, en primer lugar, las BAL eliminan el oxígeno residual y producen ácido láctico que servirá como fuente de carbono para *Pectinatus* y *Megasphaera* (Back, 2005).



**Figure 10.** Filogenia de las principales bacterias deteriorantes en cervecería. Las bacterias están coloreadas por nicho ecológico y grupo taxonómico. *Lactobacillales* (rosa); bacterias ácido-acéticas (*Rhodospirillales*) (azul); *Enterobacteriaceae* (verde); *Veillonellaceae* (púrpura). Tomado de (Bokulich & Bamforth 2013).

A pesar de que se elaboran cervezas de fermentación espontánea con cepas salvajes de levadura, algunas levaduras silvestres que no se hayan introducido intencionalmente en la cerveza producen deterioro a nivel sensorial por la generación de compuestos fenólicos volátiles similares al humo o sudor (*off-flavors*), además de provocar turbidez y excesiva carbonatación, así como una disminución del cuerpo de la cerveza. Las especies del género *Dekkera* (*Brettanomyces* en su forma anamorfa) pueden ser agentes perjudiciales cuando se ha efectuado procesos erróneos de embotellado y se conserva oxígeno, ya que producen ácido

acético y un alto nivel de resistencia a la carbonatación (Gray et al., 2011). Otras especies de levaduras alterantes pertenecen a los géneros, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota*, *Williopsis* y especies no cervceras del género *Saccharomyces* (Stewart et al., 2017). Respecto a los hongos causantes de las contaminaciones, estos provienen de la materia prima, principalmente de los granos, y pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium*, los cuales pueden ocasionar efectos perjudiciales en la cerveza como la reducción de gases y la producción de micotoxinas (Mastanjević et al., 2019).

### **1.2.2.2. Bacterias lácticas alterantes de la cerveza**

Las BAL son prevalentes en la naturaleza y están asociadas con materia vegetal y humanos, entre otros ambientes, por lo que su entrada a las cervcerías es frecuente e inevitable y su amplia distribución en las cervcerías es incuestionable (Bokulich et al., 2015). Se consideran los principales microorganismos alterantes en cervcería, ya que tienen la capacidad de crecer y alterar el producto a medida que avanza la fermentación, disminuye el pH y el contenido de oxígeno y las levaduras van liberando al mosto metabolitos que estimulan su crecimiento (Vaughan et al., 2005).

Por otro lado, la contaminación por BAL es un problema aún sin resolver, especialmente en la producción de cerveza artesanal, ya que además de causar deterioro en la cerveza, las BAL puede persistir en biopelículas que desarrollan en las superficies de equipos y ambientes de elaboración y producir contaminaciones secundarias (Garofalo et al., 2015). Diferentes estudios, han descrito numerosos casos de la presencia de BAL en numerosas muestras de cerveza artesanal de distintas localizaciones de todo el mundo, por ejemplo, las tasas fueron alrededor del 15 % en EE. UU. (White, 2008), un 27,5 % en el caso de la cerveza artesanal australiana (Garry Menz et al., 2010) y hasta un 81 % en cerveza artesanal coreana (Jeon et al., 2015), y también se han descrito casos de deterioro por microbios no identificados en cervezas enlatadas (Rodhouse & Carbonero, 2019).

Las BAL son un grupo muy heterogéneo pero todas ellas tienen en común la capacidad de producir ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos, son catalasa y oxidasa negativas, ácido-tolerantes, microerofílicas o aerotolerantes, anaerobias facultativas, tolerantes al alcohol y a pH bajos. Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas, así como del tracto digestivo y urinario, entre otras fuentes (Drider, 2016). Se han descrito cerca de 20 especies de BAL causantes del deterioro de cerveza, y dependiendo de las características fisiológicas de la cepa y de los factores intrínsecos de la cerveza, unas serán más deteriorantes que otras. Las BAL que han

causado el mayor número de incidencias de deterioro en la cerveza pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Menz et al., 2009).

Las bacterias del género *Lactobacillus*, tienen forma de bastones largos o cortos, casi cocoides, en pares o cadenas cortas, con temperatura óptima de crecimiento de 30 a 40 °C; pero las BAL aisladas de ambientes cervecero comúnmente tienen temperaturas óptimas de crecimiento de 19 a 26 °C y a un pH de 4 - 6 (Sakamoto & Konings, 2003) (Suzuki, 2011). A este género pertenece la especie heterofermentativa, *L. brevis*, que tiene la mayor capacidad deteriorante en la cerveza artesanal debido a que la mayoría de sus cepas son lúpulo-resistentes, y es la causante del 50 % de los incidentes en cerveza (Back, 2005) produciendo turbidez, sedimentación y acidificación (Suzuki et al., 2006). Otras especies de *Lactobacillus* también pueden provocar deterioro como *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. lindneri* (Hill A. 2017)(Suzuki, 2015), esta última también suele ser lúpulo-resistente y puede formar sedimentos y turbidez sin ocasionar un *flavor* desagradable. Las especies *L. casei/paracasei*, *L. coryniformis* y *L. plantarum* tienen una débil resistencia al lúpulo, causando turbidez, sedimentación y sabores desagradables a diacetilo (Back, 2005).

Las bacterias del género *Pediococcus*, tienen forma de cocos que se presentan en pares o tétradas inmóviles bajo condiciones favorables, son homofermentativas (Drider, 2016), producen sedimentación y turbidez. El principal agente deteriorante de este género es *P. damnosus*, siendo también la mayoría de las cepas lúpulo-resistentes. A diferencia de *L. brevis*, esta especie produce diacetilo (aroma a mantequilla), además ácidos propiónico y acético, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, e inhibe el crecimiento de levaduras, frenando o ralentizando la fermentación (Hill A. 2017). Otras especies aisladas en el ambiente cervecero son *P. inopinatus*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *P. acidilactici*, (Iijima et al., 2007), aunque no se han descrito incidentes de contaminación con la última (Sakamoto & Konings, 2003). Es importante destacar que las especies contaminantes de *Pediococcus*, se caracterizan por su producción elevada de exopolisacáridos, lo que genera una cerveza espumosa, gelatinosa y con textura aceitosa; y suelen contaminar cervezas *lager* por su habilidad para crecer a temperaturas bajas (22 - 25 °C) (García-García et al., 2017). También tienen la capacidad de adherirse a la levadura cervecera y en ocasiones las induce a la sedimentación prematura u ocasionando fermentaciones tardías (Suzuki, 2011).

Las bacterias del género *Leuconostoc* tienen forma de cocos, cocobacilos o elipsoidales, se presentan en pares o en cadenas cortas, son heterofermentativas productores de diacetilo. Las especies que podrían provocar deterioro en la cerveza son *L. citreum* y *L. mesenteroides*, las cuales, no tienen alta resistencia al lúpulo y solo se ha encontrado con una

frecuencia de alrededor del 1 % (Suzuki et al., 2008); pero su presencia en materias primas como la malta, genera un punto de alerta. Además, existen investigaciones que indican que *L. mesenteroides* puede ser crítico, ya sea por el potencial de deterioro a la cerveza o debido al potencial de formación de biopelículas en las superficies y equipamientos de las cervecerías (Riedl et al., 2017).

### 1.2.2.3. Factores que afectan al crecimiento de microorganismos/BAL en la cerveza

Los factores que hacen que la cerveza sea más o menos susceptible al crecimiento de microorganismos están ligados a su composición e influenciados por las materias primas utilizadas, así como por el proceso de elaboración. Y como se mencionó previamente los de mayor influencia en la estabilidad microbiológica son los factores intrínsecos: el contenido de alcohol, pH, amargor, extracto residual y gases disueltos (Hughes, 2017). El contenido de alcohol en el estilo de cerveza más consumido en el mundo (Pilsen, *lager*) suele estar entre 4 - 6 % ABV, sin embargo, el de las cervezas artesanas oscila en un rango muy amplio, entre 0 - 14 % ABV. El etanol interfiere con las funciones esenciales de la membrana celular de los microorganismos, por ello, cuando el contenido de alcohol es bajo podría aumentar la susceptibilidad del producto al crecimiento microbiano.

El valor del pH de la cerveza depende del contenido en ácidos orgánicos débiles provenientes de la materia prima, o el ácido carbónico presente en el agua de elaboración (Lewis & Bamforth, 2006) y por el consumo de aminoácidos por parte de la levadura durante la fermentación. La mayoría de las cervezas se encuentra en el rango de pH de 3,8 – 4,8; pudiendo llegar a valores cercanos a 3 en unos pocos estilos (*sour, lambic*). Los pH bajos dificultan la actividad enzimática de los microorganismos, por ello, cuando el pH es relativamente alto puede favorecer la pérdida de estabilidad microbiológica, ya que el sustrato presentaría una de las condiciones apropiadas su crecimiento. El pH además de inhibir el crecimiento de muchos patógenos y controlar la contaminación bacteriana, también afecta el crecimiento de la levadura cervecera impactando en la velocidad de fermentación y producción de alcohol.

El amargor, influenciado principalmente por el contenido de  $\alpha$ -iso-ácidos provenientes del lúpulo, se mide en unidades internacionales de amargor (IBU), cuya equivalencia es 1 IBU = 1 ppm o 1 mg L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -iso-ácidos. Éstos generalmente se producen durante la ebullición del mosto y presentan actividad antimicrobiana principalmente contra bacterias Gram positivas (Suzuki, 2011). Debido a que estos compuestos son ácidos débiles, que pueden atravesar la membrana citoplasmática en forma no disociada, actuando como

ionóforos, causando la disipación del gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, reduciendo la fuerza motriz de protones dependiente de nutrientes e interfiriendo con las reacciones enzimáticas esenciales (Behr & Vogel, 2010), así como provocar cambios en la permeabilidad en la pared celular, inhibición de la actividad transportadora de azúcares y aminoácidos y la síntesis de proteínas (Sakamoto & Konings, 2003).

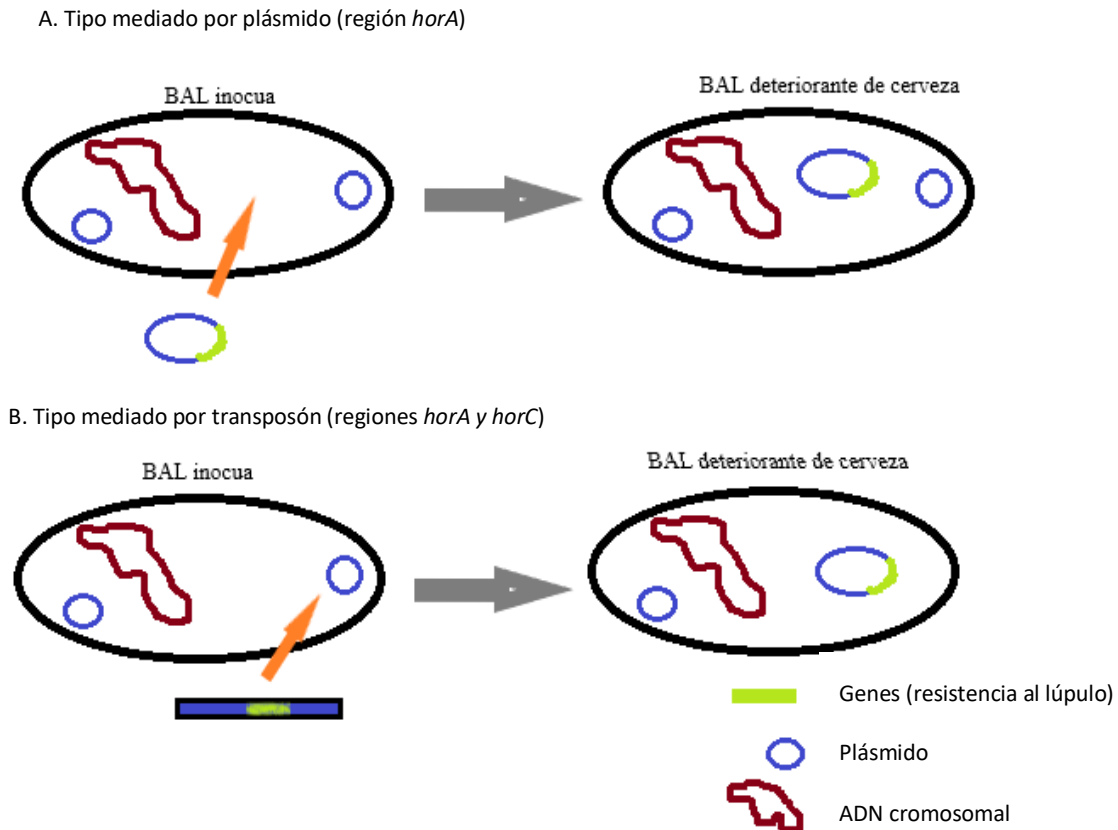
El extracto residual, cantidad de azúcares no fermentables por la levadura que existen en el producto final, favorece la susceptibilidad de la cerveza al crecimiento microbiano. Cuando una cerveza presenta un valor alto de azúcar residual después de la fermentación, estos azúcares podrían ser metabolizados por microorganismos que provocan deterioro. El CO<sub>2</sub> presente en y sobre la cerveza inhibe el crecimiento de muchas bacterias aerobias por la creación de un ambiente anaeróbico, reducir el pH, inhibir enzimas y afectar las membranas celulares de los microorganismos. Las bajas concentraciones de oxígeno en la cerveza dificultan el desarrollo de bacteria aerobias, pero favorece el desarrollo de anaerobias estrictas y facultativas.

Los factores extrínsecos son los tratamientos tecnológicos aplicados antes o durante del envasado de la cerveza, con el fin de reducir la actividad microbiana y/o enzimática. Principalmente son la pasteurización y la filtración. La temperatura de conservación también afecta la calidad del producto terminado sobre todo en cervezas no pasteurizadas, como la cerveza artesanal, donde la levadura permanece viable.

A pesar de todos estos factores existen microorganismos resistentes a estas condiciones adversas que pueden producir turbidez y sabores y olores desagradables alterando la calidad del producto final. Así, las BAL han sido y son las principales causantes del deterioro microbiológico de la cerveza.

#### **1.2.2.4. Habilidad de las bacterias lácticas para crecer en cerveza**

Algunas cepas de BAL pueden sobrevivir y multiplicarse en la cerveza, a pesar de la presencia de los iso- $\alpha$ -ácidos, debido a la expresión de genes relacionados con la resistencia al lúpulo, principalmente los genes *horA*, *horC* e *hitA*. Esta resistencia se consideraba una característica estable codificada en el ADN cromosómico; sin embargo, en la actualidad se cree que se debe a una combinación de genes cromosómicos y de plásmidos que se pueden adquirir por dos modos de transferencia génica horizontal (Suzuki et al., 2006) (Figura 11). Esta hipótesis se ha descrito en base a la similitud de las secuencias de nucleótidos y el análisis de ORF de las regiones de ADN que contienen los genes *horA* y *horC* identificadas en *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides* y *P. damnosus*.



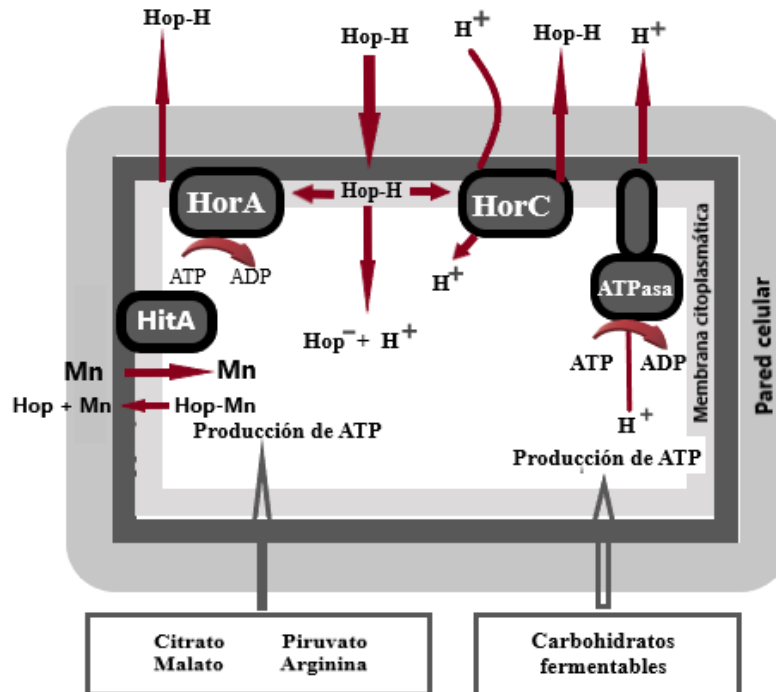
**Figura 11.** Hipótesis de transferencia horizontal de los genes *horA* y *horC*. (A), mediado por plásmido; (B), mediado por transposones. Tomado de (Suzuki et al., 2006).

Cuando los  $\alpha$ -iso-ácidos provenientes del lúpulo alcanzan la célula bacteriana, debido al mayor pH intracelular, los ácidos se disocian internamente disipando así el gradiente de pH transmembrana. Como resultado de la acción protonofórica de los  $\alpha$ -iso-ácidos, disminuye la viabilidad de las bacterias expuestas. Se ha demostrado que HorA pertenece a una familia de transportadores dependientes de ATP (ABC), mientras que HorC es dependiente de la fuerza motriz del protón para excluir los  $\alpha$ -iso-ácidos de las células bacterianas y éstos provocarían una entrada reducida de los ácidos no disociados, limitando el efecto protonofórico antibacteriano (Suzuki, 2011).

Los mecanismos propuestos de resistencia de BAL a los compuestos del lúpulo a través de los genes *horA*, *horC* e *hitA*, sugieren que los compuestos de lúpulo no disociados (Hop-H) (Figura 12) se intercalan en la membrana citoplasmática y son transportados por HorA y HorC. Algunas porciones de Hop-H escapan de las actividades de bombeo de los transportadores y entran al citoplasma, donde se disocia debido al mayor pH interno a la forma aniónica (Hop-) y  $H^+$ , el cual también ingresa al citoplasma por las acciones de HorC. Para evitar la acidificación del citoplasma y minimizar el gradiente de pH transmembranal, se



incrementa la actividad de la ATPasa translocante de protones excretando  $H^+$  a través de la membrana. Los recursos de energía para estos mecanismos se suministran desde los metabolismos del citrato, piruvato, malato y arginina. En algunos casos, los carbohidratos fermentables, como la maltotriosa, pueden utilizarse para producir ATP (Suzuki et al., 2006).



**Figura 12.** Mecanismos propuestos de resistencia a los compuestos del lúpulo a través de *horA*, *horC* e *hitA* de las BAL. Tomado de (Suzuki et al., 2006).

Además de los genes *horA* y *horC*, están también los transportadores de cationes *hitA* y ORF5, los cuales se encuentran comúnmente en plásmidos (Sakamoto & Konings, 2003)(Haakensen, Schubert, et al., 2008). En el caso del gen *hitA* funciona como un mediador de la lúpulo-resistencia, ya que capta cationes divalentes como el  $Mn^{+2}$ , mientras los ácidos provenientes del lúpulo reducen los cationes divalentes intracelulares (Figura 12) (Suzuki, 2011). La acción de contrarrestar el flujo de cationes divalentes es importante en la supervivencia de la bacteria, debido a que muchas proteínas son dependientes de  $Mn^{+2}$ , las cuales están involucradas en la generación de energía y homeostasis redox. El gen ORF5 está altamente correlacionado con la capacidad de deterioro *L. brevis* y *L. paracollinoides* en la cerveza, ya que se ha descrito que la pérdida de este gen ocasiona la pérdida de su capacidad deteriorante en cepas pertenecientes a estas especies (Suzuki et al., 2004).

### 1.2.2.5. Producción de aminas biógenas por las BAL en cerveza

Los alimentos y las bebidas fermentadas tienen una alta probabilidad de acumular mayores concentraciones de aminas biógenas (AB) que los alimentos no fermentados debido a que muchos microorganismos implicados en la fermentación poseen actividad aminoácido-descarboxilasa (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014). Las AB son compuestos de bajo peso molecular producidos mayoritariamente por descarboxilación de ciertos aminoácidos precursores por acción de las BAL (Barbieri et al., 2019) (Tabla 6). Los genes relacionados con la producción de AB codifican enzimas amino descarboxilasas: *hdc*, histidina descarboxilasa; *tdc*, tirosina descarboxilasa; y *odc*, ornitina descarboxilasa, por lo que a través de la detección de estos genes se puede conocer si una bacteria tiene la capacidad genética de producir histamina, tiramina y putrescina, respectivamente, en un ambiente con las condiciones adecuadas (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014; Elsanhoty & Ramadan, 2016).

Las enzimas aminoácido-descarboxilasas pueden producirse y ser inducidas como respuesta adaptativa a la presencia de los aminoácidos precursores en el medio y de las condiciones ambientales que favorezcan su acción enzimática y el crecimiento bacteriano. La combinación de estos factores influye en la diversidad y contenido de AB presentes en los alimentos fermentados. El pH, el contenido de sal y la temperatura pueden afectar a las bacterias productoras de AB, tanto en su crecimiento como en actividad descarboxilasa (Linares et al., 2012) (Karovičová, 2005). En la malta, considerada la principal fuente de AB, y en el mosto se pueden encontrar AB como agmatina, putrescina, espermidina y espermina (Kalač et al., 2002), mientras que durante el proceso de fermentación se ha detectado la producción de tiramina, histamina, putrescina y cadaverina (Loret et al., 2005) (Poveda, 2019).

**Tabla 6.** Principales microorganismos productores de AB en alimentos y bebidas fermentadas según datos de la EFSA (EFSA Panel on BIOHAZ, 2011).

Amina biógena	Alimento	Microorganismo productor
Histamina	Alimentos fermentados	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pediococcus parvalus</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactobacillus saerimneri</i> 30a, <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus buchnerii</i> y <i>Lactobacillus curvatus</i>
Tiramina	Bebidas fermentadas	<i>L. brevis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>Leuconostoc</i> sp.
Putrescina		<i>O. oeni</i> , <i>L. hilgardii</i> y <i>L. plantarum</i> sp.

La mayoría de los casos de intoxicación alimentaria se han reportado en personas sensibles y están relacionadas con la histamina y la tiramina. La histamina se considera la más perjudicial para la salud por su potencial respuesta alérgica o inmunitaria en individuos sensibles (Almeida et al., 2012). Los principales efectos fisiológicos y toxicológicos de las AB que se han descrito tras el consumo de alimentos se encuentran descritos en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Efectos fisiológicos y toxicológicos de las aminas biógenas (Álvarez & Moreno-Arribas, 2014; Linares et al., 2012).

Amina biógena	Efectos fisiológicos	Efectos toxicológicos
Histamina	Neurotransmisor, interviene en la secreción ácido-gástrica, crecimiento y diferenciación celular. Regula el ritmo cardíaco y temperatura del cuerpo. Está implicado en la ingesta de alimentos, aprendizaje y memoria, respuesta inmune, reacciones alérgicas.	Dolor de cabeza, sudoración, secreción nasal, erupción cutánea, trastorno de la presión arterial, edema de párpados, urticaria, dificultad respiratoria, diarrea, taquicardia, mareos, broncoespasmos, incremento del gasto cardíaco.
Tiramina	Vasoconstricción periférica, incremento del gasto cardíaco, aumento de glucosa en sangre y liberación de la adrenalina.	Dolores de cabeza, migraña, trastornos neurológicos, náuseas, vómitos, trastornos respiratorios, hipertensión.
Putrescina	Regulación en la expresión de genes, maduración intestinal en etapa neonatal, crecimiento y diferenciación celular.	Aumento del gasto cardíaco, taquicardia, hipotensión, efectos cancerígenos.

#### 1.2.2.6. Métodos de predicción de la susceptibilidad a la contaminación microbiana

La forma convencional de garantizar la seguridad microbiológica y la estabilidad de los alimentos y nuevas formulaciones es realizar pruebas de desafío (Sperber 2009). En estas pruebas una vez definido el alcance y previa revisión de las características del alimento, se seleccionan microorganismos adecuados para la prueba, entre ellos aquellos que se han aislados previamente del producto en mal estado o son contaminantes naturales en los entornos de producción y conllevan los pasos que a modo de ejemplo se enumeran en la Figura 13. Por lo general, en el inóculo se incluyen varios microorganismos al mismo nivel de crecimiento (UFC), el cual depende de si el interés es la supervivencia o el crecimiento del organismo a ensayar, y se pueden inocular en forma de “coctel” o de manera individual en el

producto. En el caso de la cerveza el deterioro del producto es más perjudicial que la supervivencia de microorganismos, por lo que las tasas de inoculación de  $10^4$  -  $10^5$  mL<sup>-1</sup> son típicamente utilizadas para obtener los resultados en menos tiempo (Menz et al., 2011; Valero et al., 2006). También, el estado fisiológico del organismo de prueba es muy importante, pudiendo ser necesario un período de "adaptación" para activar genes o procesos metabólicos requeridos para el crecimiento en el producto (Lechner et al., 2012).



**Figura 13.** Pasos básicos para la realización de un estudio de desafío microbiológico y modelado estadístico.

Una vez que los microorganismos han sido inoculados en el alimento se procede a la incubación. En la cerveza la mayoría de los microorganismos deteriorantes pueden crecer a 25 - 28 °C en 30 días, no habiendo un riesgo significativo de deterioro tardío por degradación de algún factor intrínseco asociado con la estabilidad microbiológica, ya que los iso- $\alpha$ -ácidos, etanol, ácidos débiles y CO<sub>2</sub> son generalmente estables en el producto. La monitorización debe incluir el análisis de las muestras a intervalos regulares, que a su vez puede implicar la detección y recuento de los microorganismos viables en el producto, o puede centrarse en la detección de cambios significativos en la calidad sensorial del producto (turbidez, color, aroma y sabor, entre otros) (Riedl et al., 2013).

Con los resultados de los análisis realizados, se procede a construir modelos matemáticos para describir y predecir la inactivación, la supervivencia o crecimiento en el alimento. La microbiología predictiva comprende el estudio de la respuesta de crecimiento o de inhibición o de inactivación de microorganismos que están en los alimentos, en función de factores que les afecten (temperatura, pH, gases, etc.) y a partir de estos datos predecir lo que

sucedirá durante el almacenamiento. Esta se ha centrado en la creación de modelos matemáticos y estadísticos para predecir el comportamiento de los potenciales de patógenos en entornos alimentarios. Los modelos predictivos se utilizan hoy en día ampliamente como herramientas de gestión de riesgos en la industria alimentaria ya que reducen potencialmente el tiempo y coste involucrados en las pruebas de desafío microbiano (Juvonen et al., 2011).

En las últimas décadas se ha propuesto la aplicación de modelos de regresión logística en microbiología de alimentos, ya que permiten modelar el límite entre crecimiento/sin crecimiento de microorganismos o modelos G/NG (según su acrónimo en inglés *Growth/No Growth*) cuando se estudian ciertos factores de control, particularmente en productos alimenticios que están al borde de la estabilidad microbiana (Ratkowsky & Ross, 1995) (Debonne et al., 2020). En base a esto, Battey y colaboradores crearon modelos matemáticos para predecir la probabilidad de deterioro por microorganismos en bebidas listas para beber envasadas en frío, ya sea para *Acinetobacter calcoaceticus* o para *Gluconobacter oxydans* en respuesta a diversos sistemas de conservación, y para *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Candida lipolytica* en función de la formulación de la bebida (Battey et al., 2001, 2002; Battey & Schaffner, 2001). Asimismo, se ha validado la aplicabilidad de enfoques de regresión logística para reducir las poblaciones de *Escherichia coli* O157: H7, como una valiosa herramienta para diseñar procesos seguros de sidra de manzana (Uljas et al., 2001). Recientemente, (Munford et al., 2020) modelaron el efecto de inactivación de *Lactobacillus brevis* DSM 6235 a la vez que mantiene la viabilidad de levaduras cerveceras durante su lavado con ácido, sugiriendo que los modelos predictivos validados pueden usarse para definir protocolos de lavado que a su vez reducen desechos y costos para las cervecerías y su entorno.

También se han desarrollado modelos G/NG para microorganismos involucrados en deterioros específicos como en las salsas, que describen la influencia de diferentes condiciones ambientales en la probabilidad de crecimiento, con el fin de trabajar sobre reformulaciones de productos para mantener las salsas estables microbiológicamente durante todo su tiempo de vida (Vermeulen et al., 2007). Estos modelos G/NG permiten calcular la probabilidad de un resultado binario (1/0; crecimiento: G/ sin crecimiento: NG) como una función lineal mediante una combinación de variables de predicción como el pH, el etanol, la actividad del agua y el tiempo. También se han convertido en una herramienta útil para el desarrollo de nuevos productos dulces con menor contenido de conservantes, grasas y azúcares (Marvig et al., 2015).

Hasta el momento no hay estrategias para prever y controlar los microorganismos contaminantes, como las BAL, en la producción de cerveza. La mejora de la calidad de la cerveza implica la caracterización de su microbiota y el conocimiento de los agentes que provocan estas alteraciones y de los factores que pueden contribuir a su desarrollo. Además, existe la necesidad de la generación de modelos de predicción del crecimiento microbiano que puedan usarse como herramientas de fácil implementación, para ello, estos modelos deben ser aplicables independientes de la identificación de la cepa y basarse en los datos fisicoquímicos (pH, IBU y % ABV) de los controles rutinarios realizados por los cerveceros artesanales. Así, en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral, se describe la influencia de los parámetros físico-químicos de la cerveza en el crecimiento de nueve cepas con el fin de diseñar un modelo de regresión logística binaria (RLB) tipo Crecimiento/sin crecimiento (G/NG) que permite determinar la susceptibilidad microbiana de cervezas artesanales, como una herramienta de calificación de fácil uso práctico para el cervecero artesanal durante la elaboración del producto y para la toma de decisiones preventivas y evitar pérdidas económicas sustanciales.

### **1.3. Cerveza y salud humana**

#### **1.3.1. Generalidades**

La dieta es uno de los principales factores que influyen en el estado de salud de las personas, ejerciendo un papel fundamental en el desarrollo y/o prevención de enfermedades crónicas y las asociadas al síndrome metabólico, como la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. En la actualidad, existen numerosas evidencias científicas que demuestran que la ingesta moderada y continuada de bebidas fermentadas, como el vino tinto, modifica la composición y función de la microbiota así como el perfil metabólico de fluidos biológicos (heces, orina), aunque no se ha asociado directamente con la presencia de bacterias intestinales específicas. A su vez, se ha descrito que los metabolitos de origen microbiano derivados de los polifenoles, melanoidinas y la fibra pueden favorecer el crecimiento de bacterias con efectos positivos para la salud e inhibir a patógenos intestinales, lo que sugiere que estos compuestos pueden influir en la composición de la microbiota intestinal y en su capacidad metabólica afectando tanto a la función digestiva de individuos sanos como a otras disfunciones (patologías, infecciones, etc.).

La cerveza es una bebida con una composición compleja y diversidad de nutrientes, como carbohidratos, aminoácidos, minerales y vitaminas (Tabla 8), así como compuestos

bioactivos, como polifenoles y fibra. Además, la cerveza es una fuente de melanoidinas, que pueden actuar sinérgicamente con compuestos fenólicos y conferir beneficios para la salud (Rivero et al., 2005). En comparación con un otras bebidas de ingesta común, la cerveza tiene el potencial de ser una mejor fuente de algunas vitaminas y minerales que, por ejemplo, la leche o el zumo de naranja, siendo una potencial fuente vegana de vitamina B12 y ácido fólico (Mellor et al., 2020). Además, la cerveza es la principal fuente alimenticia de isoxantohumol, precursor de la 8-prenilnaringenina, el fitoestrógeno más fuerte identificado hasta la fecha relacionado con la remisión de síntomas perimenopáusicos (Trius-Soler et al. 2021).

**Tabla 8.** Composición nutricional de la cerveza y comparación con otras bebidas comunes (Mellor et al., 2020).

Nutriente	Rango en cerveza por 100 mL	Cantidad en una bebida común por 100 g
Energía (Kcal)	15 – 110	Leche 35 – 70
Carbohidratos (g)	0 – 6,1	Leche 5,0
Azúcar (g)	0 – 6,1	Zumo de naranja 8,5
Proteína (g)	0,3 – 0,5	Leche 3,5
Vitamina C (mg)	Hasta 30	Zumo de naranja 22 – 48
Riboflavina (mg)	0,002 – 0,08	Leche 0,23
Niacina (mg)	0,3 – 0,8	Leche 0,2
Vitamina B6 (mg)	0,007 – 0,17	Leche 0,06
Folato (µg)	4 – 60	Leche 8
Vitamina B12 (µg)	0,3 – 3	Leche 0,9
Sodio (mg)	4 – 23	Zumo de naranja 3
Potasio (mg)	33 – 110	Zumo de naranja 164
Hierro (mg)	0,01 – 0,05	Leche 0,2
Zinc (mg)	0,001 – 0,148	Leche 0,5
Selenio (µg)	Hasta 0,72	Leche 1,0
Polifenoles totales (mg)	12 – 52	Té negro 104,48

El consumo excesivo de alcohol (incluida la cerveza) ejerce efectos nocivos en el cuerpo humano, con mayores riesgos para muchos órganos, principalmente para el hígado. En el contexto del consumo de bebidas como la cerveza y el vino, los estudios científicos realizados durante décadas sugieren que su consumo moderado dentro de la dieta puede ejercer efectos beneficiosos para la salud. Aunque el papel del etanol no puede ser excluido, el elevado contenido en polifenoles en los dos tipos de bebidas se ha relacionado con sus efectos protectores, a diferencia de los licores y bebidas de alta graduación alcohólica.

Los efectos de los compuestos de la cerveza en los sistemas biológicos han recibido especial atención por parte de la comunidad científica. Estudios *in vitro* o en animales, han sugerido su potencial efecto antioxidante, anticarcinogénico (Jiang et al., 2018), antiinflamatorio y antiviral (Machado et al., 2017), entre otros (Figura 14). Específicamente, el lúpulo utilizado para elaborar cerveza proporciona aceites esenciales, flavonoides y ácidos amargos que son potentes antioxidantes y moduladores de la respuesta inmune (Marcos et al., 2015).



**Figura 14.** Propiedades beneficiosas de las fracciones no alcohólicas de la cerveza y sus potenciales compuestos responsables (Salanță, Coldea, Ignat, Pop, Tofană, Mudura, Borșa, Pasqualone, Anjos, et al., 2020).

Hasta el momento, los efectos más consensuados y de los que se dispone de más evidencias científicas en humanos se refieren a un efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares (de Gaetano et al., 2016; Osorio-Paz et al., 2019). Un metaanálisis reciente destaca efectos sobre la mejora de la función endotelial, la elasticidad vascular y del perfil lipídico con un aumento significativo de los niveles séricos de HDL y apolipoproteína A1 (Spaggiari et al., 2020). En esta línea, el consumo moderado de cerveza sin alcohol también mejoró el perfil lipídico y disminuyó la presión arterial en mujeres posmenopáusicas (Trius-Soler et al., 2021). Por otro lado, los datos de estudios recientes indican un papel favorable de los alimentos ricos en polifenoles, incluida la cerveza, y de la ingesta de polifenoles en los biomarcadores de inflamación y, posiblemente, en la prevención de enfermedades relacionadas con la inflamación (Bonaccio et al., 2014; Pounis et al., 2016). A pesar del



creciente interés por la posible asociación entre la dieta y las enfermedades neurodegenerativas, sólo unos pocos estudios de intervención en humanos han incluido datos sobre el consumo de cerveza (Sánchez-Muniz et al., 2019). Tampoco se dispone de suficientes datos sobre el consumo de cerveza y la función hepática y la función digestiva humana.

Dado que estudios recientes han sugerido una posible relación entre compuestos bioactivos mayoritarios de la cerveza, como los polifenoles, melanoidinas y fibra, y la composición y la función de la microbiota intestinal y la salud humana (Moreno-Arribas et al., 2020; Quesada-Molina et al., 2019), es esencial evaluar específicamente cómo estos componentes en los diferentes estilos de cerveza pueden tener efectos sobre la salud a través de la modificación del perfil y la abundancia de la microbiota colónica. A continuación, se describe el estado de la evidencia científica en este contexto.

### **1.3.2. Polifenoles como compuestos bioactivos de la cerveza**

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en los vegetales. Se encuentran en las plantas superiores, especialmente en los frutos, lo que hace que se consuman de manera habitual en la dieta. En una reciente identificación de las fuentes dietéticas más ricas en polifenoles (Pérez-Jiménez et al., 2010) utilizando los datos de composición de alimentos de la base de datos *Phenol-Explorer*, las porciones de cerveza normal y negra de 550 mL ocuparon los puestos 57 y 66, respectivamente. El contenido en polifenoles total de las mismas raciones se estimó en 22 mg para la cerveza típica y 10 mg para la cerveza negra.

En la cerveza, la mayoría de los compuestos fenólicos (70 – 80 %) derivan de la malta (Wannenmacher et al., 2018), mientras que el resto proviene del lúpulo. La composición fenólica de las cervezas depende de la calidad y cantidad de materias primas, los parámetros de la elaboración de la malta y la cerveza, del estilo de cerveza, y de las operaciones unitarias adoptadas por cada cervecería (H. Zhao, 2015). Por ejemplo, durante la ebullición del mosto se produce, inducido por calor, un cambio drástico en la composición fenólica, como la oxidación, polimerización e isomerización de los polifenoles (de Keukeleire, 2000; Vinson et al., 2003) y durante la clarificación también hay una pérdida de estos compuestos debido a que las células de levadura y el *trub* frío son eliminados por filtración (Fumi et al., 2011).

El contenido total de polifenoles (TPC) varía incluso dentro de un mismo estilo de cerveza (Tabla 9). Se han descrito altos contenidos de TPC en los estilos Bock (Moura-Nunes et al., 2016) y Brown ale (Granato et al., 2011; Piazzon et al., 2010). En contraste, el TPC en las

cervezas sin alcohol son más bajas que en las cervezas estándar tipo *lager*, probablemente porque hay una mayor extracción de los compuestos fenólicos en alcohol por su mayor solubilidad que en agua; además de las diferencias en la duración de la fermentación, las cepas de levadura empleadas y a las pérdidas provocadas por los procesos de desalcoholización.

**Tabla 9.** Contenido total de polifenoles en diferentes estilos y marcas de cerveza

Estilo	TPC	Referencia	Marca	TPC	Referencia
Lager Dark	376 473	(Lugasi, 2003)	Reeb Duvel Samuel	152 160* 230*	(H. Zhao et al., 2010)
Desalcoholizado Bock	366 875	(Piazzon et al., 2010)	Corona Asahi	230* 230*	
Lager Brown ales	120 – 200 116 – 526	(Granato et al., 2011)	San Miguel Beck's	260* 280*	
Pils lager	280	(Djordjevic et al., 2016)	Heineken Grolsh	310* 320*	
Indian Lagers	160 – 620	(Pai et al., 2015)	Carlsberg	339	
Golden ale	242	(Ulloa et al., 2017)	Leffe Dark Leffe Blond	544 445	(Gorjanović et al., 2010)
Lager	160 – 240	(Li et al., 2016)	Guinness Extra Stout	447 300	
Dark Lager Sin alcohol	234 – 408 115 – 278 74	(Ditrych et al., 2016)	Stella Artois Budweiser Hoegaarden	350 270 242	
Cerveza de frutas	399 – 767	(Nardini & Garaguso, 2020)	Landbier Guinness Skol	61 132 361	
Añejado en barril	536 – 1035	(Sanna & Pretti, 2015)	Pilsner Urquell	332	(Sanna & Pretti, 2015)

\* Valor aproximado; (TPC); Contenido total de polifenoles en mg de ácido gálico equivalente (GAE) L<sup>-1</sup>

Desde el punto de vista químico, el término polifenol engloba a un grupo amplio y heterogéneo de compuestos que se caracterizan por presentar un anillo aromático con, al menos, una sustitución hidroxilo y una cadena lateral funcional. Entre las principales familias de compuestos fenólicos presentes en la cerveza podemos distinguir los prenilflavonoides, flavonoles (kaempferol y quercetina), feniletanoide (tirosol),  $\alpha$ -ácidos (humulona y sus análogos) y  $\beta$ -ácidos (lupulona y sus análogos), ácido ferúlico, ácido hidroxicinámico, ácido gálico, ácido sináptico y rutina (Moura-Nunes et al., 2016; Nardini & Guiselli, 2004; Pai et al., 2015; Piazzon et al., 2010; H. Zhao et al., 2010). Los prenilflavonoides, xantohumulol, isoxantohumulol y 8-prenilnaringenina están presentes casi exclusivamente en el lúpulo, siendo la cerveza prácticamente el único alimento en el que se pueden encontrar (Djordjevic et al., 2016). La Tabla 10 muestra los principales compuestos fenólicos y sus cantidades máximas descritas en cerveza.

**Tabla 10.** Compuestos fenólicos y sus cantidades máximas descritas en cerveza.

<b>Fenoles simples</b>	<b>mg/L</b>	<b>Ácidos fenólicos</b>	<b>mg/L</b>
Vinil-4-fenol	0.15	4-Hidroxifenilacético	2.82
Vinil-4-guayacol	0.55	3,4-dihidroxifenilacético	5.77
Etil-4-fenol	0.01	Gentésico	0.38
Isoeugenol	0.04	Salicílico	2.87
Tirosol	44.4	Alfa-resorcílico	0.35
Propil-4-siringol	0.20	Homovaníllico	0.05
Hidroxitirosol	0.13		
<b>Flavanonas</b>	<b>mg/L</b>	<b>Ácidos cinnámicos</b>	<b>mg/L</b>
Isoxantohumulol	3.44 (14.20)	p-Coumárico	2.55 (7,0)
8-Prenilnaringenina	0.24 (5.30)	m-Coumárico	0.33
6-Prenilnaringenina	0.56	o-Coumárico	3.74
6-Geranylaringenina	0.07	5-Caffeoilquínico (5CQA)	0.80
Naringenina	2.34	4CQA y 3CQA	(10.25)
Naringina	2.63	Cafeico	1.51 (5.90)
Hesperitina	2.00	Ferúlico	16,60 (15.80)
Gliciteina	0.04	Sinápico	6.16 (7.50)
Taxifolina	1.00	Clorogénico	10.96
		Neoclorogénico	18.48
<b>Derivados del ácido benzoico</b>	<b>mg/L</b>	<b>Flavonoles</b>	<b>mg/L</b>
3,5-Dihidroxibenzoico	0.30	Kaempferol	16.40
2,6-Dihidroxibenzoico	0.92	Kaempferol-3-ramnósido	1.00
2-Hidroxibenzoico	2.00	Quercetina	10
3-Hidroxibenzoico	0.30	3,7-Dimetilquercetina	0.003
4-Hidroxibenzoico	16.84 (10.30)	Miricetina	0.16 (5.31*)
Protocatecico	5.10	Quercetina 3-O-arabinósido	0.006
Vanílico	7.17 (14.20)	Quercetina 3-O-rutinósido	0.90
Gálico	14.67 (6.70)	Quercitrina	2.30
Siríngico	1.36 (4.70)	Isoquercitrina	1.00
Vanilina	1.60	Morina	0.96
Siríngico aldehído	0.70	Rutina	1.80
<b>Flavonoles</b>	<b>mg/L</b>	<b>Proantocianidinas</b>	<b>mg/L</b>
(+)-Catequina	5.40 (27.10)	Procianidina B3	3.10
(-)-Epicatequina	3.30 (6.10)	Prodelfinidina B3	3.30
Catequina gallato	20	Prodelfinidina B9	3.90
Epicatequina gallato	20	Procianidina C2	0.30
<b>Isoflavonas</b>	<b>mg/L</b>	<b><math>\alpha</math>-ácidos and <math>\beta</math>-ácidos</b>	<b>mg/L</b>
Daidzeina	0.36	Cohumulona	7.10
Genisteina	0.08	Humulona	5.10
Formononetina	1.30	Lupulona	6.80
Biochanina A	0.06	Colupulona	5.10
<b>Alquilfenoles</b>	<b>mg/L</b>	<b>Chalconas</b>	<b>mg/L</b>
3-Metilcatecol	0.03	Xantohumulol	1.20 (5.30)
4-Etilcatecol	0.01	Desmetilxantohumulol	Traces
4-Metilcatecol	0.02	<b>Iso-<math>\alpha</math>-ácidos (iso-humulonas)</b>	100
<b>Flavonas</b>	<b>mg/L</b>	<b>Otros polifenoles</b>	<b>mg/L</b>
Apigenina	0.81	Catecol	0.10
Luteolina	0.19	Pirogalol	0.30
		Resveratrol	(2.24*)

Los valores entre paréntesis corresponden a los niveles encontrados en cervezas artesanales, mientras que en (\*) corresponden a cervezas afrutadas. De los datos publicados por (Alonso-García et al., 2004; Boronat et al., 2020; Cortese et al., 2020; Dvořáková et al., 2008; Estruch et al., 2011; Floridi et al., 2003; Gerhäuser, 2005; Kellner et al., 2007; Kuhnle et al., 2008; Marova et al., 2011; Moura-Nunes et al., 2016; M Nardini & Guiselli, 2004; Mirella Nardini & Garaguso, 2020; Piazzon et al., 2010)

Los polifenoles contribuyen en gran medida al sabor, el color y la textura de la cerveza, pero la característica que hace que estos compuestos sean tan relevantes es su potencial bioactividad frente a diversas patologías dentro de un consumo habitual en la dieta. Tradicionalmente se ha considerado a los compuestos fenólicos como compuestos 'antioxidantes', dada la capacidad estructural que les confieren sus grupos hidroxilo. Sin embargo, estos efectos ya no se consideran tan relevantes *in vivo*, ya que los polifenoles, como consecuencia del proceso de digestión gastrointestinal, están sometidos a un intenso metabolismo, de modo que las formas nativas presentes en los alimentos no llegan a los tejidos diana en concentraciones lo suficientemente altas como para tener un efecto significativo en la neutralización de los radicales libres (Fraga et al., 2019). En los últimos años se ha avanzado en la identificación de posibles mecanismos de acción de los metabolitos fenólicos relacionados con la modulación del sistema antioxidante endógeno a través de vías de señalización intracelular e intercelular, que dependen fundamentalmente de las dosis de polifenoles ingeridas a través de los alimentos, y de su absorción efectiva y biodisponibilidad, lo que determina la concentración de metabolitos fenólicos que llegan a los tejidos diana (Cardona et al., 2013; Moreno-Arribas et al., 2020; Tomás-Barberán et al., 2016).

Por lo tanto, identificar qué compuestos fenólicos de la dieta pueden proteger frente a enfermedades y su mecanismo de acción plantea resolver varias cuestiones sobre su bioaccesibilidad, así como esclarecer el papel de la interacción con la microbiota intestinal, tanto a nivel de su composición como actividad metabólica.

A modo de ejemplo, la Figura 15 muestra el metabolismo que sufren los polifenoles en el organismo humano. Cabe destacar que entre el 90 - 95 % de ingesta total de polifenoles, junto con los polifenoles conjugados excretados en la bilis, llegan al colon donde son metabolizados por la microbiota colónica. Se estima que en el colon de un individuo sano habitan entre 1000 y 1500 especies bacterianas con una densidad de unos  $10^{12}$  microorganismos por gramo de contenido intestinal (Qian et al., 2018). Las enzimas producidas por las bacterias colónicas desencadenan diversas reacciones para formar nuevos metabolitos que suelen ser más bioactivos y biodisponibles que sus precursores/compuestos parentales (Gakh et al., 2010; Monagas et al., 2010). Estos compuestos fenólicos más simples son absorbidos en los colonocitos. Los metabolitos producidos pueden tener un impacto positivo en la composición de la microbiota, que a su vez puede resultar en efectos beneficiosos tanto a nivel local como sistémico (Cueva et al., 2017; Fraga et al., 2019).

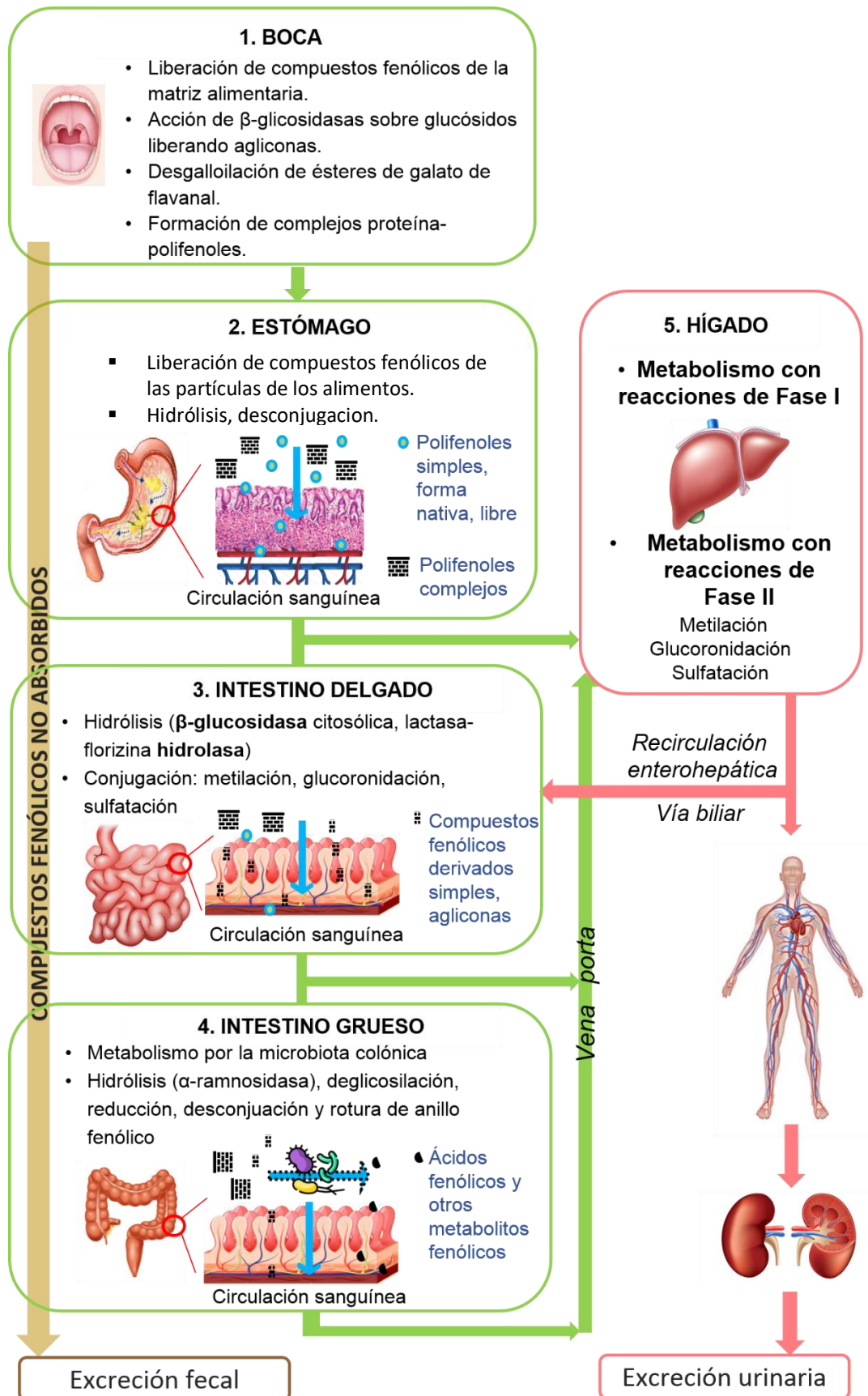


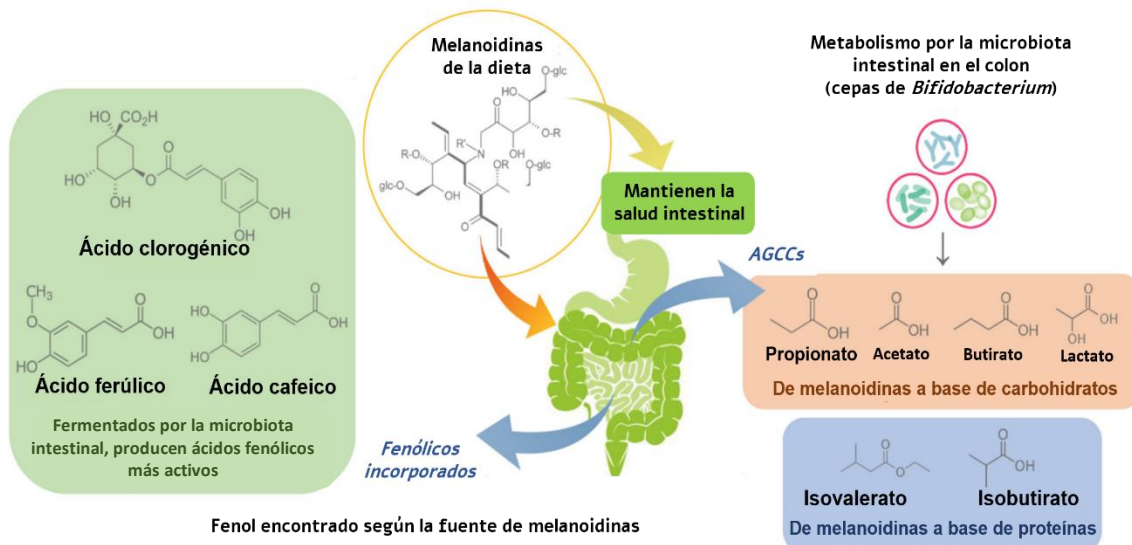
Figura 15. Vías de absorción y metabolismo en humanos de los polifenoles ingeridos con la dieta y sus derivados.

Por otro lado, los polifenoles provenientes del lúpulo como las humulonas, lupulonas e isohumulonas después de la ingesta, se biotransforman en humulinonas, huluponas y ácido humulínico, respectivamente (Cattoor et al., 2013). La mayoría del xanthohumol se isomeriza a isoxanthohumol durante la elaboración de cerveza (Karabín et al., 2013), y en la que se encuentran en una relación de concentración cercana a 1:90. Además, el xanthohumol se convierte en isoxanthohumol mediante una reacción catalizada por los ácidos del estómago. (Nikolic et al., 2005) describieron 12 metabolitos microsomaes hepáticos humanos de isoxanthohumol como productos de reacciones de Fase I, como la 8-prenilnarigenina (Guo et al., 2006) y en Fase II forman principalmente 8-prenilnarigenina glucurónidos (J. Fang et al., 2013). Sin embargo, las diferencias fenotípicas en los humanos pueden afectar las vías del metabolismo de estos compuestos (J. B. Fang et al., 2019) ya que su formación depende también de la microbiota intestinal (Hanske et al., 2010; Possemiers et al., 2005) interviniendo *Eubacterium limosum* y *E. ramulus* (Paraiso et al., 2019; Possemiers et al., 2005). Los metabolitos de la 8-prenilnarigenina se excretan principalmente en las heces y la bilis, ya que no se han detectado metabolitos en la orina (van Breemen et al., 2014).

### **1.3.3. Melanoidinas de la cerveza**

Las melanoidinas, una gran variedad de estructuras poliméricas heterogéneas que contienen N a diferencia de los polisacáridos, son pigmentos pardos con importantes propiedades para el sabor y han mostrado capacidad antioxidante (Iriundo-DeHond et al., 2020). Se originan mediante reacciones de Maillard durante el tostado de los granos germinados de cebada, maceración y hervido del mosto (Martinez-Gomez et al., 2020) y a su vez pueden dar origen a compuestos fenólicos. Su contenido varía de 0,58 mg L<sup>-1</sup> para cerveza sin alcohol o 0,61 mg L<sup>-1</sup> para cerveza rubia a 1,49 mg L<sup>-1</sup> para cervezas oscuras (Rivero et al., 2005; H. Zhao et al., 2013). Las melanoidinas podrían ser degradadas parcialmente por las amilasas y proteasas gástricas (Helou et al., 2015). En el intestino, solo se absorbe el 30 % de las melanoidinas de bajo peso molecular, mientras que las melanoidinas intactas, así como algunos de sus productos de digestión, son de alto peso molecular, lo que impide su absorción inmediata (Shaheen et al., 2021). Los polímeros dietéticos de melanoidinas actúan como las fibras dietéticas que evitan la digestión gastrointestinal por lo que alcanzan el colon, donde son fermentados por la microbiota intestinal modulando su población bacteriana (Helou et al., 2015). Las melanoidinas también se excretan por las heces (Helou et al., 2017). En la Figura 16 se muestra a modo de ejemplo los principales metabolitos microbianos de las melanoidinas

por la microbiota intestinal. La fermentación de la porción de proteína en las melanoidinas también puede producir eventualmente amoníaco.



**Figura 16.** Propuesta de interacción de la microbiota intestinal en una dieta de melanoidinas a base de carbohidratos / proteínas. Tomado de (Shaheen et al., 2021)

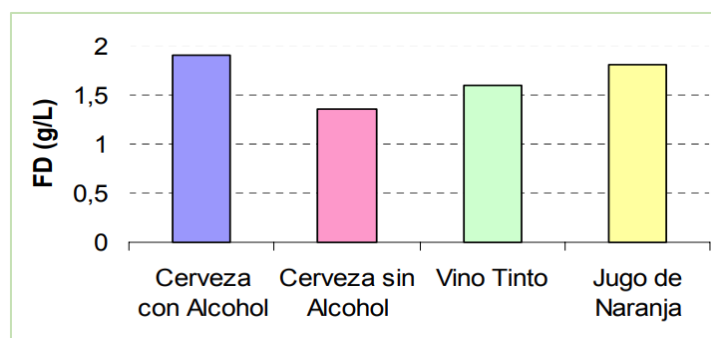
### 1.3.4. Fibra en la cerveza

Hoy en día, la importancia de la fibra dietética (FD) en la nutrición y la salud está bien establecida. Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han abordado el papel de la FD en la salud intestinal, la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon, obesidad y diabetes, entre otros (Anderson et al., 2009). La cerveza contribuye a la ingesta de FD en la dieta, cuyo componente principal son los polisacáridos no digeribles, principalmente por  $\beta$ -glucanos y arabinosilanos que podrían tener efectos prebióticos (Goñi et al., 2009) y en cantidades minoritarias por celobiosa, laminaribiosa y algunas cadenas no digeribles derivadas del almidón. Los glucanos y arabinosilanos son responsables de la viscosidad, velocidad de filtración o formación de turbidez en la cerveza, por lo que suele ser extraído durante del proceso de elaboración industrial de la cerveza, para logara obtener una cerveza brillante y límpida. La Tabla 11 muestra el contenido de FD soluble en cervezas comerciales.

**Tabla 11.** Contenido de fibra dietética soluble en cervezas industriales (Goñi et al., 2009).

Cerveza	Estilo	Alcohol (% ABV)	Fibra dietética gL <sup>-1</sup>
Águila Amstel®	Pilsen <i>lager</i>	5	1,98 +/- 0,11
Mahou Clásica®	Pilsen <i>lager</i>	4,8	1,87 +/- 0,07
Bock Damm®	Bock <i>lager</i>	5,4	1,91 +/- 0,09
Voll Damm®	Märzen <i>lager</i>	7,2	2,02 +/- 0,01
Buckler®	Pilsen <i>lager</i>	1	1,12 +/- 0,05
San Miguel 0.0®	Blonde <i>lager</i>	0	1,64 +/- 0,05

En comparación con otras bebidas comunes la cantidad de FD soluble es más alta que el vino y similar al jugo de naranja (Figura 17). La contribución de la cerveza a la ingesta de FD soluble en una dieta común puede ser significativa; porque un consumo diario moderado de 250 mL de cerveza aporta 0,5 g, lo que equivale a ingerir 125 g de tomates, 166 g de coles de Bruselas o 83 g de manzanas (Goñi et al., 2009).



**Figura 17.** Estimación del contenido en fibra dietética soluble y su comparación entre cervezas con alcohol, cervezas sin alcohol, vino tinto y jugo de naranja comercial. (FD), fibra dietética soluble (Goñi et al., 2009).

La fibra dietética de la cerveza no se hidroliza ni se absorbe en el intestino delgado y está disponible en el intestino grueso para ser fermentada por la microbiota del colon. El grado en que ocurren este proceso depende de la estructura química y las propiedades físicas de los componentes de la fibra. Estos compuestos pueden ser degradados por enzimas bacterianas y sus productos de degradación pueden fermentarse para producir AGCC, principalmente ácidos acético, propiónico y butírico, así como gases y agua (Flint, 2020c). Estos AGCC se absorben y se metabolizan aún más en los colonocitos, las células del hígado o los tejidos periféricos. Los AGCC tienen una influencia significativa en el huésped no solo como fuente de energía (butirato), que es consumido principalmente por el epitelio colónico, sino también en la ingesta de alimentos porque envían señales a los receptores intestinales que controlan las



hormonas anoréxicas controlando el apetito (Flint et al., 2012). El butirato, principalmente tiene un papel importante en la protección del cáncer colorrectal, reduciendo la inflamación y aumentando la apoptosis de las células tumorales (Elshahed et al., 2021; Pérez-Burillo et al., 2020).

Las fibras solubles suelen fermentarse más extensamente que las insolubles y, por lo tanto, se puede esperar que la FD de las bebidas sea altamente fermentable por la microbiota. De hecho, el 99 % de la FD de la cerveza se fermenta ampliamente por las bacterias del colon y la mayor parte se convierte en AGCC, ya que los  $\beta$ -glucanos se caracterizan por su alta fermentabilidad y son reconocidos como fibras saludables, por lo que las declaraciones de propiedades saludables han sido aceptadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Goñi et al., 2009).

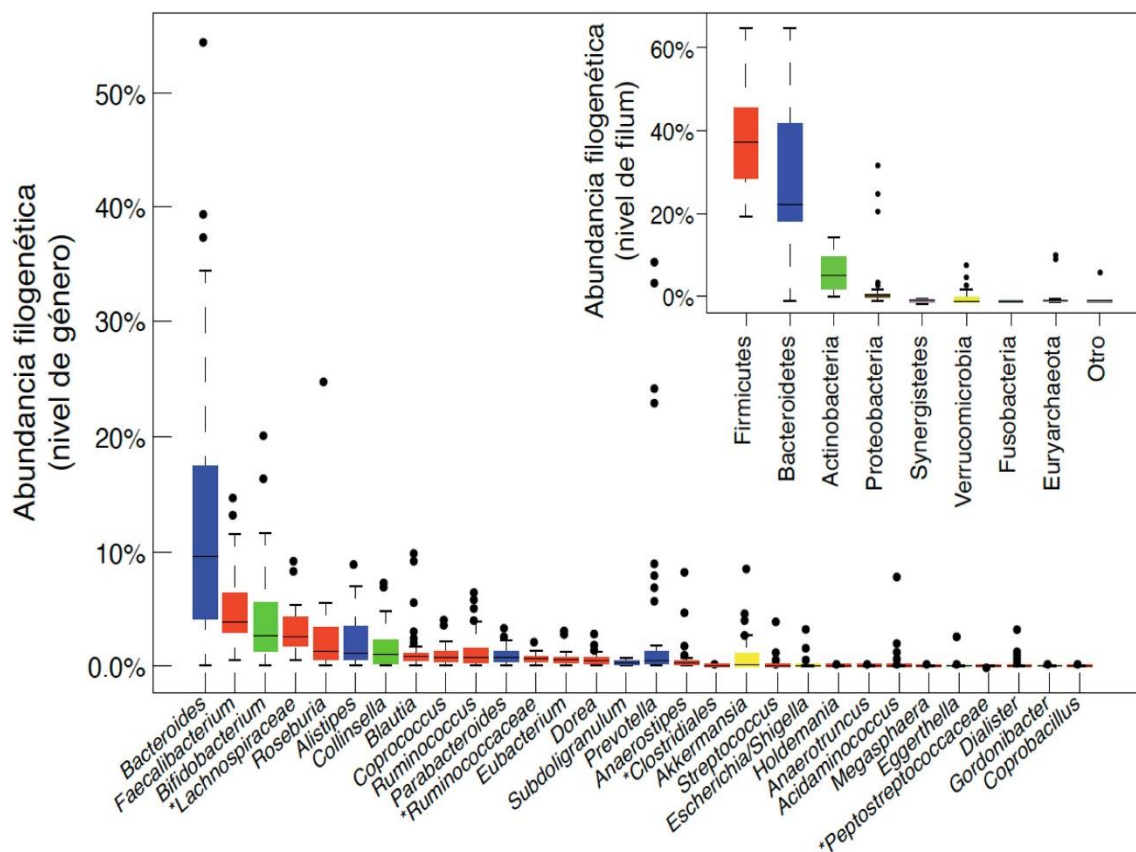
En definitiva, el metabolismo microbiano de la fibra dietética constituye un claro ejemplo de la relación simbiótica entre el hospedador y su microbiota (Flint, 2020b). Por un lado, la fibra actúa como sustrato nutritivo para la microbiota colónica y esta fermentación lleva a la producción de metabolitos con un papel clave y gran impacto en la salud del hospedador pero, además, la fibra puede modular la población microbiana intestinal, ya que aporta sustratos específicos que favorecen la expansión sólo de aquellos taxones microbianos capaces de metabolizar estos sustratos (Makki et al., 2018) e impacta sobre el ecosistema microbiano, por ejemplo, cambios en el pH por la presencia de AGCC. De forma que la fermentación de la FD incide directa e indirectamente en la fisiología y la salud del hospedador (Flint, 2020a).

### **1.3.5. La microbiota intestinal**

El microbioma humano está distribuido por todo el organismo, pero se concentra especialmente en el tracto gastrointestinal, considera como la región del cuerpo humano más densamente pobladas por microorganismos, especialmente el íleon distal y el colon, donde se encuentra la mayor concentración de la denominada microbiota intestinal. Esta constituye un ecosistema complejo y dinámico que interactúa entre sí y con el huésped u hospedador (el propio humano) y, además, ejerce una marcada influencia en su salud.

La microbiota intestinal es una comunidad microbiana formada por diferentes géneros de bacterias, virus, arqueas y hongos. Este ecosistema engloba una gran diversidad microbiana, cuya parte más conocida hasta el momento es la diversidad bacteriana. La microbiota del intestino humano adulto está representada principalmente por los filos de

bacterias Firmicutes (que incluye los géneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus*), Bacteroidetes (que incluye los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*) y Actinobacterias, así como otros filos menos dominantes que incluyen Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia (Álvarez et al., 2021; Qin et al., 2010) (Figura 18). Sin embargo, la composición de la microbiota presenta una considerable variabilidad entre individuos y, aunque durante la etapa adulta permanece relativamente estable, se ve influenciada por factores como la dieta, el estilo de vida o el consumo de probióticos o antibióticos. Cuando la microbiota se empobrece en especies y riqueza pasa a ser menos saludable y se produce la disbiosis, la ruptura del equilibrio simbiótico entre la microbiota y el anfitrión. La falta de producción de AGCC, como el butirato aumenta el flujo de oxígeno hacia la mucosa y perturba el microecosistema de manera que favorece la supervivencia de las bacterias resistentes al oxígeno e impide la recuperación de anaerobios estrictos. Dichos cambios afectan críticamente la resiliencia del ecosistema y perpetúan el desequilibrio hacia la cronicidad (Guarner, 2020).

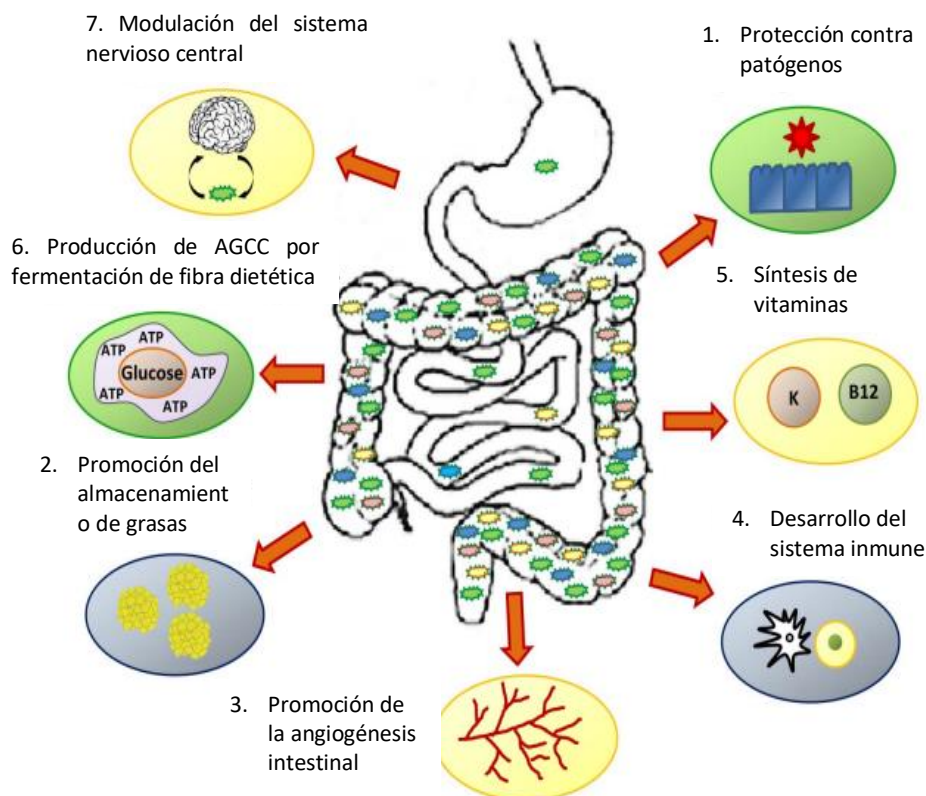


**Figura 18.** Composición bacteriana de la microbiota intestinal a nivel de género y a nivel de filo. Tomado de (Álvarez et al., 2021).

El conjunto básico de funciones de la microbiota, que es común a la mayoría de los individuos y esencial para el hospedador, incluye: las funciones metabólicas, las funciones de

mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal y su defensa frente a patógenos, así como su relación con el desarrollo del sistema inmune del hospedador (Thursby & Juge, 2017) (Figura 19).

En el contexto del proceso de digestión, destaca especialmente la función metabólica de la microbiota que, gracias a la diversidad de enzimas y vías bioquímicas de la comunidad microbiana, contribuye a la formación o liberación de compuestos fundamentales para la fisiología humana y su salud. Por ejemplo, la microbiota intestinal es crucial en la síntesis de vitaminas como el ácido fólico (B9), la vitamina K o la vitamina B12 entre otras (LeBlanc et al., 2013; Thursby & Juge, 2017), y puede actuar liberando minerales o condicionando su oxidación y reducción de forma que se favorece su absorción, como es el caso del hierro que se encuentra en el colon como ferritina.



**Figura 19.** Funciones principales del microbioma humano. Tomado de (Amon & Sanderson, 2017).

Además, el contenido que llega al colon actúa como sustrato de la microbiota intestinal, por lo que sus funciones están también relacionadas con el metabolismo de estos compuestos no digeridos o absorbidos previamente. Entre los compuestos no digeribles que pueden interactuar con la microbiota intestinal, destacan la fibra dietética y una gran parte

de los compuestos fenólicos o polifenoles de la dieta. Estos compuestos no son absorbidos en el tracto gastrointestinal superior del hospedador, pero la microbiota intestinal puede metabolizarlos para producir componentes más biodisponibles, así como otros metabolitos con efectos beneficiosos tanto a nivel local como sistémico. Este es el caso de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), metabolitos clave en el mantenimiento del equilibrio intestinal y en la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa (Ríos-Covián et al., 2016) de algunos metabolitos fenólicos (Cueva et al., 2017).

Otra de las principales funciones de la microbiota es el mantenimiento de la barrera intestinal, en la que los AGCC también juegan un papel fundamental. Por un lado, la microbiota dificulta la colonización y sobrecrecimiento de microorganismos patógenos u oportunistas mediante mecanismos de competencia y la segregación de sustancias antimicrobianas. Por otro lado, la microbiota intestinal y los AGCC que esta produce, estimulan la proliferación de células segregadoras de mucus que protegen la barrera epitelial, reducen su inflamación y regulan el sistema inmune y la respuesta inflamatoria (Rinninella et al., 2019; Thursby & Juge, 2017).

Por otro lado, la microbiota es esencial en el desarrollo un sistema inmunológico funcional, regulando, por ejemplo, la maduración del tejido linfoide de la mucosa intestinal o estimulando a las células T y los mediadores del sistema inmunológico innato, o influyendo sobre la producción de citoquinas (Thursby & Juge, 2017).

La microbiota intestinal tiene, por tanto, un papel clave en la salud humana y el mantenimiento del equilibrio intestinal u homeostasis. Además, es fundamental para mantener las funciones fisiológicas del holobionte que la microbiota y el individuo humano conforman, y en esta relación tiene un papel fundamental la alimentación.

### **1.3.6. Interacción de los compuestos de la cerveza y la cerveza con la microbiota intestinal**

Hasta el momento, hay pocos estudios sobre el efecto del consumo moderado de cerveza en la diversidad de la microbiota intestinal humana, sin embargo, los microorganismos intestinales pueden utilizar los compuestos presentes en la cerveza. En la Tabla 12 se recogen los últimos estudios científicos realizados sobre los efectos de los ingredientes de la cerveza en la microbiota intestinal. Como se puede observar los trabajos reportados se han realizado fundamentalmente *in vitro* y algunos en animales, y en la mayoría de los casos se trata de la evaluación de componentes aislados de la cerveza, y/o fracciones y extractos.

En lo que se refiere a estudios en humanos, recientemente, (Hernández-Quiroz et al., 2020) estudiaron el efecto de un consumo moderado de cerveza sin alcohol ( $\sim 5,1 \text{ mL kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) y cerveza alcohólica ( $\sim 5,3 \text{ mL kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) (ambas de tipo *lager*; con 0,5 % y 4,9 % ABV, respectivamente), durante 30 días sobre la salud de una muestra de adultos mexicanos. Los autores concluyeron que el consumo moderado de cerveza sin alcohol tenía una acción positiva sobre la salud (probablemente debido a su contenido de polifenoles activos biológicos y ácidos fenólicos) y también enriqueció la microbiota intestinal con bacterias beneficiosas. Específicamente, el consumo de cerveza sin alcohol redujo la glucosa en suero sanguíneo en ayunas y aumentó las células  $\beta$  funcionales solo después de 30 días de consumo, mientras que el consumo de cerveza con alcohol produjo efectos opuestos (Hernández-Quiroz et al., 2020), a pesar de tener una composición similar de compuestos fenólicos. Si bien, en este estudio ambos tipos de cerveza produjeron un aumento en la diversidad de la microbiota, y ambas favorecieron la proliferación del filo Bacteroidetes con relación al filo Firmicutes, los autores proponen que el consumo de cerveza sin alcohol estuvo más asociada a una diversidad de microbiota específica relacionada con funciones benéficas para la salud (Hernández-Quiroz et al., 2020), lo que sugiere que el alcohol podría inhibir este efecto positivo de la cerveza sin alcohol (Ambra et al., 2021).

En otro estudio, sobre las asociaciones entre el consumo moderado de cerveza, la composición de la microbiota y el perfil de AGCC (González-Zancada et al., 2020), no se encontraron diferencias en la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  entre los dos grupos: Abstemios o bebedores ocasionales *versus* consumidores. La abundancia relativa de bacterias intestinales mostró que Clostridiaceae fue menor en los consumidores de cerveza respecto a los bebedores ocasionales, mientras que *Blautia* y *Pseudobutyrvibrio* fueron mayores. Además, el género *Alkaliphilus*, en varones, estuvo en menor abundancia en los consumidores que en los bebedores ocasionales. El ácido butírico fue mayor en los consumidores que en los bebedores ocasionales y se correlacionó con la abundancia de *Pseudobutyrvibrio*. Es decir, estos cambios observados en unos pocos taxones y la mayor concentración de ácido butírico sugieren, un efecto potencialmente beneficioso del consumo moderado de cerveza sobre la salud intestinal (González-Zancada et al., 2020), aunque en este último estudio no se realizó alguna cuantificación de la ingesta de polifenoles.

**Tabla 12.** Principales estudios sobre la interacción de los compuestos de la cerveza sobre la microbiota intestinal.

Ref.	Objetivo	Diseño del estudio	Población	Duración Dosis	Resultados obtenidos
(Blatchford et al., 2019)	Determinar el efecto del extracto de CO <sub>2</sub> supercrítico de lúpulo sobre la composición y el metabolismo de las microbiota intestinal	<i>In vitro</i> Sistemas de fermentación de cultivos por lotes fecales humanos	Inóculo mixto obtenido de 10 voluntarios sanos	Concentración final de extracto de lúpulo (µg / mL) 10-5000 (contiene α y β ácidos)	Las bacterias intestinales Gram + y Gram- fueron afectadas por el extracto de lúpulo. Las concentraciones más altas de lúpulo favorecieron el crecimiento de Enterobacteriaceae ( <i>Escherichia/Shigella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , and <i>Klebsiella</i> ) e inhibieron las bifidobacterias probióticas beneficiosas y los géneros <i>Eubacterium</i> y <i>Coprococcus</i> , productores de butirato. Se observó una disminución significativa dependiente de la dosis del butirato, a medida que aumentaba la concentración del extracto de lúpulo. ↑ Clostridiaceae y <i>Akkermansia</i>
(Possemiers et al., 2008)	Evaluar los efectos sobre la salud después de la absorción de <i>E. limosum</i> y extractos de lúpulo.	<i>In vitro</i> SHIME	Muestras fecales de 12 productores, altos y bajos, de 8PN	25 mg/L de IXN (4 sem). Después de 2 sem, log 9 <i>E. limosum</i> /día en el colon ascendente (2 sem).	↑ producción de 8PN después de la administración de <i>E. limosum</i> con IXN en el reactor de colon descendente de los compartimentos no productores de 8PN. <i>E. limosum</i> administrado por vía oral alcanzó el colon ascendente, aumentó la producción de butirato y aumentó la producción de 8PN en ambos compartimentos (productores de PN y no productores).
(Teixeira et al., 2018)	Investigar la influencia de la fibra dietética de cebada en la microbiota intestinal de ratas	<i>In vivo</i> Ratas alimentadas con diversas dietas derivadas de la cebada	Ratas macho Wistar (n=56 divididos en 8 grupos) (70-98 g)	12 g peso seco por día	<i>Akkermansia</i> fue más abundante en ratas alimentadas con dietas ricas en arabinoxilano soluble y formaron altas cantidades cecales de ácido propiónico. <i>Blautia</i> , <i>Allobaculum</i> y <i>Lactobacillus</i> fueron más abundantes en dietas ricas en β-glucano. Las ratas alimentadas con malta canela parecen dar una alta diversidad α, estimulan la abundancia cecal de <i>Allobaculum</i> , <i>Blautia</i> y <i>Lactobacillus</i> , así como de ácido butírico. El grano gastado de cerveza (BSG) estimuló la abundancia cecal de <i>Lactobacillus</i> y ácido butírico. La adición de BSG a la malta tippel resultó en un ligero aumento en el ácido butírico cecal y bacterias butirógenas, lo que muestra la posibilidad de utilizar BSG como ingrediente alimentario para modular la composición y función de la microbiota. El arabinoxilano insoluble fue el sustrato preferido para <i>Rikenellaceae</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Odoribacter</i> y <i>Oscillospira</i> , que se describen como potencialmente butirógenos.

Ref.	Objetivo	Diseño del estudio	Población	Duración Dosis	Resultados obtenidos
(Ou et al., 2016)	Investigar los efectos de los oligosacáridos feruloilados (OF) del salvado de maíz sobre la diversidad microbiana en las heces de rata.	<i>In vivo</i> Ratas alimentadas con dietas derivadas de salvado de maíz	Ratas macho (n=45 dividido en 5 grupos) (160-170g)	OFs administradas vía oral a 300 mg/kg	Los OF aumentaron la riqueza bacteriana, la diversidad en las heces de ratas y las unidades taxonómicas operativas. Los OF influyeron en las bacterias asociadas a la obesidad y la diabetes, disminuyeron el radio de <i>Firmicutes</i> a Bacteroides, aumentaron las bacterias resistentes a la diabetes ( <i>Actinobacteria</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>Lactobacillus</i> ) y disminuyeron las bacterias propensas a la diabetes ( <i>Clostridium</i> y <i>Firmicutes</i> ).
(Oishi et al., 2015)	Determinar los efectos de los alquilresorcinoles derivados del salvado de trigo sobre los trastornos metabólicos inducidos por la dieta en ratones.	<i>In vivo</i> Ratones alimentados con dieta normal, o con alto contenido de grasa y sacarosa (FS), o con un 0.4% de alquilresorcinoles (FS-AR)	Ratas macho divididos en tres grupos	FS y FS-AR administrados vía oral durante 10 semanas.	Los alquilresorcinoles suprimieron los aumentos de peso corporal inducidos por FS, la acumulación de triglicéridos hepáticos inducida por FS, la hiperinsulinemia y la hiperleptinemia inducidas por FS. Los alquilresorcinoles redujeron significativamente la concentración de glucosa en sangre en ayunas y suprimieron la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina inducidas por la dieta FS.
(Pérez-Burillo et al., 2020)	Evaluar si la bioactividad de las melanoidinas de la cerveza está mediada por la microbiota intestinal.	<i>In vitro</i> Procesos de digestión y fermentación	Muestras fecales obtenidas de 3 donadores adultos sanos	Melanoidinas fueron aisladas de cerveza Pilsen "Alhambra" y de cerveza Irish black "Guinness"	Las melanoidinas digeridas promovieron una notable expansión de miembros del género <i>Bifidobacterium</i> . Las melanoidinas estaban altamente fermentadas y produjeron AGCC en cantidades considerables.

Ref.	Objetivo	Diseño del estudio	Población	Duración Dosis	Resultados obtenidos
(Gong et al., 2019)	Evaluar los efectos de los oligosacáridos feruloilados (OF) de salvado de trigo en la microbiota intestinal.	<i>In vitro</i> Fermentación	Muestras fecales obtenidas de 4 voluntarios	Las dosis de OFs fueron de 0.5%, 1%, 2% (w/v). Duración: 24 h	Los OF de salvado de trigo mostraron efectos prebióticos: ↑ Firmicutes y Actinobacteria ( <i>Bifidobacterium</i> y <i>Faecalibacterium</i> ). ↓ Bacteroidetes y Proteobacteria ( <i>Alistipes</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Dorea</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Oscillospira</i> ). El ácido ferúlico: ↑ Bacteroidetes ( <i>Bacteroides</i> , <i>Dialister</i> ) y ↓ <i>Coprococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Megamonas</i> , <i>Oscillospira</i> . Los OF ↑ los AGCC, pero inhibieron la producción de ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR). El ácido ferúlico inhibió la producción de AGCC y AGCR.
(Song et al., 2020)	Caracterizar cómo los OF y ácido ferúlico (AF) alteraron el microbioma intestinal y el metaboloma relacionado en ratas diabéticas.	<i>In vitro</i> <i>Diabetic model</i>	Ratas macho divididos en 4 grupos (n=5)	Grupo normal, grupo modelo diabético, grupo diabético AF (30 mg/kg pc /d), grupo diabético OF (300 mg/kg pc /d) Tiempo: 8 sem.	Los OF y AF atenuaron el síndrome diabético en ratas. OF ↓ <i>Lactobacillus</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Oscillibacter</i> y <i>Desulfovibrio</i> . OF ↑ <i>Akkermansia</i> , <i>Pharcolarctobacterium</i> y <i>Turicibacter</i> . OF y AF ↑ AGCC y AGCR
(Aljahdali et al., 2020)	Para evaluar el impacto del consumo de melanoidinas (M) de maltas de cebada sobre la microbiota intestinal.	<i>In vivo</i> : el grupo control consumió una dieta de malta sin M; los otros grupos dieta de malta rica en M	5 grupos de 15 ratones cada uno	40 g de malta con M en la primera semana. La porción de malta fue incrementada a 20 g cada semana consecutiva.	El aumento de melanoidinas da como resultado perfiles de microbiota intestinal significativamente divergentes y apoya la producción sostenida de AGCC. ↓ abundancia relativa de <i>Dorea</i> , <i>Oscillibacter</i> y <i>Alisitpes</i> ↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Parasutterella</i> , <i>Akkermansia</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Barnesiella</i> . ↑ significativo de <i>Bifidobacterium</i> spp. y <i>Akkermansia</i> spp en ratones que consumieron las mayores cantidades de melanoidina, lo que sugiere un potencial prebiótico notable.





*Interés general y objetivos*



## 2. INTERÉS GENERAL Y OBJETIVOS

La cerveza se ha posicionado en los últimos años como una de las principales bebidas consumidas a nivel mundial, y España con una producción de  $39.5 \times 10^6$  hL en 2019, es el tercer país productor de la UE, solo por detrás de Alemania y Polonia. Aunque la globalización caracteriza a este sector en la actualidad y la mayor cuota de mercado continúa siendo de las grandes empresas cerveceras, la expansión y diversificación del sector ha fomentado la entrada de cerveceros artesanales, que han marcado un cambio y nuevos desafíos en la estructura de esta industria. La baja capacidad de producción de las cervecerías artesanales hace que sea posible responder más fácilmente a la innovación y a las peticiones especiales de los consumidores que las industriales. Las cervecerías industriales suelen producir cervezas con sabores y estilos estandarizados mientras que las microcerveceras son capaces de generar productos caracterizados por una mayor gama de aromas y sabores. Como consecuencia, la cerveza artesanal ha ido ocupando un mercado creciente centrado en la diferenciación de sus productos que han generado la denominada "revolución del sabor", como respuesta a la estandarización.

La cerveza artesanal, a diferencia de otras bebidas de malta y de la industrial, generalmente no contempla los procesos de filtración ni pasteurización en su fabricación para evitar que se eliminen las levaduras y otros componentes principales de la cerveza final y garantizar un perfil aromático y sabor distintivo. Por estas razones, se caracterizan por ser bebidas más ricas en compuestos con potencial bioactivo, lo que motiva el interés científico en evaluar sus propiedades saludables. Desde el punto de vista de la calidad y seguridad alimentaria, la contaminación microbiológica puede marcar la diferencia entre las cervezas industriales y las artesanales, especialmente en el caso de las no pasteurizadas y no filtradas. La cerveza artesanal se caracteriza por tener una vida útil más reducida y presentar una mayor susceptibilidad a contaminantes de origen microbiano, por tanto, controlar el potencial impacto de estos microorganismos alterantes en las etapas de elaboración de la cerveza es un reto para los cerveceros artesanales. En lo que se refiere a las características sensoriales del producto, personalizar un estilo de cerveza o proporcionar un nuevo estilo, las principales oportunidades provienen de la capacidad para innovar en la fermentación a través de la investigación y desarrollo de nuevas levaduras y la caracterización de sus capacidades fermentativas hacia la selección de cepas que permitan modular la composición y características sensoriales de las cervezas resultantes.

En este contexto surge esta Tesis Doctoral con el objetivo global de caracterizar el comportamiento de bacterias lácticas y levaduras no-*Saccharomyces* en la elaboración de cerveza artesanal, tanto desde el punto de vista de la calidad microbiológica y seguridad alimentaria del producto, como del impacto tecnológico y en la composición y perfil sensorial de la cerveza final. Desde el enfoque de las propiedades saludables de la cerveza artesanal, se plantea el estudio de su efecto sobre la microbiota intestinal.

Los objetivos concretos son:

1. Caracterizar las principales (especies de) bacterias lácticas presentes en la microbiota natural/ambiente de una cervecería artesanal y los factores con influencia en la capacidad de estos aislados de deteriorar la calidad y seguridad de la cerveza durante la elaboración y en el producto envasado.
2. Desarrollar una herramienta para la calificación de la susceptibilidad a la contaminación microbiana de los diferentes estilos cerveceros que estime la influencia de los parámetros intrínsecos de la cerveza artesanal en el crecimiento de microorganismos.
3. Seleccionar y caracterizar el desempeño fermentativo de levaduras no-*Saccharomyces* con las mejores propiedades metabólicas para la fermentación de cerveza artesanal. Estudio piloto/de laboratorio de la adecuación de una levadura seleccionada, *Lachancea thermotolerans* CIAL37, para la elaboración de cerveza artesanal y contribución a su perfil sensorial.
4. Evaluar la digestión gastrointestinal e impacto en la microbiota intestinal de diferentes estilos de cervezas artesanales mediante el SIMulador Gastrointestinal Dinámico simgi®.

Para la consecución de estos objetivos, se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- 1.1. Selección de la cervecería artesanal y de los puntos de muestreo en el ambiente y equipamiento de la fábrica.
- 1.2. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas a partir de la colección de muestras de la cervecería artesanal.

- 1.3. Caracterización de la producción de exopolisacáridos y de aminas biógenas, y detección de la presencia de genes de resistencia al lúpulo para la caracterización de los aislados desde la perspectiva de la calidad microbiológica y seguridad alimentaria de la cerveza. Verificación del crecimiento bacteriano y habilidad para deteriorar la cerveza envasada.
- 2.1. Estimación de los parámetros fisicoquímicos y estado microbiológico de 20 cervezas artesanales de diferentes estilos representativos del mercado.
- 2.2. Evaluación de la influencia de los parámetros intrínsecos de la cerveza artesanal en el crecimiento de microorganismos a través de un modelo logístico binomial. Validación del modelo.
- 3.1. *Screening* y selección de levaduras no-*Saccharomyces* con potencial uso en la elaboración de cerveza a partir de una colección de levaduras de origen enológico, mediante la caracterización fermentativa, metabólica y sensorial.
- 3.2. Fermentación a escala piloto de laboratorio con una cepa de levadura seleccionada *Lachancea thermotolerans* CIAL37 y evaluación de la cerveza elaborada mediante el análisis de sus parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y perfil aromático.
- 4.1. Digestión *in vitro* de tres cervezas artesanales de diferentes estilos en el SIMulador Gastrointestinal Dinámico simgi® y estudio de su efecto sobre la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas del colon.



## *Capítulo I*





### 3. CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PRESENTE EN UNA CERVECERÍA ARTESANAL Y SU IMPACTO EN LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA CERVEZA

#### 3.1. Planteamiento

La cerveza, en general, se considera un sustrato de crecimiento desfavorable para muchos microorganismos debido a varios factores intrínsecos, como la concentración de etanol, la presencia de compuestos del lúpulo que tienen actividad antimicrobiana, su pH bajo y el contenido reducido de O<sub>2</sub> y alto de CO<sub>2</sub>, así como la limitada disponibilidad de nutrientes. La estabilidad microbiológica de la cerveza puede verse comprometida durante la elaboración de cerveza artesanal y nuevos estilos cerveceros con factores intrínsecos menos estresantes para los posibles contaminantes microbianos (menor contenido en alcohol y lúpulo), así como por la introducción de nuevas materias primas (frutas, cereales) con su microbiota respectiva. Además, las cervezas artesanales son las más susceptibles al deterioro ya que habitualmente no conllevan un proceso de filtración de la cerveza final, ni la pasteurización del producto envasado y las cervecerías suelen carecer de laboratorios para ejecutar controles microbiológicos que incluyan métodos fiables para la detección temprana de microorganismos contaminantes.

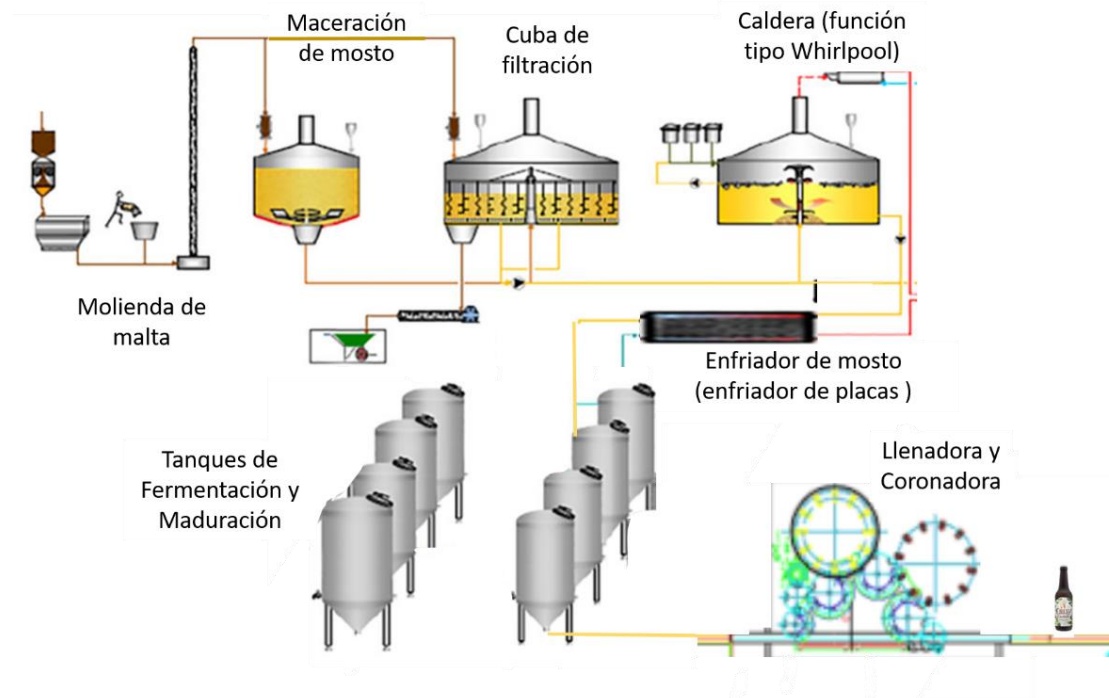
Aunque se estima que las bacterias ácido-lácticas (BAL) son el principal grupo microbiano responsable del deterioro de la cerveza, no se dispone de suficiente información sobre la diversidad de la microbiota de las BAL en las cervecerías artesanales, las posibles fuentes o vías de entrada y sus características relevantes, lo que podría ayudar a entender la calidad microbiológica asociada. El objetivo del trabajo presentado en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral es el estudio de la microbiota de bacterias ácido-lácticas presente durante el proceso productivo de una cervecería artesanal, así como su caracterización desde los enfoques de calidad microbiológica y seguridad alimentaria, con especial atención a sus capacidades para producir aminos biógenos (AB) y deteriorar la cerveza.

#### 3.2. Materiales y métodos

##### 3.2.1. Selección de la cervecería artesanal y proceso de producción de la cerveza

La cervecería artesanal seleccionada para este estudio está ubicada en la Comunidad de Madrid, y se caracteriza por ser una de las pioneras y referente en el sector. Produce

aproximadamente 5000 hL de cerveza al año, elabora más de 15 marcas de cerveza e incluye una amplia gama de estilos de cerveza, a excepción de estilos *sour* y *lambic*. La fábrica tiene un diseño que se basa en una sola nave en la que se encuentran todos los equipos y maquinarias de producción, que incluye una estación para la molienda de granos, un tanque para maceración/filtración del mosto, un tanque de cocción y diez tanques cilíndricos cónicos para los procesos de fermentación y maduración (Figura 20). De acuerdo con el proceso de elaboración artesanal, en esta fábrica no se lleva a cabo procesos de centrifugación o filtración de la cerveza y para el envasado se usa una máquina de llenado con 50 tubos y un coronador. En algunas marcas, después de la primera fermentación y maduración en frío, se agrega mosto fresco y se embotella inmediatamente para la re-fermentación y carbonatación natural de la cerveza. Todas las cervezas se elaboran empleando para la fermentación cepas comerciales de levaduras *Saccharomyces* spp., que se propagan en la misma cervecería.

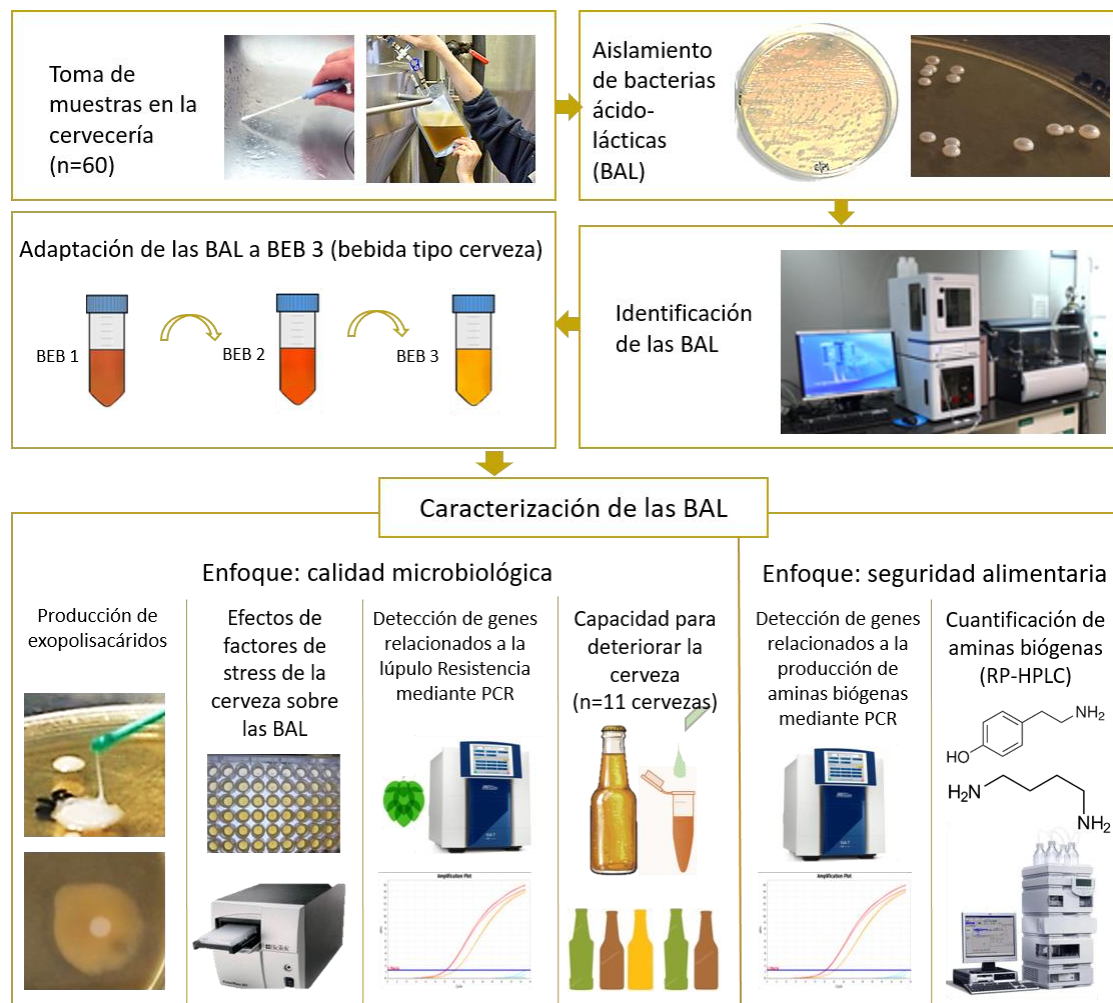


**Figura 20.** Diagrama del proceso de elaboración de la cervecería artesanal.

### 3.2.2. Monitorización, aislamiento e identificación de las BAL

La Figura 21 muestra el esquema de la monitorización, aislamiento e identificación de las BAL seguido en este estudio. El muestreo se realizó durante un ciclo convencional de producción de cerveza, específicamente después de los procesos de limpieza y saneamiento y durante el embotellado de un lote de cervezas Indian Pale Ale (IPA, 7 % ABV). Para la elección

de los puntos de toma de muestra se tuvo en cuenta los puntos críticos de una planta cervecera asociados con contaminaciones microbianas primarias y secundarias.



**Figura 21.** Esquema resumen del estudio. Tomada de Rodríguez-Saavedra et al. (2020a)

Se tomaron un total de sesenta (60) muestras, considerando muestras del aire dentro de la fábrica, de superficies y accesorios de los tanques de fermentación, máquinas llenadora y coronadora; productos intermedios y envasados. Los puntos de muestreo y los métodos de aislamiento e identificación fenotípica de las BAL se describen a continuación.

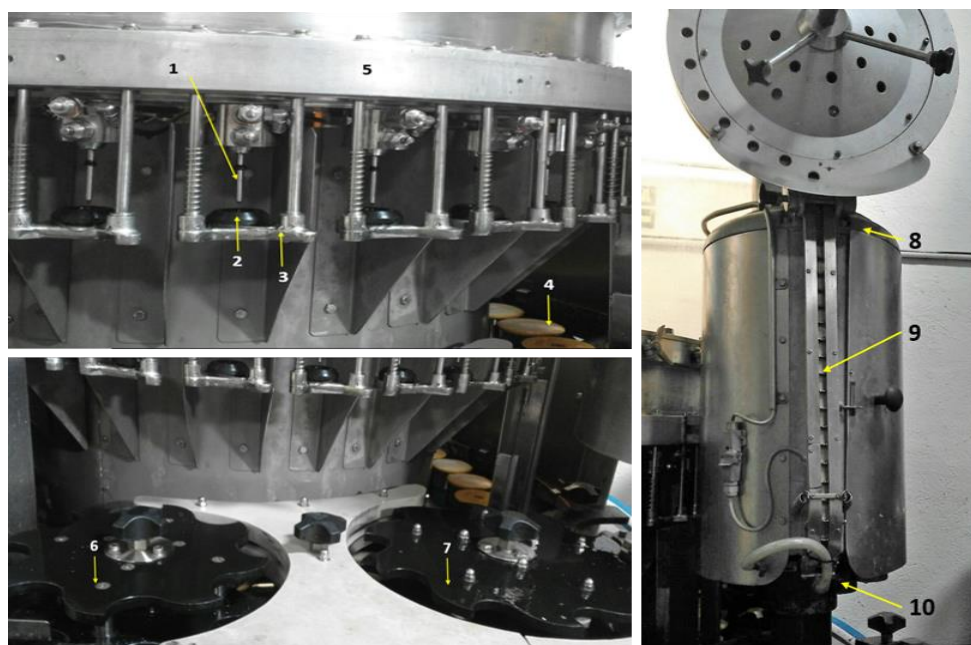
### 3.2.2.1. Monitorización, aislamiento e identificación de las BAL en el aire del interior de la cervecería

- Zona de enfriamiento de mosto, sobre el enfriador de placas
- Zona de tanques de fermentación a la altura de los grifos de los tanques.
- Zona de tanques de fermentación y tuberías de purgar los tanques.
- Zona de llenado de botellas, sobre la estrella de ingreso a la llenadora.
- Zona de coronado de botellas, sobre la estrella de ingreso al coronador.

El método de aislamiento empleado fue el de sedimentación en placa, utilizando agar De Man-Rogose-Sharpe (MRS) (Difco™ BD, Francia) modificado por la adición de 2 g L<sup>-1</sup> de maltosa, 15 ppm de cicloheximida, 0,05 % de L-cisteína-HCl y 0,04 % de rojo de clorofenol (agar-MRSm). El pH se ajustó a pH 5,7 y las placas se expusieron al aire del medio ambiente durante 30 min, y se incubaron en anaerobios a 28 °C durante 7 días. Al cabo de este tiempo se aislaron las colonias con diferente morfología (altura, tamaño, forma, color, borde y consistencia).

### 3.2.2.2. Monitorización, aislamiento e identificación de las BAL en la superficie de equipos

- Zona de elaboración: mangueras de trasiego, juntas y asientos de empaquetaduras; grifos y superficie exterior de tanques de fermentación.
- Zona de envasado en llenadora y coronadora: tubos de llenado, tulipas, coronadores y otros puntos mostrados en la Figura 22.



**Figura 22.** Puntos de muestreo en la llenadora y el coronador. (1), tubo de llenado; (2), tulipa; (3), porta-tulipa; (4), porta-botella; (5), condensado en llenadora; (6), estrella de ingreso a la llenadora; (7), estrella de ingreso al coronador; (8), tolva de coronas; (9), carril de coronas; (10), coronador.

El muestreo se realizó utilizando la técnica del hisopado de superficies, monitorizando 10 cm<sup>2</sup> o 5 unidades para accesorios con superficies irregulares. Los hisopos fueron introducidos en medio MRS modificado por la adición de 0,2 % de agar (caldo-MRSm) que se incubó en anaerobiosis a 28 °C durante 5 días. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de las muestras con turbidez y se sembraron en placas de agar-MRSm.

### 3.2.2.3. Monitorización, aislamiento e identificación de las BAL en los productos intermedios y envasados

- Producto durante el proceso de fermentación o maduración: incluye 5 lotes correspondientes a los estilos: *Light Scotch ale*, *Brown ale*, *Pale ale* y *Doble IPA*.
- Levadura de purgas: 3 lotes de levadura sedimentada en los conos de tanques de fermentación, correspondiente a los estilos: *Light Scotch ale*, *Brown ale* y *Pale ale*.
- Cerveza en llenadora: cerveza IPA al finalizar el embotellado.
- Producto terminado: 14 lotes distintos, de diferentes marcas y fechas de caducidad, mantenidas en el almacén de producto terminado.

### 3.2.2.4. Identificación fenotípica

Para la detección de las BAL, bacterias acéticas y levaduras no cerveceras, se utilizó el método *Microbiological Control-2C* (American Society of Brewing Chemists (ASBC), 2009), empleando los medios de agar-MRSm; Agar multi-diferencial de Lee; y agar Lisina e MYGP (malta-levaduras-glucosa-peptona) con cobre, respectivamente. Éstos se prepararon e incubaron según el método *Microbiological Control-5* (ASBC, 2009).

A las colonias aisladas en agar-MRSm, se les realizó las pruebas fenotípicas indicadas para la identificación de BAL, como la reacción de catalasa, prueba de KOH, de formación de esporas y la observación microscópica. La prueba de catalasa consistió en adicionar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33 % sobre una colonia; las BAL, que se caracterizan por ser catalasa negativa, no produjeron burbujas. Para la prueba de KOH se adicionó una gota de KOH al 3 % sobre una colonia y se mezcló con un asa de siembra haciendo movimientos giratorios durante 3 min; las BAL que son Gram positivas no formaron una hebra viscosa al distanciar el asa. La evaluación de formación de esporas consistió en someter una suspensión de cada colonia a 80 °C durante 10 min, seguida de una incubación en MRS (28 °C durante 7 días), las BAL que se caracterizan por no formar esporas no lograron crecer en el medio. La observación de la morfología microbiana se realizó por microscopía de campo claro, con el colorante cristal violeta y una lente de inmersión a 1000X. Los microorganismos presuntamente identificados como BAL fueron mantenidos en agar-MRSm.

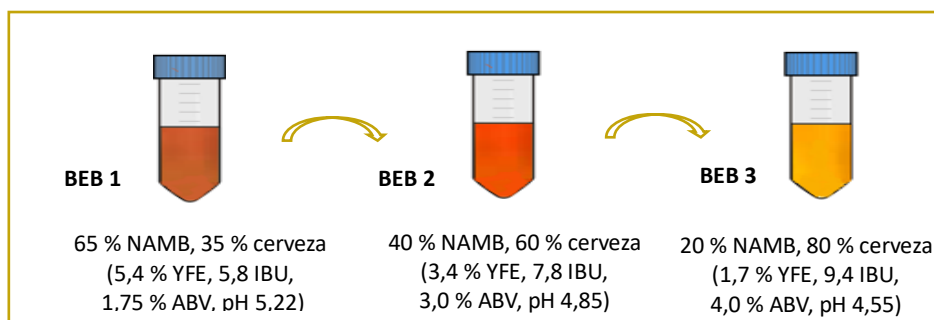
### 3.2.2.5. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación del gen 16S rRNA

La identificación de las BAL se realizó por el método de MALDI Biotyper con la tecnología MALDI TOF-MS (*Matrix-Assisted-Laser Desorption / Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) y mediante la amplificación directa por PCR, y el análisis de la secuencia parcial del gen ARNr 16S, con lecturas en ambas direcciones (Arahal et al., 2008). El análisis de las

secuencias se realizó utilizando la base datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) (Altschul et al., 1997). Las secuencias generadas se depositaron en GenBank con los números de acceso MW036465-MW036474.

### 3.2.3. Adaptación y crecimiento de las BAL en una bebida tipo cerveza

Las BAL aisladas e identificadas fueron inducidas para crecer en presencia de lúpulo, en una bebida tipo cerveza (BEB), con la finalidad de seleccionar aquellas que puedan tener potencial capacidad deteriorante de la cerveza. Para ello, los aislados se crecieron secuencialmente en tres bebidas diferentes (BEB 1, BEB 2 y BEB 3) que se prepararon mezclando proporciones crecientes de una cerveza con 5,0 % ABV, 11 IBU, pH 4,25 y 0,25 % YFE con una bebida sin alcohol a base de malta (NAMB) con 3 IBU, pH 5,75 y 8,2 % YFE, de modo que la bebida resultante en la mezcla BEB 3, cuya composición esta detallada en la Figura 23, se consideró como la más próxima y similar a una cerveza (bebida tipo cerveza).



**Figura 23.** Composición de las bebidas preparadas para la adaptación y crecimiento de las BAL

Para la adaptación de los aislados cada cultivo en fase logarítmica se lavó dos veces con solución salina 0,9 % NaCl, se inoculó en tubos que contenían BEB 1 que se incubaron a 28 °C en anaerobiosis hasta lograr un crecimiento visible. A continuación, cada aislado de BEB 1 se transfirió a BEB 2, y cuando se produjo un crecimiento visible se inoculó en BEB 3 hasta observar de nuevo crecimiento. Con los aislados previamente adaptados a la bebida tipo cerveza (BEB 3) se procedió a realizar las siguientes caracterizaciones.

### 3.2.4. Producción de exopolisacáridos (EPS)

La producción de EPS mediante la expresión de los fenotipos mucoide o *ropy* se evaluó según el método de (Paulo, Vasconcelos, et al., 2012). Para ello, se utilizaron discos de papel de filtro estériles de 5 mm de diámetro colocados sobre agar MRS sin glucosa y suplementados con un 10 % p/p de diferentes azúcares de manera individual: glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa o lactosa. Se inoculó 5 µL de cada aislado adaptado sobre el papel

de filtro, y se cultivó a 28 °C durante 5 días en condiciones microaerófilas. De acuerdo con (Ruas-Madiedo & de los Reyes-Gavilán, 2005), las colonias con fenotipo *ropy* producen un filamento largo en las placas de agar cuando se extienden con un asa de inoculación, mientras que las colonias con fenotipo mucoide muestran una apariencia brillante y viscosa.

### 3.2.5. Efectos de los factores intrínsecos de la cerveza sobre el crecimiento bacteriano

Para evaluar el impacto de los factores de estrés o intrínsecos de la cerveza (pH, % ABV e IBU) sobre el crecimiento bacteriano, se prepararon cervezas en el laboratorio (cervezas ajustadas) ajustando los factores intrínsecos, tal como se describe en la Tabla 13. Los valores de % ABV, pH, % YFE e IBU fueron analizados usando los métodos Beer-4F, Beer-9, Beer-16 y Beer-23A (ASBC, 2009), respectivamente. De manera adicional, para evaluar el crecimiento de los dos aislados de *L. brevis* en una cerveza con un % YFE más alto, se preparó también la cerveza B ajustada en un rango de pH de 4,5 a 3,5.

**Tabla 13.** Preparación de cervezas-ajustadas para evaluar el efecto de los factores intrínsecos de la cerveza (pH, % ABV e IBU) sobre el crecimiento bacteriano.

Factor intrínseco	Niveles alcanzados		Preparación
<b>pH</b>	4,50		El pH de la cerveza artesanal A (10 IBU, 0,5 % ABV, pH 4,25, 0,3 % YFE) fue ajustada desde 4,5 a 3,50, usando soluciones de HCl 7 M o NaOH 7M.
	4,25		
	4,00		
	3,75		
	3,50		
<b>% ABV (*)</b>	2,3 % ABV (10 IBU, 1,4 % YFE)		La concentración de alcohol de la cerveza artesanal B (10 IBU, 2,3 % ABV, 4,4 pH, % YFE 1,4) fue ajustada con etanol absoluto desde 2.3 a 10,0 % ABV.
	5,0 % ABV (9,7 IBU, 1,4 % YFE)		
	7,5 % ABV (9,4 IBU, 1,3 % YFE)		
	10 % ABV (9,2 IBU, 1,3 % YFE)		
<b>IBU</b>	10 IBU (2,3 % ABV, 1,4 % YFE)		Se preparó mezclas de cerveza B con la cerveza artesanal C (52 IBU, 0 % ABV, 4,3 pH, % YFE 2,9 %) hasta alcanzar niveles desde 10 a 50 IBU.
	15 IBU (2,03 % ABV, 1,6 % YFE)		
	25 IBU (1,48 % ABV, 1,9 % YFE)		
	30 IBU (1,20 % ABV, 2,1 % YFE)		
	40 IBU (0,66 % ABV, 2,5 % YFE)		
	50 IBU (0,11 % ABV, 2,8 % YFE)		
<b>% ABV – IBU</b>	Preparaciones de cerveza B ajustada (*)	2,3 % ABV (25 IBU, 0,4 % YFE)	Las cervezas-ajustadas (D+E) se obtuvieron mezclando la cerveza D (25 IBU, 5,4 % ABV, 4,4 pH, 0,4 % YFE) con la cerveza E sin alcohol (24 IBU, 0 % ABV, 4,3 pH, 0,35 % YFE) o por adición de etanol absoluto.
		5,0 % ABV (25 IBU, 0,4 % YFE)	
		7,5 % ABV (24 IBU, 0,4 % YFE)	
		7,5 % ABV (24 IBU, 0,4 % YFE)	
		10 % ABV (24 IBU, 0,4 % YFE)	



Para la evaluación del efecto del alcohol (% ABV) sobre el crecimiento, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de inóculo a 1,5 mL de cerveza ajustada usando tubos de Eppendorf de 2 mL para evitar la evaporación del etanol. Los ensayos para la evaluación del efecto del pH o IBU se realizaron en placas de 96 pocillos. Para ello, se prepararon inóculos de cada una de las BAL a partir de cultivos previamente crecidos en BEB 3, se centrifugaron (5 min, 3000 rcf), se lavaron los *pellets* dos veces y se resuspendieron en solución salina ( $\text{DO}_{590\text{nm}} = 1.0$ ). En cada pocillo se agregó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de inóculo y 240  $\mu\text{L}$  de cada cerveza ajustada (Menz et al., 2010). Todas las  $\text{DO}_{590\text{nm}}$  iniciales se midieron por triplicado en un espectrofotómetro Specord®210 mediante el programa WinASPECT® PLUS (V. 4.2, Analytik Jena AG, Jena, Germany) o en un lector multimodal de microplacas BioTek Sinergy™ HTX (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU), volviéndose a tomar nuevas lecturas después de 15 días de incubación a 28 °C en condiciones anaeróbicas. Los controles negativos fueron realizados con cada cerveza ajustada sin inocular, mientras que los controles positivos fueron realizados con caldo MRS inoculado. El crecimiento se evaluó en una escala de 0 a 5, asignados de acuerdo con la variación de su absorbancia según los rangos: 0,  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}}$ : 0.0 - 0,05; 1,  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,05 - 0,10$ ; 2,  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,10 - 0,15$ ; 3,  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,15 - 0,20$ ; 4,  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,20 - 0,25$ ; y 5,  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,25$ .

### ***3.2.6. Determinación del potencial deteriorante de los aislados bacterianos en la cerveza artesanal***

Para determinar el potencial deteriorante, cada BAL fue inoculada a 11 cervezas artesanales comerciales previamente esterilizadas por filtración, en condiciones anaeróbicas y por triplicado. La Tabla 14 muestra las cervezas utilizadas en este ensayo con sus respectivos valores de los parámetros fisicoquímicos determinados según los métodos descritos en la sección 3.2.5. El inóculo preparado como se describe en el apartado anterior se inoculó hasta alcanzar aproximadamente una concentración final en la cerveza de  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada inóculo. Las cervezas sin inocular se utilizaron como controles. Las  $\text{DO}_{590\text{nm}}$  de las cervezas inoculadas se midieron al inicio y después de ocho semanas de incubación a 28 °C en condiciones anaeróbicas. Además, todas las muestras de cerveza se examinaron semanalmente para detectar algún crecimiento visible (turbidez). La pureza del cultivo se comprobó mediante microscopía directa y siembra en agar MRSm. Las características morfológicas de las colonias fueron evaluadas por microscopía. Se consideró crecimiento positivo cuando se observó una  $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,05$  usando cerveza sin inocular como muestra blanco (Menz et al., 2010).

**Tabla 14.** Parámetros fisicoquímicos de las 11 cervezas artesanales comerciales inoculadas con las BAL (media  $\pm$  DS).

Código de cerveza	pH	% ABV	IBU	% YFE
B1	4,50 $\pm$ 0,01	4,7 $\pm$ 0,04	15 $\pm$ 0,21	0,96 $\pm$ 0,01
B2	4,32 $\pm$ 0,01	5,2 $\pm$ 0,06	19 $\pm$ 0,57	0,99 $\pm$ 0,02
B3	4,15 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	13 $\pm$ 0,28	1,93 $\pm$ 0,01
B4	4,49 $\pm$ 0,01	4,9 $\pm$ 0,05	19 $\pm$ 0,35	0,72 $\pm$ 0,06
B5	4,63 $\pm$ 0,01	4,9 $\pm$ 0,02	17 $\pm$ 0,35	0,29 $\pm$ 0,02
B6	4,46 $\pm$ 0,01	7,0 $\pm$ 0,08	16 $\pm$ 0,35	2,45 $\pm$ 0,06
B7	4,33 $\pm$ 0,01	4,5 $\pm$ 0,07	12 $\pm$ 0,57	1,49 $\pm$ 0,04
B8	4,68 $\pm$ 0,01	4,5 $\pm$ 0,09	19 $\pm$ 0,28	0,69 $\pm$ 0,03
B9	4,44 $\pm$ 0,01	5,1 $\pm$ 0,10	33 $\pm$ 0,35	2,24 $\pm$ 0,06
B10	4,61 $\pm$ 0,01	6,0 $\pm$ 0,11	21 $\pm$ 0,35	0,32 $\pm$ 0,02
B11	3,47 $\pm$ 0,01	6,5 $\pm$ 0,14	7 $\pm$ 0,57	1,63 $\pm$ 0,08

(ABV), alcohol por volumen; (IBU), unidades internacionales de amargor; (YFE), extracto fermentable por levadura.

### 3.2.7. Detección de genes relacionados con la resistencia al lúpulo

La presencia de genes relacionados con la resistencia al lúpulo (*horA*, *horC*, *hitA* y ORF5) se determinó por PCR. Para la extracción del ADN de las colonias BAL previamente crecidas en agar MRS, se utilizó el reactivo InstaGene™ Matrix (BioRad, Italia). Se midió la concentración de ADN ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a una absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se garantizó la pureza del ADN utilizando la proporción de  $A_{260}/A_{280}$  (1,65 - 1,85) según (Jones, 2010). El análisis de los genes *horA*, *horC*, *hitA* y ORF5 mediante PCR se realizó según las condiciones descritas en la Tabla 15 (Haakensen, Schubert, et al., 2008) utilizando los cebadores adquiridos a la casa comercial de Sigma Aldrich® (Tabla 16) e incluyendo un control interno de PCR (IS) correspondiente al gen de ARNr 16S. Como control positivo se utilizó la cepa *Pediococcus damnosus* CECT793.

**Tabla 15.** Condiciones de la PCR para la detección de genes relacionados con la resistencia al lúpulo y la producción de aminas biógenas, respectivamente.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final	N.º ciclos
95°C, 5 min	94°C, 45 s	52°C, 45 s	72°C, 50 s	72°C, 5 min	35
95°C, 5 min	95 °C, 1 min	52 °C, 1 min	72 °C, 1,5 min	72 °C, 5 min	35

**Table 16.** Cebadores usados en la PCR para la detección de los genes relacionados con la resistencia al lúpulo y la producción de aminas biógenas.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>horA</i>	h198F h198R	AAATCTTAACCCTGCCGG GCGGAACGGCGATAAACATA	(Haakensen, Schubert, et al., 2008)
<i>hitA</i>	28F 207R	AGCGTAGCAGAAGAACCTAAG CAATTACCAGGATCCATGTACC	(Haakensen, Schubert, et al., 2008)
<b>ORF5</b>	154F 270R	GTACGGATCGTGGTAAACG GACCATTTGTCTACAAGGCAG	(Haakensen, Schubert, et al., 2008)
<i>horC</i>	46F 139R	CTTGTTGGAGCAATTATTGG CGTTGACAAGTGCTACAGG	(Haakensen, Schubert, et al., 2008)
<b>16S rRNA (IS)</b>	386F 534R	CTGATGGAGCAACGCCGCGT ATTACCGCGGCTGCTGG	(Haakensen, Dobson, et al., 2008)
<i>hdc</i>	hdcAf hdcAr	ATGAAGCCAGGACAAGTTGG AATTGAGCCACCTGGAATTG	(Lucas et al., 2008)
<i>tdc</i>	tdcf tdcr	CAAATGGAAGAAGAAGTTGG GAACCATCAGCA ACAATGTG	(Nannelli et al., 2008)
<i>odc</i>	odcf odcr	TGCA CTTCCATATCCTCCAG GAATTTCTGGAGCAAATCCA	(Nannelli et al., 2008)

### 3.2.8. Detección de genes relacionados con la producción de aminas biógenas

Para detectar la presencia de los genes *tdc*, *hdc* y *odc* que codifican las enzimas aminoácido descarboxilasas que producen las AB: tirosina, histidina y ornitina, respectivamente, se utilizó el ADN extraído previamente (sección 3.2.7) y se procedió a realizar la PCR usando las condiciones descritas en la Tabla 15 (Coton et al., 2010). Como controles positivos se utilizaron las cepas *L. brevis* CECT216 (DSM 1268), que produce tiramina, y *Lactobacillus saerimneri* 30a (ATCC® 33222™), que produce histamina y putrescina. También se incluyó el control interno de PCR (IS) correspondiente al gen 16S rRNA. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 16.

### 3.2.9. Determinación de la capacidad de producción de aminas biógenas en cerveza

Se evaluó la producción de tiramina, histamina, putrescina y cadaverina en una cerveza comercial con 22 IBU, 5,0 % ABV y pH 4,3 (cerveza N.º 12), la cual fue inoculada con cada uno de los siete aislados BAL e incubada según lo descrito en la sección 3.2.6. Tras el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron (13000 g, 5 min) y se analizaron los sobrenadantes libres de células mediante RP-HPLC y con detección por fluorescencia según las condiciones descritas por (Moreno-Arribas et al., 2003). Brevemente, el equipo de

cromatografía líquida empleado consta de un módulo de solvente programable Waters 600 Controller (Waters, Milford, MA, EE. UU.), un inyector automático WISP 710B (Waters, Milford, MA, USA) y un detector de fluorescencia HP 1046-A (Hewlett Packard). Las muestras se filtraron previamente a través de filtros Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ) y se inyectaron por duplicado. Las separaciones se realizaron en una columna Waters Nova-Pak C18 (150 x 3,9 mm d.i., 60 Å, 4  $\mu\text{m}$ ). Las muestras se sometieron a una reacción de derivatización precolumna con *o*-ftaldialdehído (OPA) en presencia de mercaptoetanol, y las aminas derivatizadas se detectaron mediante fluorescencia (longitud de onda de excitación de 340 nm y longitud de onda de emisión de 425 nm). Los datos cromatográficos se procesaron con un sistema Millennium32 (Waters, Milford, MA, EE. UU.). Como control se utilizó la cerveza N.º 12 sin inoculación.

### **3.2.7. Análisis estadístico**

Tanto para la regresión logística binaria (BLR) como para las pruebas *t*, el intervalo de confianza y el nivel de significación estadística se establecieron en 95 % y  $p < 0,05$ , respectivamente. Se calculó la BLR teniendo como variable de resultado la capacidad de crecer en las cervezas analizadas con respecto a la ausencia/presencia de genes relacionados con la resistencia al lúpulo. Los resultados de la PCR para los genes *horA*, *hitA*, ORF5 y *horC* se incluyeron como covariables (0 = ausencia y 1 = presencia), y el BLR se realizó con el método progresivo hacia adelante (*forward stepwise method*). Se utilizó la prueba *t* de *Student* pareada para determinar si había diferencias significativas en la producción de BA en las cervezas analizadas. El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 25 (SPSS, Inc., EE. UU.).

## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Monitorización aislamiento e identificación de las BAL**

En la monitorización y aislamiento de las BAL de la cervecería artesanal, se observó ausencia de BAL en la mayoría de los 60 puntos de muestreo, incluyendo los puntos más críticos en el área y equipamiento del embotellado, como las superficies en contacto directo con la cerveza (tubos de llenado, tulipas y coronadores), y en todos los productos intermedios. Sin embargo, se detectó la presencia de BAL en algunos puntos ambientales y superficies (Tabla 17), así como en un lote inmovilizado de producto terminado (cerveza estilo *Brown Ale*).

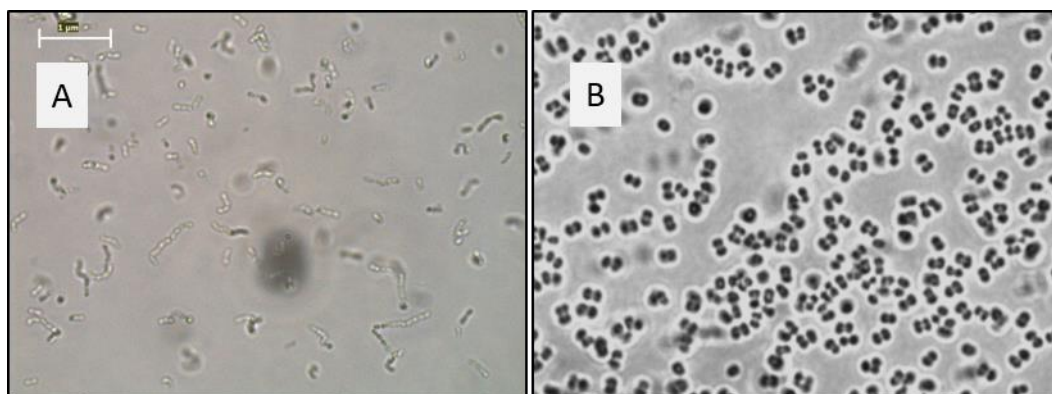
Tabla 17. Resultados de la monitorización de los controles ambientales y de superficie.

Controles Ambientales					
Aire		Catalasa	KOH	Observación microscópica	Formación de esporas
<i>Enfriador de mosto</i>		Negativo	Negativo	Cocos en cadena	Negativo
<i>Toma-muestra de tanques</i>		–	–	–	–
<i>Purgas de tanques</i>		–	–	–	–
<i>Coronador</i>		Negativo	Negativo	Tétradas	Negativo
<i>Llenadora</i>		Negativo	Negativo	Tétradas	Negativo
Control de Superficies					
Hisopado	Turbidez en tubo	Catalasa	KOH	Observación microscópica	Formación de esporas
<i>Manguera de trasiego</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Diplococos y tétradas	Negativo
<i>Juntas y asientos de empaquetaduras</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Grifos de tanques de fermentación</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Exterior de tanques de fermentación</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Bacilos cortos en pares	Negativo
<i>Tubos de llenado (5-9)</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Tubos de llenado (14-18)</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Tulipas (1-5)</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Tulipas (10-15)</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Coronadores (1-5)</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Porta-tulipas (4-8)</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Diplococos y tétradas	Negativo
<i>Porta-botellas (11-15)</i>	Negativo	–	–	–	–
<i>Tolva y canal de coronas</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Cocos en cadenas	Negativo
<i>Estrella ingreso a llenadora</i>	Positivo	Negativo	Negativo	Bacilos cortos	Negativo
<i>Estrella ingreso a coronador</i>	Positivo	Negativo	Negativo	(1) Bacilos largos (2) bacilos cortos y (3) bacilos curvados	Negativo
<i>Condensado en llenadora</i>	Negativo	–	–	–	–

(-) No aplica

A modo de ejemplo, la Figura 24 muestra las imágenes mediante microscopía de las colonias aisladas de las muestras de aire, en las que se recuperó entre 5 a 12 UFC por cada 30

min de exposición. En la identificación fenotípica de los aislados mediante las pruebas de la reacción catalasa y KOH, los resultados fueron negativos para las BAL aisladas, ya que carecen de esta enzima y por ser Gram positivas, respectivamente.



**Figura 24.** Micrografías en campo claro de colonias aisladas en las muestras de los controles del aire. (A), zona de enfriamiento de mosto; (B), zona de envasado.

Los resultados de la identificación de las BAL aisladas de los diferentes puntos muestreados en la cervecería artesanal se resumen en la Tabla 18. Las bacterias aisladas de los controles ambientales en la llenadora y el coronador resultaron ser la misma cepa, lo que era esperable ya que ambos equipos están bastante próximos, a una distancia no mayor de 3 metros.

**Tabla 18.** Puntos de muestreo en los que se aislaron bacterias y resultados de identificación de las BAL mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación del gen ARNr 16S.

Punto de muestreo	Identificación de las BAL
Aire en la zona de enfriamiento de mosto	<i>L. citreum</i> CIALB1
Superficie de manguera de trasiego	<i>P. acidilactici</i> CIALBP1
Superficie externa de fermentador	<i>L. plantarum</i> CIALB2
Superficie de estrella de ingreso a llenadora	<i>L. paracasei</i> CIALB5
Aire en la zona de envasado	<i>P. acidilactici</i> CIALBP2
Superficie de porta-tulipas	<i>P. acidilactici</i> CIALBP3
Superficies de la tolva y canal de coronas	<i>L. mesenteroides</i> CIALB3
Superficie de estrella de ingreso a coronador	<i>L. paracasei</i> CIALB6, <i>L. paracasei</i> CIALB7, y <i>L. brevis</i> CIALBD1
Producto terminado: cerveza <i>Brown ale</i>	<i>L. brevis</i> CIALBL1

### 3.3.2. Adaptación y crecimiento de las BAL en una bebida tipo cerveza

Todas las BAL aisladas crecieron en las bebidas de adaptación BEB 1 y BEB 2, pero solo siete de los once aislados pudieron crecer en la bebida similar a la cerveza, BEB 3, y fueron los seleccionados para las siguientes pruebas de caracterización (Tabla 19). En nuestro estudio, varios aislados de *L. paracasei* y *P. acidilactici* mostraron diferentes habilidades de crecimiento, de los cuales solo *L. paracasei* CIALB6 y *P. acidilactici* CIALBP3 pudieron crecer en BEB 3.

**Tabla 19.** Tiempos de crecimiento de las BAL en las fases de adaptación.

Cepa / Bebida	BEB 1	BEB 2	BEB 3
<i>L. citreum</i> CIALB1	72 h	4 días	7 días
<i>L. plantarum</i> CIALB2	48 h	3 días	7 días
<i>L. mesenteroides</i> CIALB3	72 h	4 días	7 días
<i>L. paracasei</i> CIALB5	72 h	7 días	N.C.
<i>L. paracasei</i> CIALB6	48 h	5 días	10 días
<i>L. paracasei</i> CIALB7	72 h	6 días	N.C.
<i>P. acidilactici</i> CIALBP1	72 h	6 días	N.C.
<i>P. acidilactici</i> CIALBP2	72 h	7 días	N.C.
<i>P. acidilactici</i> CIALBP3	48 h	5 días	9 días
<i>L. brevis</i> CIALD1	24 h	36 h	48 días
<i>L. brevis</i> CIALBL1	18 h	24 h	36 días

(N.C.), no se observa crecimiento.

### 3.3.3. Caracterización de las BAL desde un enfoque de calidad microbiológica

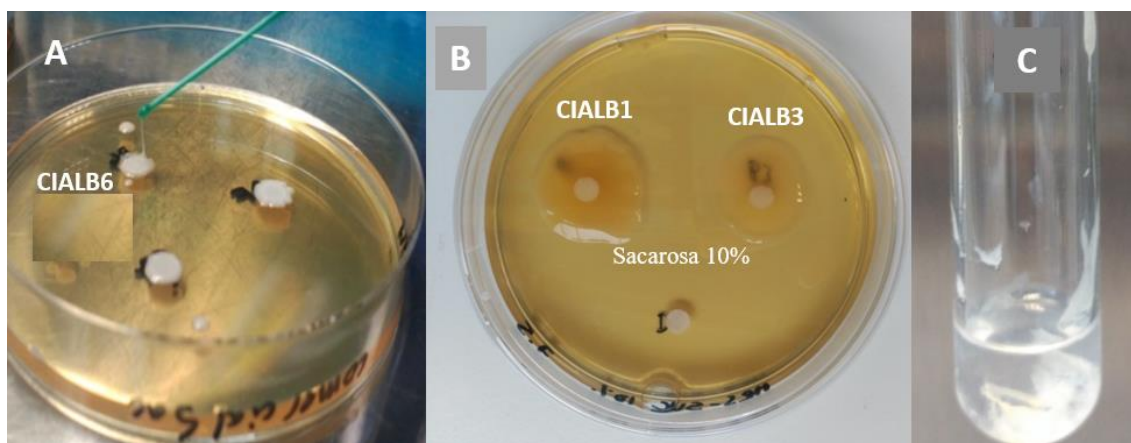
#### 3.3.3.1. Producción de exopolisacáridos

Los resultados de la producción de EPS (Tabla 20) evidencian que *L. brevis* CIALBL1 mostró un fenotipo *ropy* en presencia de maltosa, sacarosa y glucosa, mientras que *L. paracasei* CIALB6 exhibió fenotipo *ropy* con todos los azúcares que se analizaron, incluso con maltosa (Figura 25-A). Las cepas *L. citreum* CIALB1 y *L. mesenteroides* CIALB3 presentaron fenotipo mucoide en presencia de sacarosa (Figura 25-B). Estos EPS producidos fueron confirmados mediante la formación de un precipitado en alcohol absoluto (Figura 25-C).

**Tabla 20.** Resultados de la producción de EPS: fenotipos mucoide y *ropy*.

Cepa/Azúcar	Sacarosa 10 %	Fructosa 10 %	Maltosa 10 %	Glucosa 10 %	Lactosa 10 %					
CIALB1	+	> 6 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CIALB2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CIALB3	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CIALB6	(-)	> 7 mm	(-)	> 5 mm	(-)	> 10 mm	(-)	> 10 mm	(-)	> 10 mm
CIALBP3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CIALD1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CIALBL1	(-)	> 10 mm	(-)	(-)	(-)	> 10 mm	(-)	> 10 mm	(-)	(-)

(+), positivo; (-), negativo. El fenotipo *ropy* positivo está representado por el tamaño de hebra desarrollada (mm).



**Figura 25.** Producción de EPS. (A), Fenotipo *ropy*; (B), fenotipo mucoide; (C), precipitado de EPS en alcohol.

### 3.3.3.2. Efectos de los factores intrínsecos de la cerveza sobre el crecimiento de las BAL

Todos los aislados crecieron en el rango de pH 4,5 - 4,0 en la cerveza A ajustada (0,3 % YFE); pero las cepas *L. brevis* CIALBL1 y *L. brevis* CIALBD1 incluso crecieron a un pH de 3,75 a pesar de que la disminución del pH aumenta el efecto antibacteriano de los ácidos débiles derivados del lúpulo (Simpson & Smith, 1992). Posteriormente, se evaluó el crecimiento de ambos aislados de *L. brevis* en la cerveza B ajustada (1,4 - 1,3 % YFE). En algunas cervezas B ajustadas, el significativo % YFE disponible probablemente condujo a un mayor crecimiento.

En todas las cervezas B ajustadas (10 - 9,2 IBU) todos los aislados fueron tolerantes a los niveles de etanol en las que se encuentra una cerveza *lager* típica ( $\leq 5,0$  % ABV), y



también crecieron o se mantuvieron viables hasta 7,5 % ABV, mientras que *L. brevis* CIALBL1, *L. brevis* CIALBD1, *P. acidilactici* CIALBP3 y *L. paracasei* CIALB6 pudieron incluso crecer hasta 10 % ABV. Sin embargo, solo ambos aislados de *L. brevis* pudieron crecer en mezclas de cerveza, cervezas ajustadas D + E, con valores de IBU relativamente altos (24 - 25 IBU), que causaron la inviabilidad de las otras BAL, lo que significa que algunas bacterias podrían ser sensibles al lúpulo. Al comparar el crecimiento de ambos aislados de *L. brevis* en la cerveza B ajustada (1,4 - 1,3 % YFE) respecto al observado en las mezclas de cerveza D y cerveza E (0,4 % YFE), se evidencia una mayor tolerancia al etanol cuando había mayor disponibilidad de extracto. Todos los aislados pudieron crecer o permanecer viables hasta 15 IBU, pero solo ambos aislados de *L. brevis* crecieron a 50 IBU (Tabla 21) lo que sugiere que estos aislados podrían ser bacterias resistentes al lúpulo.

### 3.3.3.3. Capacidad deteriorante y genes relacionados con la resistencia al lúpulo

Los resultados de la evaluación de la capacidad deteriorante y la presencia de *horA*, *horC*, *hitA* y ORF-5 se muestran en Tabla 22. Cuando los datos se agruparon para el análisis de regresión logística binaria (RLB), con el fin de determinar la contribución individual de cada gen a la capacidad deteriorante, tanto *horA* como *horC* fueron retenidos por el modelo estadístico como factores contribuyentes. En los aislados que crecieron en la mayoría de las cervezas analizadas estaban presentes ambos genes, por lo que no fue posible determinar qué gen contribuyó más a la capacidad deteriorante.

### 3.3.4. Caracterización de las BAL desde un enfoque para la seguridad alimentaria

#### 3.3.4.1. Producción de aminas biógenas y genes aminoácido-descarboxilasas

La Tabla 22 muestra la presencia de genes relacionados con la producción de aminas biógenas (*tdc*, *odc* y *hdc*) en las BAL adaptadas a la cerveza y los resultados de la cuantificación de las aminas biógenas, putrescina y tiramina, en la cerveza N.º 12.

En la cerveza N.º 12 inoculada con la cepa *L. brevis* CIALBL1, se observó un aumento significativo de los niveles de tiramina y putrescina (5,6 y 4,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), mientras que cuando se inoculó la cepa *L. brevis* CIALBD1, se encontró un aumento significativo del nivel de putrescina (4,4 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabla 21.** Crecimiento de las BAL en cervezas-ajustadas a diferentes niveles de factores intrínsecos (pH, % ABV e IBU).

BAL / condición	<i>L. brevis</i> CIALBL1		<i>L. brevis</i> CIALBD1		<i>L. citreum</i> CIALB1		<i>L. mesenteroides</i> CIALB3		<i>P. acidilactici</i> CIALBP3		<i>L. plantarum</i> CIALB2		<i>L. paracasei</i> CIALB6	
pH	Cerveza B ajustada	Cerveza A ajustada	Cerveza B ajustada	Cerveza A ajustada	Cerveza A ajustada		Cerveza A ajustada		Cerveza A ajustada		Cerveza A ajustada		Cerveza A ajustada	
4.50	5	5	5	4	3		3		4		3		3	
4.25	5	4	5	4	2		3		3		3		3	
4.00	4	3	4	2	1 <sup>V</sup>		1 <sup>V</sup>		1 <sup>V</sup>		2 <sup>V</sup>		1 <sup>V</sup>	
3.75	2	1	3	1	0 <sup>V</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>	
3.50	0 <sup>V</sup>	0 <sup>V</sup>	0 <sup>V</sup>	0 <sup>V</sup>	0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>	
% ABV	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E	Cerveza B ajustada	Mezclas de cervezas D y E
2.3 %	5	5	5	4	3	0 <sup>NV</sup>	3	0 <sup>NV</sup>	5	0 <sup>NV</sup>	2	0 <sup>NV</sup>	3	0 <sup>NV</sup>
5.0 %	5	5	5	4	2	0 <sup>NV</sup>	3	0 <sup>NV</sup>	5	0 <sup>NV</sup>	1 <sup>V</sup>	0 <sup>NV</sup>	3	0 <sup>NV</sup>
7.5 %	4	3	5	2	1	0 <sup>NV</sup>	1	0 <sup>NV</sup>	4	0 <sup>NV</sup>	1 <sup>V</sup>	0 <sup>NV</sup>	2	0 <sup>NV</sup>
10 %	2	1	2	1	0 <sup>NV</sup>	0 <sup>NV</sup>	0 <sup>NV</sup>	0 <sup>NV</sup>	2	0 <sup>NV</sup>	0 <sup>NV</sup>	0 <sup>NV</sup>	2	0 <sup>NV</sup>
IBU	Mezclas de cerveza B y C		Mezclas de cerveza B y C		Mezclas de cerveza B y C		Mezclas de cerveza B y C		Mezclas de cerveza B y C		Mezclas de cerveza B y C		Mezclas de cerveza B y C	
10	5		5		3		3		4		3		3	
15	5		5		2 <sup>V</sup>		2 <sup>V</sup>		1 <sup>V</sup>		2 <sup>V</sup>		2 <sup>V</sup>	
25	5		5		0 <sup>V</sup>		0 <sup>V</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>	
30	5		4		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>	
40	4		4		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>	
50	4		4		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>		0 <sup>NV</sup>	

(V), bacteria viable; (NV), bacteria no-viable. Nivel de crecimiento de 0 a 5 de acuerdo con la  $\Delta DO_{590nm}$ .

**Tabla 22.** Resultados de la capacidad deteriorante, presencia de los genes relacionado con la resistencia la lúpulo y producción de AB, y la cuantificación de AB en la cerveza N.º 12

Cepa inoculada	Cerveza con crecimiento de BAL	16S (IS)	Genes relacionados con la resistencia al lúpulo				Genes relacionados con la producción de aminas biógenas			Concentración de aminas biógenas en la cerveza inoculada N.º 12 (mg L <sup>-1</sup> )	
			<i>horA</i>	<i>horC</i>	<i>hitA</i>	ORF5	<i>tdc</i>	<i>odc</i>	<i>hdc</i>	Putrescina	Tiramina
<i>L. citreum</i> CIALB1	B1 y B2	+	-	-	-	+	+	-	-	4,2	N.D.
<i>L. plantarum</i> CIALB2	B1, B2, B4, B6, B7 y B8	+	-	-	-	-	-	+	+	4,2	N.D.
<i>P. acidilactici</i> CIALBP3	B1 y B2	+	-	-	-	-	-	-	-	4,5	N.D.
<i>L. mesenteroides</i> CIALB3	B1 y B2	+	-	-	-	-	-	-	-	4,3	N.D.
<i>L. paracasei</i> CIALB6	B1 y B2	+	-	-	-	+	+	+	+	4,4	N.D.
<i>L. brevis</i> CIALBD1	Todas las cervezas, excepto B11	+	+	+	-	+	+	+	-	8,6*	N.D.
<i>L. brevis</i> CIALBL1	Todas las cervezas, excepto B11	+	+	+	+	+	+	+	+	8,6*	5,6*

\* Diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre las concentraciones de aminas biógenas de las cervezas inoculadas versus la cerveza control (cerveza no inoculada N.º 12: 4,2 mgL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> putrescina; ND Tiramina). (N.D.), no detectado según límite de detección del método = 1,0 mgL<sup>-1</sup>.



## *Capítulo II*



## 4. CAPÍTULO II. DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA PARA PREDECIR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN CERVEZAS ARTESANALES

### 4.1. Planteamiento

El deterioro de la cerveza causado por microorganismos, que es una de las principales preocupaciones de los cerveceros, produce aromas y sabores indeseables en el producto final y cuantiosas pérdidas económicas. De hecho, como hemos visto en el Capítulo I, diferentes especies de bacterias ácido-lácticas (BAL) pueden deteriorar la cerveza durante su proceso de producción, causando principalmente contaminaciones secundarias. El trabajo presentado en este Capítulo II plantea el desarrollo de un modelo matemático para determinar la susceptibilidad de la cerveza al crecimiento microbiano, tomando como referencia los principales datos fisicoquímicos del control rutinario de la cervecería y que sea independiente de la identificación de la cepa potencialmente contaminante. Se propone el diseño de modelos de regresión logística binaria (RLB) tipo Crecimiento/Sin crecimiento (G/NG), que puedan usarse como herramientas de fácil implementación por parte de los cerveceros artesanales. Para ello, los valores de los parámetros fisicoquímicos de la cerveza, como el pH, el contenido de alcohol (% ABV), las unidades de amargor (IBU) y el extracto fermentable por levadura (% YFE), obtenidos a partir del análisis de cervezas artesanales disponibles en el mercado, se utilizaron para preparar cervezas ajustadas a diferentes niveles de cada parámetro estudiado. Estas preparaciones se asignaron como un primer grupo de muestras, mientras que muestras de cervezas comerciales como un segundo grupo. Los resultados de G/NG de ambos grupos, tras inocular artificialmente una levadura salvaje y diferentes BAL previamente adaptadas para crecer en una bebida tipo cerveza, se utilizaron para diseñar el modelo.

### 4.2. Materiales y métodos

La metodología de este estudio se muestra en el esquema de trabajo de la Figura 26:

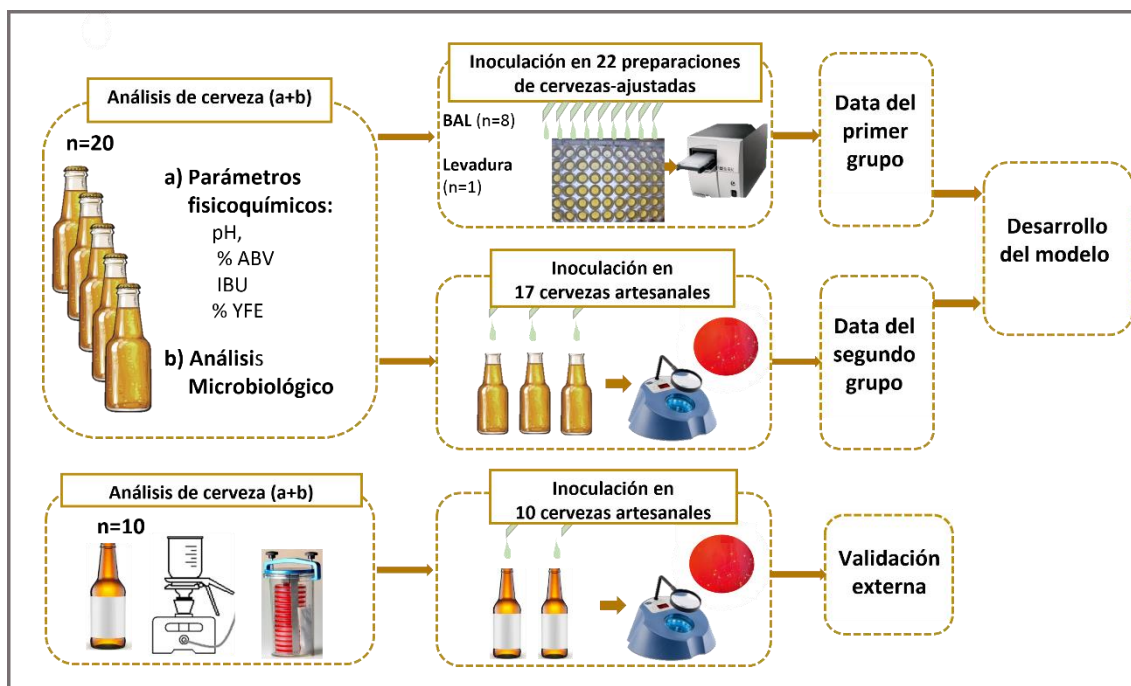


Figura 26. Esquema de la metodología del estudio (Rodríguez-Saavedra et al. 2021b).

#### 4.2.1. Microorganismos de estudio y crecimiento en una bebida tipo cerveza

##### 4.2.1.1. Selección de los microorganismos y adaptación a la bebida tipo cerveza

De la colección de microorganismos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL - CSIC, Madrid, España), se seleccionaron las siguientes cepas de BAL: *L. brevis* CIALBL1 (L1), *L. brevis* CIALBD1 (D1), *L. plantarum* CIALBF1 (F1), *L. paracasei* B6 (B6), *Leuconostoc pseudomesenteroides* B2 (B2), *L. citreum* CIALB1 (B1), y *P. damnosus* CIALBF2 (F2); además se seleccionó la cepa de levadura *Dekkera bruxellensis* CIALH2 (H2), así como la cepa de colección *L. brevis* CECT216 (216). Esta selección se realizó priorizando aquellas cepas con origen de aislamiento de cerveza o un entorno cervecero, y en función de su resistencia o susceptibilidad a los iso- $\alpha$ -ácidos provenientes del lúpulo, con el fin de incluir microorganismos con diferentes potenciales de deterioro a la cerveza (Tabla 23). Tras la identificación de las BAL, mediante amplificación del gen ARNr 16S (según se indica en el Capítulo I) se evaluaron sus capacidades de deterioro de la cerveza según se describe en Rodríguez-Saavedra et al. (2020a)(Rodríguez-Saavedra et al., 2020). Las BAL se cultivaron en medio MRS (Difco™ BD, Francia) en anaerobiosis a 28 °C durante 48 h, mientras que la cepa de levadura H2 se cultivó en caldo medio (Difco™ BD, Francia) a 30 °C durante 72 h. Todas las cepas se adaptaron para crecer secuencialmente en las tres bebidas tipo cerveza (BEB 1, BEB 2 y BEB 3), según se describió en el Capítulo I (sección 3.2.3). Las tres bebidas fueron inoculadas con  $5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>.



**Tabla 23.** Descripción de los microorganismos utilizados en este estudio

Código	Microorganismo	Fuente original	Características
L1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Cerveza artesanal	<i>L. brevis</i> es la bacteria deteriorante más frecuente en la cerveza. Ha causado más de la mitad de los incidentes descritos. Estas tres cepas son lúpulo-resistentes (Rodríguez-Saavedra et al., 2020)
D1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Equipo una cervecería	
216	<i>Lactobacillus brevis</i>	Cerveza	
F2	<i>Pediococcus damnosus</i>	Cerveza	Es una bacteria comúnmente deteriorante en la cerveza.
B6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Equipo una cervecería	Ambas pertenecen a especies con una resistencia al lúpulo relativamente débil (Suzuki, 2011).
F1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bebida alcohólica	
B2	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Equipo una cervecería	Los incidentes de deterioro causados por <i>Leuconostoc</i> sp. son raros, excepto en el caso de cervezas con factores intrínsecos débiles (Suzuki, 2011).
B1	<i>Leuconostoc citreum</i>	Ambiente de una cervecería	
H2	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Cerveza <i>lambic</i>	El género <i>Dekkera</i> es una levadura típicamente deteriorante en la cerveza.

#### 4.2.1.2. Estimación de la fase estacionaria temprana de los microorganismos

Se prepararon los inóculos de cada cepa a una densidad celular inicial de  $DO_{590nm} = 1$  ( $\sim 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> para las BAL y  $\sim 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> para la levadura) en una solución de NaCl al 0,9 %. A continuación, se inoculó 100  $\mu$ L de cada inóculo en 10 mL de la BEB 3 por separado y duplicado y se incubaron a 28 °C en anaerobiosis. El crecimiento de cada cepa ( $DO_{590nm}$ ) fue medido a intervalos de 9 h usando un espectrofotómetro Specord®210 mediante el programa WinASPECT® PLUS (V. 4.2, Analytik Jena AG, Jena, Germany), hasta alcanzar tres lecturas constantes que corresponde al tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria temprana.

#### 4.2.2. Generación de los resultados G/NG en las cervezas-ajustadas para el primer grupo de datos del modelo

##### 4.2.2.1. Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de las cervezas artesanales

Para la generación de datos para el primer grupo de muestras, se seleccionaron y adquirieron localmente dos marcas distintas de cervezas artesanales comerciales (denominadas A y B), para cada estilo de cerveza: IPA, Brown ale, Pale ale, Amber ale, Porter, Stout, Bock, Strong ale, Trigo y se incluyeron dos marcas diferentes de cerveza sin alcohol (<0,5 % ABV) (n = 20), con la finalidad de que las cervezas seleccionadas abarquen, en la medida posible, los rangos teóricos para % ABV e IBU según lo descrito por (Strong & England, 2015).

Inicialmente, se descartó que ninguno de los parámetros fisicoquímicos de las cervezas estuviera alterado por presencia de microorganismos, para ello se realizaron diferentes análisis microbiológicos. Para la detección de las BAL, bacterias acéticas y levaduras no cerveceras en las muestras de cerveza, se utilizó la técnica de filtración por membrana descrita en el método *Microbiological Control-2C*, filtrando 100 mL de cerveza por cada análisis, usando los medios de Man, Rogose, Sharpe; Agar multi-diferencial de Lee; y agar Lisina y MYGP con cobre, respectivamente, los cuales fueron preparados e incubados según el método *Microbiological Control-5* (ASBC, 2009).

El contenido de etanol, pH, % YFE y las IBU de las cervezas se determinó por triplicado de acuerdo con los métodos Beer-4F, Beer-9, Beer-16 y Beer-23A (ASBC, 2009), respectivamente. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % y se determinó la diferencia de medias por el método de mínimas diferencia significativa (Least Significant Difference, LSD), ( $p < 0,05$ ), utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, USA).

#### **4.2.2.2. Preparación de cervezas-ajustadas a diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos**

Con los valores de pH, % ABV, % YFE e IBU de las cervezas sin contaminación microbiana, obtenidos de los análisis del apartado anterior, y teniendo en cuenta los rangos teóricos de estos parámetros fisicoquímicos según (Strong & England, 2015), se crearon para cada uno de ellos los niveles de estudio (seis niveles de pH, IBU y % ABV y cuatro niveles de % YFE), con los que se prepararon las cervezas-ajustadas, con el fin de evaluar la influencia de cada parámetro sobre el crecimiento de los microorganismos. Las veintidós cervezas-ajustadas ( $n=22$ ) se elaboraron a partir de cervezas comerciales artesanales, modificando solo un parámetro fisicoquímico, mientras que los otros parámetros se mantuvieron sin cambios.

En primer lugar, para evaluar la influencia del pH, se ajustó una cerveza artesanal (11 IBU, 0,5 % ABV, pH 4,25 y 1,45 % YFE) a los seis niveles de estudio de pH (3,2; 3,5; 3,8; 4,1; 4,4 y 4,7) usando HCl 7 M o NaOH 7 M. Con respecto a la influencia del etanol, se ajustó una cerveza sin alcohol (11 IBU, 0,04 % ABV, pH 4,18 y 2,4 % YFE) a los seis niveles de % ABV (0,04 %, 2,5 %, 5,0 %, 7,5 %, 10,0 % y 12,0 %) mediante la adición de etanol absoluto. Las unidades de amargor se evaluaron usando mezclas de una cerveza artesanal (10 IBU, 0,1 % ABV, pH 4,2 y 2 % YFE) con una cerveza sin alcohol muy lupulada (52 IBU, 0,1 % ABV, pH 4,6 y 3 % YFE) con las que se obtuvieron los seis niveles de IBU (10, 15, 20, 30, 40 y 50). La preparación de estas

mezclas solo ocasionó cambios mínimos en los otros parámetros estudiados. Finalmente, se ajustó una cerveza sin alcohol (9 IBU, 0,1 % ABV, pH 4,20 y 0,76 % YFE) a los cuatro niveles de % YFE (0,76 %, 1,16 %, 1,96 % y 2,36 %) mediante la adición de jarabe de maltosa estéril. Antes de la preparación, todas las cervezas se esterilizaron mediante doble filtración utilizando filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2.3. Evaluación G/NG del primer grupo de datos del modelo

Se investigaron los efectos de los seis niveles de pH, IBU y % ABV y los cuatro niveles de % YFE sobre el crecimiento de cada una de las cepas ensayadas. Para ello, las cepas se inocularon por separado en las veintidós cervezas-ajustadas y por triplicado. Para preparar los inóculos, las cepas (L1, D1, 216, F1, B6, B2, B1, F2 y H2), previamente adaptadas a la cerveza en la BEB 3, se incubaron a 28 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente los cultivos se centrifugaron (3000 rcf, 5 min) y los *pellets* se lavaron dos veces y resuspendieron en una solución de NaCl al 0,9 %. La inoculación se realizó dentro de una cabina de anaerobiosis, agregando 10  $\mu\text{L}$  de la solución de inóculo en cada pocillo de una microplaca (de 96 pocillos) que contenía 240  $\mu\text{L}$  de cada cerveza-ajustada, con el objetivo de alcanzar una concentración aproximada de 5 log UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Finalmente, se sellaron las microplacas para minimizar la pérdida de volumen y la entrada de oxígeno. Para evaluar el efecto del alcohol, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de inóculo en 1,2 mL de cada cerveza-ajustada en tubos Eppendorf de 2 mL. Como blanco, se utilizaron pocillos o tubos con cada una de las cervezas-ajustadas sin inocular.

Las  $\text{DO}_{590\text{nm}}$  se midieron al inicio y después de 15 días de incubación estática a 28 °C en anaerobiosis en un lector multimodal de microplacas BioTek SYnergy™ HTX, utilizando el software de análisis de datos Gen5™ (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.). Se registró el valor de “1” cuando se observó un crecimiento microbiano, es decir, cuando la diferencia entre  $\text{DO}_{\text{muestra}}$  y  $\text{DO}_{\text{blanco}}$  fue superior a tres veces la desviación estándar de la señal del blanco (Vermeulen et al., 2007) y el valor “0” en caso contrario. De esta forma se asignaron las variables de respuesta dicotómicas. Al final de la incubación, se comprobó la pureza microbiana de las muestras con valor “1” por siembra microbiológica y evaluación de las colonias por su color y características morfológicas, observación microscópica de la morfología celular, pruebas de KOH y catalasa. Finalmente, los resultados claramente anómalos o atípicos fueron excluidos. Se consideraron los casos en los que las condiciones ambientales fueron menos severas provocando una disminución en la probabilidad de crecimiento, o viceversa (Gysemans et al., 2007).

### **4.2.3. Generación de los resultados G/NG en cervezas artesanales comerciales para el segundo grupo de datos del modelo**

#### **4.2.3.1. Selección de cervezas artesanales comerciales**

De las veinte cervezas artesanales comerciales de 10 estilos diferentes mencionadas en la sección 4.2.2.1, se realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos. A continuación, solo se trabajó con las cervezas libres de cualquier contaminante microbiano ( $n = 17$ ) (Figura 26).

#### **4.2.3.2. Evaluación G/NG en cervezas artesanales comerciales para el segundo grupo de datos del modelo**

Las botellas de cerveza se homogenizaron individualmente antes de abrirlas, para inocularlas con los microorganismos (L1, D1, 216, F1, B6, B1, F2 y H2). La inoculación se realizó por duplicado con cada cepa adaptada ( $5 \times 10^3$  ufc mL<sup>-1</sup>) y en fase estacionaria temprana. La inoculación se realizó dentro de una cabina de anaerobiosis. A continuación, las botellas fueron cerradas dentro de la misma cabina usando coronas estériles y se incubaron a 28 °C durante 30 días, en los que se evaluó visualmente alguna evidencia de crecimiento (turbidez, opacidad o formación de gas). El recuento de células de levadura y de BAL viables se realizó a los 0 y 30 días de incubación mediante la técnica de *spot* en placa. Para ello, las BAL fueron sembradas en placas con agar MRSm e incubadas en anaerobiosis a 28 °C durante 10 días. La levadura fue sembrada en placas con agar YPD (levadura-peptona-dextrosa), suplementado con 10 ppm de cicloheximida y 0,022 g L<sup>-1</sup> de verde de bromocresol, e incubada a 28 °C durante 7 días. Para categorizar los resultados, se asignó el valor “1” en las muestras con crecimiento microbiano (una diferencia de más de 1 log UFC mL<sup>-1</sup> con respecto al inóculo inicial) (Valero et al., 2006), y el valor “0” en caso contrario. La evaluación de las colonias y la exclusión de los valores atípicos se realizaron según lo mencionado en la sección 4.2.2.3.

#### **4.2.4. Desarrollo del modelo**

En la generación del modelo, los datos se modelaron para vincular una variable de respuesta binaria G/NG de todas las cepas ensayadas al conjunto de los cuatro parámetros fisicoquímicos (pH, IBU, % ABV, % YFE) a través de una ecuación polinómica que incorpora las interacciones entre estos factores. Para mejorar su robustez y precisión se fusionaron los datos de ambos grupos de muestras, para trabajar con una mayor cantidad de datos. Las categorías para el análisis estadístico se mantuvieron tal como se describieron anteriormente (“1” y “0”).

Para predecir la probabilidad de crecimiento microbiano en las cervezas se desarrolló un modelo de regresión logística binaria de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Logit}(P) = \ln(P/(1-P)) = f,$$

donde  $P$  es la probabilidad de crecimiento a modelar y  $f$  se define por la siguiente función:

$$f = b_0 + b_1 F_1 + b_2 F_2 + \dots + b_n F_n + b_{12} F_1 F_2 + \dots + b_{n-1,n} F_{n-1} F_n;$$

en el que  $b$  representa los parámetros a ajustar y  $F_n$  representa los cuatro factores intrínsecos de la cerveza (pH, IBU, % ABV, % YFE) utilizados en el modelo.

Para utilizar el modelo de regresión logística binomial este debe cumplir la condición de no haber multicolinealidad entre las variables independientes, ya que la multicolinealidad provoca inestabilidad al calcular los predictores individuales del modelo. Para el diagnóstico de multicolinealidad entre variables independientes se determinó la tolerancia y el factor de inflación de la varianza (FIV). Los análisis de multicolinealidad y de regresión logística binaria se realizaron utilizando el software SPSS 25 (SPSS, Inc., EE. UU.), y con intervalos de confianza y nivel de significancia del 95 % y  $p < 0,05$ , respectivamente. Se seleccionó el método de “selección de variables por pasos hacia adelante” (Wald) y se calcularon los índices de fiabilidad predictiva y las estadísticas de bondad de ajuste: (i) la prueba ómnibus de coeficientes del modelo, (ii) el coeficiente de determinación Nagelkerke  $R^2$  (Nagelkerke, 1991), (iii) la prueba de Hosmer y Lemeshow (HL) (Lemeshow & Hosmer, 1982); y (iv) el porcentaje de aciertos según la tabla de clasificación. Las variables independientes sobre el crecimiento (variable dependiente) se analizaron mediante el  $\text{Chi}^2$  de Wald y Odd ratio. El punto de corte establecido para el modelo fue 0,5, siendo  $P$  = probabilidad de crecimiento microbiano. Para visualizar las predicciones del modelo, se construyeron representaciones gráficas en forma de diagramas de contorno, considerando las probabilidades predichas de 0,9; 0,5; y 0,1. Además, se calcularon las probabilidades de crecimiento estimadas para diferentes niveles de pH y % ABV.

#### **4.2.5. Validación del modelo**

La validación del modelo se realizó externamente dentro del área de interpolación (Hilbe, 2009), con datos adicionales generados a partir de noventa evaluaciones G/NG resultantes de la inoculación de los nueve microorganismos (L1, D1, 216, F1, B6, B2, B1, F2 y H2) en diez nuevas cervezas artesanales comerciales de diferentes estilos de cerveza. Éstas se

inocularon con cada una de las cepas adaptadas a la cerveza siguiendo el método detallado en la sección 4.2.3.2. Los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de las cervezas se determinaron de acuerdo con el apartado 4.2.2.1. De igual modo, se calcularon las “probabilidades observadas” para cada cerveza utilizando los resultados G/NG y la “probabilidad predicha” utilizando la ecuación del modelo desarrollado detallado en la sección anterior (4.2.4). Teniendo en cuenta los valores obtenidos de las probabilidades de cada una de las cervezas y el punto de corte del modelo, las cervezas se clasificaron como “muy susceptible” si la probabilidad era mayor que el punto de corte; o como “poco susceptible” cuando la probabilidad era menor. Se compararon los resultados de esta clasificación con los determinados y se obtuvo un porcentaje de predicción correcta para el modelo.

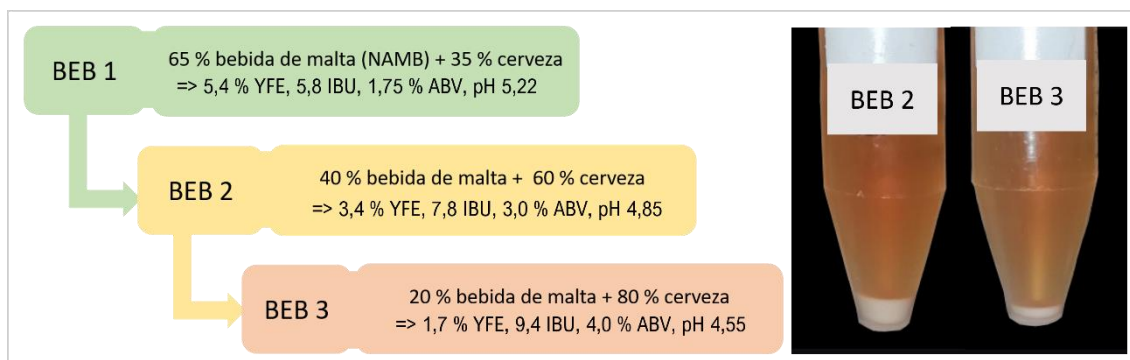
Finalmente, para la aceptabilidad del modelo también se tuvo en cuenta si la especificidad y la sensibilidad, los cuales tuvieron porcentajes cercanos al 100 %.

### **4.3. Resultados**

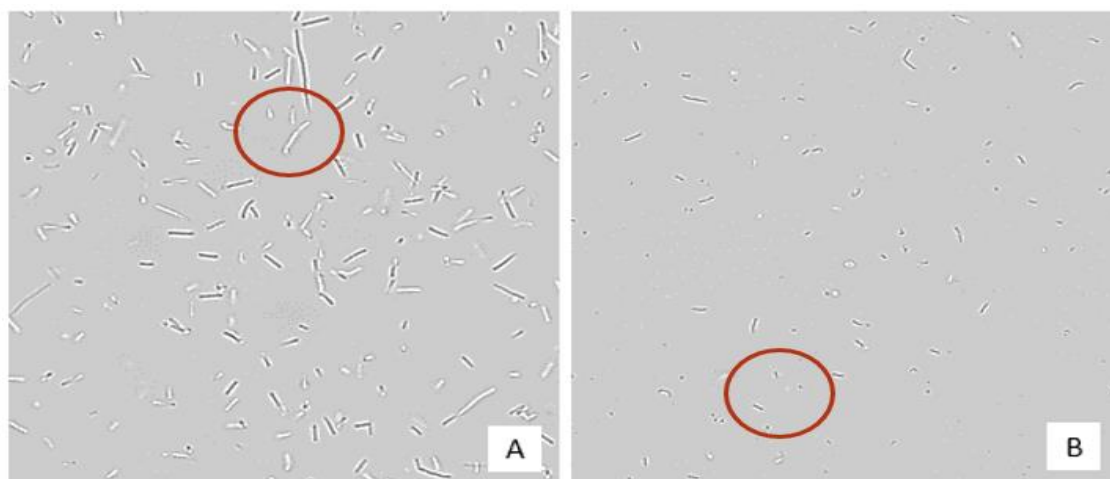
#### ***4.3.1. Adaptación de los microorganismos a una bebida tipo cerveza y determinación de su fase estacionaria temprana***

Todas las cepas seleccionadas, ocho de BAL y una de levadura (Tabla 23) lograron adaptarse secuencialmente a las tres bebidas (BEB 1, BEB 2 y BEB 3), las cuales fueron preparadas aumentando gradualmente el % ABV e IBU mientras se reducía el pH y el % YFE con la finalidad de obtener poco a poco una bebida con las características de una cerveza (Figura 27). Como era de esperar, se observó en todas las cepas una menor producción de biomasa a medida que la bebida cambiaba los valores de sus parámetros fisicoquímicos hacia condiciones más estresantes. También el tamaño celular de las cepas adaptadas de *L. brevis* se redujeron considerablemente en la BEB 3 (3 - 6  $\mu\text{m}$ ) respecto al que se presentaban cuando las cepas se cultivaron en medio MRS sin pasar por el proceso de adaptación (10 - 12  $\mu\text{m}$ ) (Figura 28).

Las BAL en estudio alcanzaron la fase estacionaria temprana entre las 24 - 56 h en medio MRS, mientras que la levadura *D. bruxellensis* en 60 h en medio YPD. Sin embargo, se observó un retardo de la fase estacionaria temprana en la BEB 3, que para *D. bruxellensis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *P. damnosus* y *L. paracasei* se alcanzó a las 79 - 85 h, mientras que *L. pseudomesenteroides* y *L. citreum* lo hicieron a las 91 h.



**Figura 27.** Composición de las bebidas preparadas para la adaptación secuencial (BEB 1, BEB 2 y BEB 3) y biomasa producida en BEB 2 y BEB 3 por *D. bruxellensis* CIALH2.



**Figura 28.** Observación microscópica de *L. brevis* CIALBD1. (A), después de un período de incubación microaerófila durante 5 días a 28 °C en MRS; (B), después del periodo de adaptación en BEB 3.

#### **4.3.2. Datos del modelo: resultados G/NG en cervezas ajustadas y en cervezas artesanales comerciales**

##### **4.3.2.1. Datos del primer grupo: resultados G/NG en las cervezas ajustadas a diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos**

Los análisis microbiológicos de todas las cervezas utilizadas como base para la preparación de las cervezas-ajustadas confirmaron que estaban libres de contaminantes microbianos. Los resultados de cada evaluación G/NG en las cervezas ajustadas del primer grupo de datos están detallados en el Anexo 1 (ensayos núm. 1 - 197). De los 197 valores solo se detectó un valor atípico y fue excluido de los datos G/NG del primer grupo para el desarrollo del modelo.

#### 4.3.2.2. Datos del segundo grupo: resultados G/NG en cervezas artesanales comerciales

Los resultados de los análisis fisicoquímicos (pH, IBU, % ABV) de las veinte cervezas artesanales, de 10 estilos diferentes, se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Valores de los principales parámetros fisicoquímicos de las veinte cervezas artesanales comerciales.

Cerveza	% ABV	pH	IBU	% YFE
Stout A	4,2 ± 0,0 <sup>d</sup>	4,27 ± 0,00 <sup>b</sup>	31 ± 0 <sup>k</sup>	1,37 ± 0,05 <sup>fg</sup>
Stout B	9,0 ± 0,0 <sup>n</sup>	4,37 ± 0,00 <sup>b</sup>	44 ± 0 <sup>l</sup>	1,26 ± 0,00 <sup>e</sup>
Pale ale A	5,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	4,09 ± 0,00 <sup>b</sup>	23 ± 0 <sup>h</sup>	1,39 ± 0,05 <sup>fg</sup>
Pale ale B	5,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	4,06 ± 0,00 <sup>b</sup>	22 ± 0 <sup>g</sup>	2,97 ± 0,05 <sup>k</sup>
Porter A	5,9 ± 0,0 <sup>i</sup>	4,08 ± 0,00 <sup>b</sup>	22 ± 0 <sup>g</sup>	1,31 ± 0,09 <sup>ef</sup>
Porter B	5,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	4,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	29 ± 0 <sup>j</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>
Brown ale A	4,3 ± 0,0 <sup>q</sup>	4,17 ± 0,01 <sup>b</sup>	21 ± 0 <sup>f</sup>	0,74 ± 0,05 <sup>c</sup>
Brown ale B	5,2 ± 0,0 <sup>f</sup>	4,46 ± 0,00 <sup>c</sup>	44 ± 0 <sup>m</sup>	1,45 ± 0,05 <sup>g</sup>
Amber ale A	5,5 ± 0,0 <sup>g</sup>	4,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	24 ± 0 <sup>h</sup>	0,55 ± 0,08 <sup>b</sup>
Amber ale B	5,8 ± 0,0 <sup>h</sup>	4,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	31 ± 0 <sup>k</sup>	0,71 ± 0,00 <sup>c</sup>
IPA A	7,2 ± 0,0 <sup>l</sup>	4,32 ± 0,01 <sup>b</sup>	74 ± 0 <sup>n</sup>	1,73 ± 0,01 <sup>h</sup>
IPA B	8,5 ± 0,0 <sup>m</sup>	4,70 ± 0,02 <sup>d</sup>	75 ± 0 <sup>o</sup>	0,92 ± 0,05 <sup>d</sup>
Strong ale A	6,5 ± 0,0 <sup>j</sup>	4,20 ± 0,02 <sup>b</sup>	16 ± 0 <sup>e</sup>	2,65 ± 0,04 <sup>j</sup>
Strong ale B	10,0 ± 0,0 <sup>o</sup>	4,44 ± 0,01 <sup>c</sup>	25 ± 0 <sup>i</sup>	1,73 ± 0,00 <sup>h</sup>
No-alcohol A	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,02 <sup>b</sup>	11 ± 0 <sup>b</sup>	2,37 ± 0,00 <sup>i</sup>
No-alcohol B	0,5 ± 0,0 <sup>b</sup>	4,49 ± 0,00 <sup>c</sup>	16 ± 0 <sup>e</sup>	3,05 ± 0,05 <sup>k</sup>
Wheat beer A	5,5 ± 0,0 <sup>g</sup>	4,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	15 ± 0 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,05 <sup>d</sup>
Wheat beer B	3,8 ± 0,0 <sup>c</sup>	3,14 ± 0,03 <sup>a</sup>	12 ± 0 <sup>c</sup>	2,37 ± 0,00 <sup>i</sup>
Bock A	12,0 ± 0,0 <sup>p</sup>	4,66 ± 0,15 <sup>d</sup>	25 ± 0 <sup>i</sup>	1,68 ± 0,12 <sup>h</sup>
Bock B	7,0 ± 0,0 <sup>l</sup>	4,23 ± 0,01 <sup>b</sup>	10 ± 0 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>c</sup>

Los valores representan las medias de tres cervezas diferentes ± DS. Los valores en la misma columna seguidos de letras diferentes indican que son significativamente diferentes según la prueba de LSD ( $p < 0,05$ ).

Los resultados microbiológicos del crecimiento de bacterias ácido-lácticas, acéticas y levaduras en las cervezas se muestran en la Tabla 25 y revelan que tres de las veinte cervezas artesanales presentaron contaminación por presencia de BAL, por lo cual fueron descartadas para la inoculación de las cepas seleccionadas, quedando diecisiete cervezas artesanales para la generación de datos del segundo grupo.

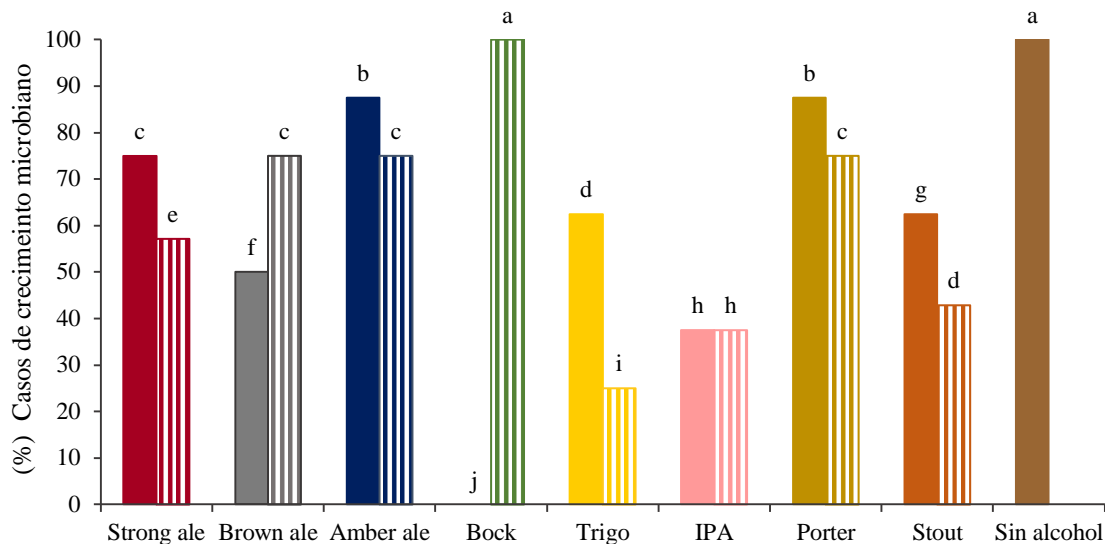


**Tabla 25.** Resultados del análisis microbiológico de las veinte cervezas artesanales.

Estilos cerveceros	Bacterias ácido-lácticas	Bacterias ácido-acéticas	Levaduras salvajes
	UFC 100 mL <sup>-1</sup>	UFC 100 mL <sup>-1</sup>	UFC 100 mL <sup>-1</sup>
Strong ale A	< 1	< 1	< 1
Strong ale B	< 1	< 1	< 1
Brown ale A	< 1	< 1	< 1
Brown aleB	< 1	< 1	< 1
Pale ale A	25	< 1	< 1
Pale ale B	15	< 1	< 1
Amber ale A	< 1	< 1	< 1
Amber ale B	< 1	< 1	< 1
Bock A	< 1	< 1	< 1
Bock B	< 1	< 1	< 1
Trigo A	< 1	< 1	< 1
Trigo B	< 1	< 1	< 1
IPA A	< 1	< 1	< 1
IPA B	< 1	< 1	< 1
Porter A	< 1	< 1	< 1
Porter B	< 1	< 1	< 1
Sin alcohol A	< 1	< 1	< 1
Sin alcohol B	35	< 1	< 1
Stout A	< 1	< 1	< 1
Stout B	< 1	< 1	< 1

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de los casos de crecimiento microbiano (% CCM) en las diecisiete cervezas artesanales comerciales, de 10 estilos diferentes, inoculadas con cada uno de los nueve microorganismos (Figura 29).

Los resultados de la evaluación G/NG de las diecisiete cervezas comerciales del segundo grupo de datos del modelo, están detallados en el Anexo 1 (ensayos núm. 198 - 331). De estos resultados se detectaron y excluyeron dos valores atípicos.



**Figura 29.** Porcentaje de casos de crecimiento microbiano en las diecisiete cervezas artesanales. Strong ale (■ A; □ B), Brown ale (■ A; □ B), Amber ale (■ A; □ B), Bock (■ A; □ B), Trigo (■ A; □ B), IPA (■ A; □ B), Porter (■ A; □ B), Stout (■ A; □ B) y cerveza sin alcohol (■ A). El porcentaje de CCM con diferentes letras minúsculas (a - j) sobre cada columna indican que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), usando la prueba de LSD. A y B identifican dos marcas diferentes para cada estilo de cerveza.

### 4.3.3. Modelo generado

Para el desarrollo del modelo se realizó un modelo de regresión logística polinomial utilizando los resultados G/NG de ambos grupos de datos (secciones 4.3.2.1 y 4.3.2.2) para describir la influencia de los parámetros fisicoquímicos de la cerveza (pH, IBU, % ABV y % YFE) sobre una variable de respuesta binaria G/NG.

#### 4.3.3.1. No-multicolinealidad

En el análisis de multicolinealidad se considera que cuando el valor de tolerancia es menor a 0,10 y/o el FIV mayor a 2,5 es un indicativo de multicolinealidad (Midi et al., 2010). Todos los valores de tolerancia fueron mayores a 0,4 y a la vez menores a 1, y los valores de los FIV fueron inferiores a 2,3, lo que indica que no hubo multicolinealidad entre las variables del modelo (Tabla 26), lo que permitió continuar con el proceso de modelamiento.

**Tabla 26.** Resultados de las pruebas de multicolinealidad.

Variable	Tolerancia	FIV	Variable	Tolerancia	FIV
% ABV	0,888	1,127	pH	0,799	1,252
IBU	0,762	1,312	% YFE	0,954	1,048

#### 4.3.3.2. Fiabilidad del modelo

La capacidad predictiva del modelo se analizó utilizando un punto de corte de  $P = 0,5$  ( $P =$  probabilidad de crecimiento microbiano). En la Tabla 27 se resume las variables estadísticas de bondad de ajuste y las que contribuyen al desarrollo del modelo: coeficientes de regresión, error estándar, valores de Wald y su significancia estadística asociada, y el Odd ratio (OR). Los valores de los coeficientes de la Tabla 27, permitieron construir el modelo, el cual quedó expresado mediante la siguiente función:

$$\ln (P/(1-P)) = -9,608 - 0,346 \% \text{ ABV} - 0,042 \text{ IBU} + 3,161 \text{ pH}$$

En la que  $P$  es la probabilidad de crecimiento y tiene valores entre 0 y 1.

**Tabla 27.** Valores de las variables estadísticas que contribuyen al modelo.

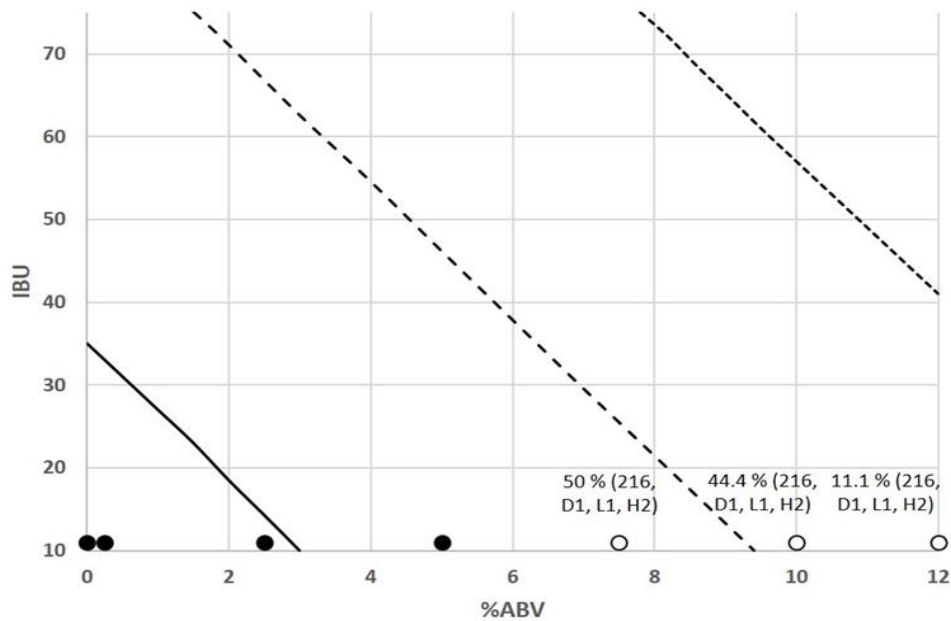
R <sup>2</sup> de Nagelkerke	Valor-p HL	Parámetro	Coefficientes	Error estándar	Wald	Significancia (Wald)	Odd ratio
0,41	0,133	<b>Constante</b>	-9,608	2,030	22,397	0,000	0,000
		<b>% ABV</b>	-0,346	0,049	50,429	0,000	0,708
		<b>IBU</b>	-0,042	0,010	16,834	0,000	0,959
		<b>pH</b>	3,161	0,540	34,306	0,000	23,58

La tabla de clasificación (Tabla 28) muestra que el modelo alcanzó una tasa de precisión en la predicción del 83,4 %. De esta tabla se obtuvieron también la sensibilidad y especificidad del modelo, cuyos valores fueron 87 % y 71 %, respectivamente; así como un valor predictivo positivo (VPP) de 91,4 % y un valor predictivo negativo (VPN) del 60,5 %.

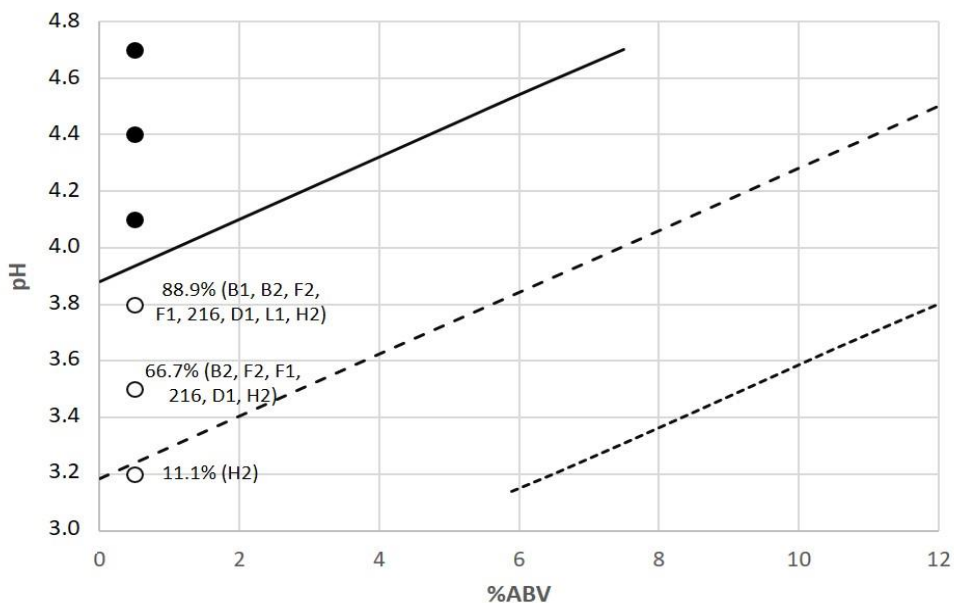
**Tabla 28.** Tabla de clasificación del modelo.

Clasificación	Valores predichos		
Valores observados	Valor "0" (NG)	Valor "1" (G)	Porcentaje correcto
<b>Valor "0" (NG)</b>	52	34	60,5
<b>Valor "1" (G)</b>	21	224	91,4
<b>Porcentaje global</b>			83,4

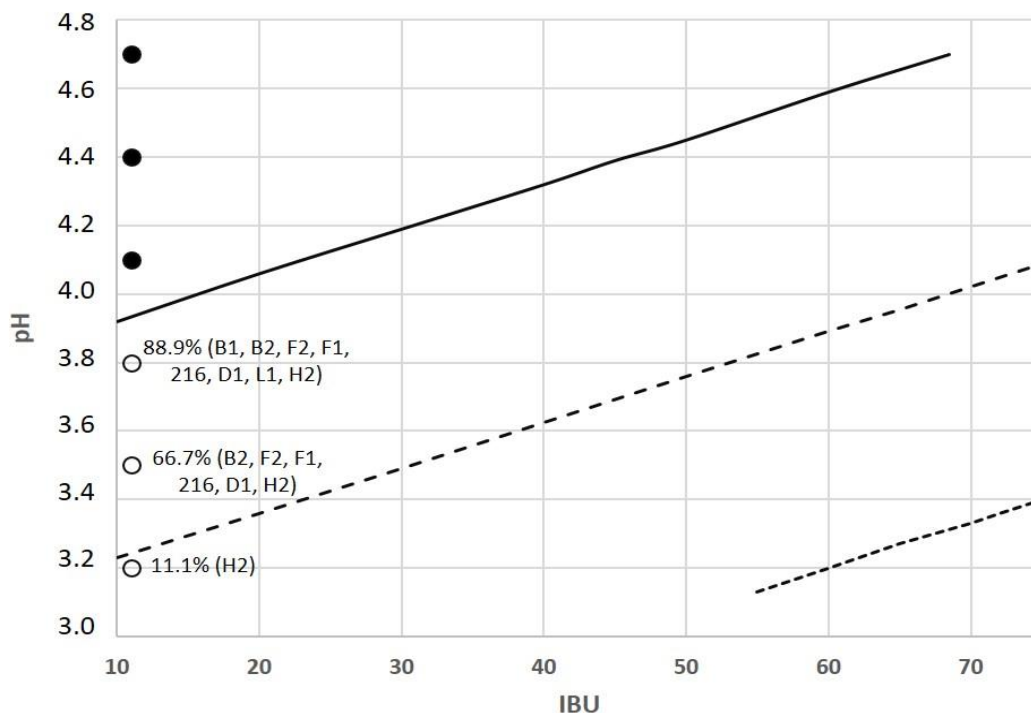
Las gráficas en forma de diagramas de contorno (Figuras 30 - 32) permiten visualizar las predicciones del modelo de regresión logística binaria a niveles de 0,9; 0,5; y 0,1; evaluar su rendimiento y las probabilidades predichas de crecimiento para cada par de los principales factores intrínsecos de la cerveza.



**Figura 30.** Gráficos de contorno para representar cómo se relacionan los valores de las respuestas de crecimiento observadas y las probabilidades predichas [P = 0,1 (.....), P = 0,5 (- - -) y P = 0,9 (-)] del deterioro microbiano de la cerveza artesanal en función del % ABV y IBU. Los valores de pH y % YFE se establecieron en 4,2 y 2,37, respectivamente. (●) P = 1 (crecimiento), (○) P = 0 (sin crecimiento). Los porcentajes indican la proporción de cepas que muestran crecimiento, las cuales se describen entre paréntesis.



**Figura 31.** Gráficos de contorno para observar cómo se relacionan los valores de las respuestas de crecimiento observadas y las probabilidades predichas [P = 0,1 (.....), P = 0,5 (- - -) y P = 0,9 (-)] del deterioro microbiano de la cerveza artesanal en función del % ABV y pH. Los valores de IBU y % YFE se fijaron en 11 y 1,45, respectivamente. (●) P = 1 (crecimiento), (○) P = 0 (sin crecimiento). Los porcentajes indican la proporción de cepas que muestran crecimiento, y se describen entre paréntesis.

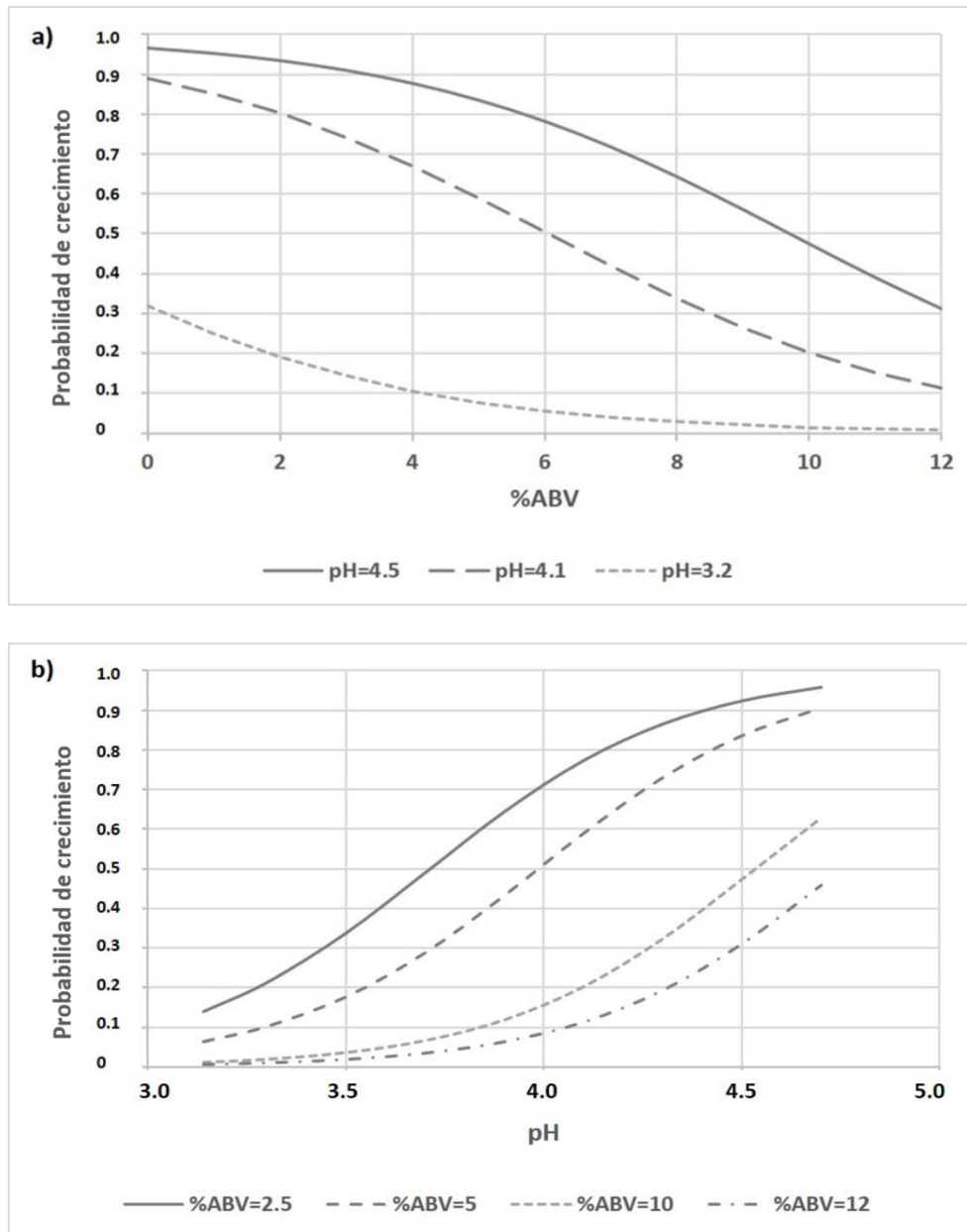


**Figura 32.** Gráficos de contorno para representar cómo se relacionan los valores de las respuestas de crecimiento observadas y las probabilidades predichas [ $P = 0,1$  (.....),  $P = 0,5$  (- - -) y  $P = 0,9$  (-)] del deterioro microbiano de la cerveza artesanal en función de IBU y pH. Los valores de % ABV y % YFE se fijaron en 0,5 y 1,45, respectivamente. (●)  $P = 1$  (crecimiento), (○)  $P = 0$  (sin crecimiento). Los porcentajes indican la proporción de cepas que muestran crecimiento, y se describen entre paréntesis.

Las probabilidades predichas de crecimiento microbiano en función del % ABV a diferentes niveles de pH (3,2; 4,1 y 4,5) se representan en la Figura 33a, mientras que la influencia del pH en la probabilidad predicha de crecimiento a diferentes niveles de alcohol (2,5; 5,0; 10,0 y 12,0 % ABV), se representan en la Figura 33b.

#### 4.3.4. Validación del modelo

Las diez cervezas artesanales utilizadas para la validación externa del modelo no presentaron contaminantes microbianos. Los datos de las probabilidades observadas (según los resultados G/NG) y las probabilidades predichas para cada una de las diez cervezas, así como los resultados de la clasificación de las cervezas (punto de corte = 0,5) están detallados en el Anexo 2. La Tabla de clasificación de las probabilidades observadas y predichas (Tabla 29) del modelo generado predijo correctamente el 100 % de los nuevos casos evaluados para la validación.



**Figura 33.** Probabilidades predichas de crecimiento microbiano. (a), En función del % ABV a diferentes niveles de pH (3,2; 4,1; 4,5); (b), en función del pH a diferentes niveles de % ABV (2,5; 5,0; 10,0; 12,0). Los valores de % YFE e IBU se fijaron en 2,37 y 30, respectivamente.

**Tabla 29.** Tabla de clasificación de las probabilidades observadas y predichas del modelo.

Probabilidades observadas	Probabilidades predichas		% Correcto
	Valor		
	Muy susceptible	Poco susceptible	
Poco susceptible	1	0	100
Muy susceptible	0	9	100
<b>% Global</b>			100



## *Capítulo III*





## 5. CAPÍTULO III. SELECCIÓN Y APLICACIÓN DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES COMO LEVADURAS FERMENTATIVAS EN MONOCULTIVO PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL

### 5.1. Planteamiento

La composición química de la cerveza y, por tanto, sus características sensoriales están determinadas, en gran medida, por los metabolitos liberados por las levaduras durante la fermentación. Por ello, la diversidad genética y metabólica asociada a las levaduras es determinante para el perfil aromático y sabor de la cerveza resultante. Durante décadas, de forma tradicional, el ecosistema microbiano de la cerveza se ha basado en especies e híbridos de las levaduras convencionales *Saccharomyces* spp. En los últimos años, la innovación en cervecería se traduce en esfuerzos por lograr un producto que se diferencie principalmente en sus propiedades organolépticas. Por ello, la selección de nuevas cepas de levaduras silvestres no convencionales que satisfagan estas necesidades es un gran desafío para investigadores y la industria cervecera. En este contexto las levaduras no-*Saccharomyces*, solas o en co-cultivo/fermentación secuencial con *S. cerevisiae*, se postulan como una herramienta muy interesante para modular mejor el pH, contenido en ácidos orgánicos, compuestos volátiles y otros compuestos derivados de la vía metabólica de la levadura, modificando así las características sensoriales de las cervezas. En la actualidad, solo hay un pequeño número de levaduras no-*Saccharomyces* disponibles comercialmente para la elaboración de cerveza. En este estudio, se estableció un sistema de cribado y selección de cepas de levadura potenciales para ser utilizadas como levadura fermentativa en monocultivo con la finalidad de producir cervezas específicas con perfiles sensoriales agradables. Además, se evaluó el potencial cervecero de la cepa seleccionada *L. thermotolerans* CIAL 37 en fermentación tipo monocultivo.

### 5.2. Materiales y métodos

#### 5.2.1. Selección de levaduras no-*Saccharomyces*

Inicialmente para este estudio se realizó un screening a partir de un total de 141 cepas de levadura no-*Saccharomyces* aisladas de diferentes orígenes enológicos e identificadas en un estudio previo mediante secuenciación parcial del gen ARNr 26S (Belda et al., 2016). De las cuales, 98 cepas se obtuvieron de la colección de levaduras del Instituto de

Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC, España) y 43 cepas de la colección de levaduras del Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM, España). Estas levaduras pertenecen principalmente a los géneros *Hanseniaspora* (13), *Kluyveromyces* (4), *Lachancea* (4), *Metschnikowia* (33), *Meyerozyma* (1), *Pichia* (12), *Schizosaccharomyces* (5), *Torulaspora* (43), *Wickerhamomyces* (20), *Yarrowia* (2) y *Zygosaccharomyces* (4). Las levaduras conservadas a -80 °C, en medio YPD (extracto de levadura-peptona-dextrosa) suplementado con 80 % de glicerol, se cultivaron en medio YM (extracto de levadura-extracto de malta-glucosa) a 25 °C durante 72 h y se lavaron dos veces para eliminar la influencia del medio de cultivo anterior. A continuación, para cada cepa de levadura se preparó un inóculo en solución salina con una turbidez estándar de 1 en la escala de McFarland (*Inóculo de Levadura*).

La Figura 34 muestra el esquema de la metodología de este estudio, incluyendo desde las pruebas del cribado de levaduras hasta la elaboración a escala piloto de un lote pequeño de cerveza. En una primera selección de las cepas de levadura, se evaluó la capacidad de fermentación de maltosa. Posteriormente, se realizó la caracterización fenotípica y fermentativa de las levaduras en dos etapas de cribado.



**Figura 34.** Esquema de la metodología de este estudio. Selección y aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* como levaduras fermentativas en monocultivo para la elaboración de cerveza artesanal.

### 5.2.2. Capacidad de fermentación de maltosa

Para realizar una primera selección de las cepas de levadura, se evaluó la capacidad de fermentación de maltosa, azúcar mayoritario del mosto cervecero. Para ello, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada Inóculo de Levadura a 5 mL del medio de fermentación ajustado a pH 6,0 (peptona 0,75 %, extracto de levadura 0,45 %, maltosa 1,0 % y rojo de clorofenol 0,04 %) en un tubo de ensayo provisto de una campana de Durham invertido. Las tapas de los tubos se mantuvieron aflojadas durante la incubación aeróbica a 25 °C. La lectura se realizó a los 7 días de incubación.

### 5.2.3. Primera etapa de caracterización de levaduras

#### 5.2.3.1. Actividad sulfito-reductasa

La producción de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) se determinó utilizando el método de (Linderholm et al., 2008) modificado de acuerdo con (Belda et al., 2016). Para ello, 10  $\mu\text{L}$  de cada Inóculo de Levadura  $\text{DO}_{590\text{nm}} = 1$  se incubaron por duplicado en microplacas de 96 pocillos con fondo redondo que contenían 200  $\mu\text{L}$  de medio (base de carbono de levadura 0,17 %, glucosa 4 % y sulfato de amonio 0,5 %). Las microplacas se cubrieron con un papel de filtro Whatman seco, que previamente se había impregnado con solución de acetato de plomo 0,1 M y se incubaron a 28 °C con agitación orbital a 100 rpm durante 3 días. La intensidad del color debida a la producción de sulfuro de plomo, que origina en el papel manchas oscuras, se cuantificó por densitometría utilizando el software myImageAnalysis™ 1.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA). Como control positivo se utilizó la cepa *D. bruxellensis* CIAL115 y como control negativo la cepa *Torulaspora delbrueckii* CECT 10676. Los resultados se clasificaron según la intensidad del color en: producción nula, débil, moderada e intensa.

#### 5.2.3.2. Producción de compuestos fenólicos simples

La producción de compuestos fenólicos simples se evaluó de acuerdo con (Mertens et al., 2017). Una colonia de cada levadura cultivada en agar YM se inoculó por triplicado en 150  $\mu\text{L}$  de medio YPD suplementado con 100  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido ferúlico, en una microplaca de 96 pocillos con fondo redondo que se selló con una película SealPlate® STR -SEAL-PLT. A continuación, se cubrió con papel de aluminio y se incubó a 25 °C durante 5 días con agitación orbital de 100 rpm. Las microplacas se centrifugaron (3000 rpm, 3 min.), y a continuación se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante a una microplaca de 96 pocillos con fondo plano y se midió la  $\text{DO}_{325\text{nm}}$  en un lector de microplacas multimodo BioTek SYnergy™ HTX (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Se incluyeron un control positivo (White Labs WLP550

Belgian Ale Yeast), un control negativo (SafLager S189) y un blanco (medio YPD suplementado con ácido ferúlico sin inoculación). Las cepas se consideraron productoras de compuestos fenólicos simples cuando la cantidad medida de ácido ferúlico estaba por debajo del 90 % del intervalo de confianza del blanco.

Simultáneamente, se evaluó la producción de compuestos fenólicos simples de acuerdo con (Meier-Dörnberg et al., 2017). Para ello, cada Inóculo de Levadura se extendió sobre agar YM suplementado con un único precursor: ácido ferúlico (0,05 %), cumárico (0,01 %) o cinámico (0,01 %) previamente disueltos en etanol absoluto. Después de incubar las placas a 25 °C durante 3 días, se evaluaron los correspondientes descriptores aromáticos debido a la producción de los compuestos: 4-vinilguayacol (clavo, curry, especia, ahumado, tocino); 4-vinilfenol (fenólico, medicinal, picante); 4-vinilestireno (espuma de poliestireno) y otros compuestos afines descritas por (Lentz, 2018).

### 5.2.3.3. Análisis del olor y sabor en fermentación a escala de laboratorio

Para las fermentaciones a escala de laboratorio, se preparó el mosto se utilizando un extracto de mosto cervecero concentrado sin lúpulo, según las instrucciones del fabricante (Muntons plc, Suffolk, Reino Unido). Se pasteurizó a 115 °C durante 15 minutos y se enfrió rápidamente hasta 20 °C, y se ajustó la gravedad a 12 °P y a pH de 5,4. Cada levadura previamente cultivada en agar YM (25 °C, 4 días) se inoculó por duplicado en 300 mL de mosto en matraces Erlenmeyer de 500 mL provistos de burbujeadores de aire (*airlock*), de modo tal que se alcanzase una tasa de inoculación de  $10 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Las fermentaciones se incubaron a 20 °C con agitación orbital a 90 rpm durante 48 h, continuando con una incubación estática hasta completar los 14 días de fermentación. La evaluación sensorial fue realizada por un panel de cata entrenado (n=6). Las muestras que presentaron aromas desagradables fueron retiradas del estudio. A continuación, se evaluó el sabor de las muestras que presentaron aromas agradables, mediante un panel de catadores entrenados que clasificó los aromas como agradables (florales, frutados, vinoso) y desagradables (solvente, sulfuroso, medicinal y a establo).

Con los resultados de esta primera caracterización de las levaduras, se realizó una nueva selección con el fin de descartar las cepas de levadura que producían compuestos azufrados y fenólicos desagradables, y continuar una segunda caracterización con las levaduras (n=4) que presentaron una producción de aroma y sabor agradables, y/o una o débil producción de H<sub>2</sub>S.

#### 5.2.4. Segunda caracterización de levaduras

##### 5.2.4.1. Asimilación y fermentación de azúcares

La asimilación de maltotriosa, glucosa, fructosa y sacarosa fueron analizadas por triplicado en microplacas de 96 pocillos que contenían 200  $\mu\text{L}$  de medio ( $10\text{ gL}^{-1}$  de extracto de levadura,  $20\text{ gL}^{-1}$  de peptona y  $20\text{ gL}^{-1}$  de azúcar (cada azúcar fue analizado independientemente). Cada Inóculo de Levadura se diluyó 1:10 en solución salina y se añadieron  $10\text{ }\mu\text{L}$  a cada pocillo para alcanzar  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  y se incubaron a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  durante 96 h. Las lecturas de las  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de los pocillos se realizaron cada 2,5 h, después de 1 minuto de agitación orbital, en un lector de microplacas multimodo BioTek SYnergy™ HTX, utilizando el software de análisis de datos Gen5™ 2.0 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.). El valor de la densidad del blanco fue sustraído de la densidad medida de cada muestra.

Para el análisis de fermentación de los azúcares mencionados anteriormente y, adicionalmente del azúcar lactosa, se empleó la metodología descrita en la sección 5.2.2.

##### 5.2.4.2. Crecimiento de las levaduras en presencia de lúpulo y etanol

Se evaluó el crecimiento de las cepas de levadura en presencia de lúpulo y etanol, tanto en mostos como en cervezas verdes para simular fermentaciones primarias y secundarias, respectivamente. Para el primer caso, se usó como sustrato un mosto preparado a partir de extracto de mosto concentrado Indian Pale Ale (IPA) (Brewferm®, Beverlo, Bélgica) y esterilizado por filtración. A partir de este sustrato se realizaron las siguientes preparaciones; i) Mostos IPA ajustado a 45 y 90 unidades internacionales de amargor (IBU); ii) Mostos IPA (45 y 90 IBU) ambos ajustados a 5 % de etanol (% ABV). Para el segundo caso se empleó como sustrato una cerveza verde Pilsen esterilizada por filtración, con adición de dextrosa  $8,7\text{ gL}^{-1}$ , con la que se realizaron las siguientes preparaciones: i) 5 % ABV, 30 IBU; ii) 5 % ABV, 90 IBU; iii) 10 % ABV, 30 IBU; iv) 10 % ABV, 90 IBU. Las IBU se ajustaron mediante la adición de una solución de iso- $\alpha$ -ácidos al 3 %, mientras que el % ABV con etanol absoluto.

Para evaluar el crecimiento se adicionaron a cada pocillo de microplacas de 96 pocillos 200  $\mu\text{L}$  de cada preparación (mostos o cervezas) por triplicado y  $10\text{ }\mu\text{L}$  de inóculo (solución 1:10 del Inóculo de Levadura) para llegar a  $10^5$  células por pocillo. Las microplacas se sellaron con una película SealPlate® STR-SEAL-PLT y se incubaron a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Las mediciones se realizaron de acuerdo con la sección 5.2.4.1.

#### 5.2.4.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa

El análisis de la actividad  $\beta$ -glucosidasa se determinó por el método de (Arevalo-Villena et al., 2005) mediante el uso de un medio sólido ajustado a pH 3,5 que contiene 0,5 % celobiosa (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucosa), 0,67 % base de nitrógeno de levadura y 2 % de agar (Belda et al., 2016). Se sembraron 10  $\mu$ l de cada Inóculo de Levadura sobre la superficie del agar y se incubaron a 28 °C durante 3 días, por triplicado. Como control positivo se utilizó a la cepa *R. glutinis* CECT10143 y como control negativo a la cepa *T. delbrueckii* CECT10676. Las levaduras se clasificaron en términos de producción de biomasa como de crecimiento débil, moderado e intenso.

#### 5.2.4.4. Prueba de floculación

La floculación se evaluó mediante la prueba de Helm según las modificaciones de (D'Hautcourt & Smart, 1999). Las levaduras se cultivaron aeróbicamente en mosto lupulado con 30 IBU, preparado a partir de extracto de mosto Pilsen (Brewferm®, Beverlo, Bélgica) y se incubaron a 25 °C en matraces Erlenmeyer con agitación a 120 rpm durante 72 horas. La  $DO_{600nm}$  se midió en un espectrofotómetro Specord®210 mediante el software WinASPECT® PLUS (V. 4.2, Analytik Jena AG, Jena, Alemania). Los ensayos se realizaron por triplicado y la floculación se expresó como porcentaje promedio. Si los valores están por encima del 85 % se considera como una levadura muy floculante, del 20 al 80 % floculante moderado y < 20 % como una levadura no floculante (ASBC, 2009).

#### 5.2.4.5. Cinética de fermentación

El mosto se preparó a partir de un extracto de malta concentrado sin lúpulo de acuerdo con la sección 5.2.3.3. En matraces Erlenmeyer de 1 L, se enfriaron volúmenes de 600 mL de mosto y con la finalidad de incorporar oxígeno al líquido se agitó durante 5 min. Se inocularon las levaduras a  $10 \times 10^6$  células  $mL^{-1}$ . Las botellas de fermentación se taparon con airclocks, se incubaron a las temperaturas de 20 °C y 25 °C y se controló la velocidad de fermentación hasta los 14 días de fermentación, midiendo la pérdida de peso debido a la producción y salida de  $CO_2$ . Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado. Posteriormente, se analizaron el pH y extracto con los métodos Beer-9 y Beer-3 (ASBC, 2009), respectivamente. La evaluación sensorial de los principales descriptores aromáticos, incluyendo los defectos, fue realizada por un panel de 6 jueces (*sommeliers* de cerveza) en catas ciegas, sin que ninguno de los jueces supiera qué cepas de levadura fermentaron las cervezas. Después de las evaluaciones individuales, el panel ponderó los atributos sensoriales de cada cerveza hasta llegar a un consenso sobre los mejores descriptores de aroma y sabor.

Después de la segunda caracterización de las levaduras, utilizamos la levadura seleccionada *L. thermotolerans* CIAL37 para elaborar a escala piloto un lote pequeño de cerveza.

### **5.2.5. Elaboración de cerveza a escala piloto de laboratorio con *L. thermotolerans* CIAL37**

#### **5.2.5.1. Propagación de la levadura y fermentación del mosto**

La secuencia generada de *L. thermotolerans* CIAL37 fue depositada en GenBank. Para la propagación, la levadura crecida en agar inclinado YM se transfirió a 100 mL del mosto no lupulado ajustado a 11 °P y pH 5,4, y se incubó a 25 °C con agitación orbital a 90 rpm, hasta alcanzar  $150 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. A continuación, se transfirió a 850 mL del mismo mosto, (incubando a 25 °C con agitación orbital a 100 rpm) hasta alcanzar  $150 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Cada fase de la propagación se realizó en matraces Erlenmeyer con tapón de algodón y por duplicado. El recuento y la viabilidad de la levadura se midieron al final de cada fase, de acuerdo con los métodos Yeast-4, Yeast-3, respectivamente (ASBC,2009).

El mosto Belgian Saison (Brewferm®, Beverlo, Bélgica) se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, luego se pasteurizó (95 °C, 5 min) y se ajustó a 11,8 °P, 20 IBU y pH 5,68. Se vertieron volúmenes de 9 L de mosto frío en fermentadores de 15 L, realizando un batido vigoroso dentro del fermentador con la finalidad de oxigenar el mosto. A continuación, se inoculó la levadura propagada y los fermentadores se cerraron con burbujeadores de aire que contenían alcohol 70 %, para permitir que solo escape del sistema el CO<sub>2</sub>. Las fermentaciones se realizaron por duplicado a 20 °C en condiciones estáticas. Se controló la evolución del pH y extracto. A los 14 días se realizó el acondicionamiento en botellas de 330 mL (fermentación secundaria) utilizando dextrosa 8,7 gL<sup>-1</sup> de cerveza, manteniéndose a 18 - 20 °C durante 10 días adicionales.

#### **5.2.5.2. Análisis de mosto y cerveza**

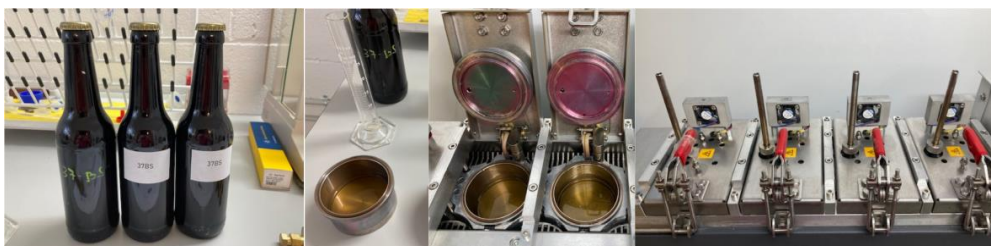
En el mosto y las fermentaciones de los 3 primeros días se analizaron la presencia de enterobacterias por siembra en superficie de agar MacConkey. En las fermentaciones de los días 7 y 14, así como en la cerveza terminada se analizó la presencia de BAL y bacterias acéticas, mediante la técnica de filtración por membrana según el método *Microbiological Control-2C* (ASBC, 2009), filtrando 50 mL de muestra por cada análisis, sembrando en agar MRS (Difco™ BD, Francia) y MIL-BA (Sarco, Floirac, Francia) e incubando a 28 y 25 °C durante 10 y 6 días, respectivamente. Adicionalmente, las muestras se sembraron en agar WLN (Difco™ BD, EE. UU.) para evaluar la presencia de alguna levadura contaminante.



En la cerveza terminada se analizaron el contenido de etanol, pH, extracto, amargor y acidez total según los métodos Beer-4F, Beer-9, Beer-3, Beer-23A y Beer-8A (ASBC, 2009), respectivamente. Se determinaron las concentraciones de los ácidos orgánicos: láctico, acético, málico y cítrico, empleando los métodos OIV-MA-AS313-25 R598/2018, OIV-MA-AS313-27 R621/2018, OIV-MA-AS313-26 R599/2018 y por espectrofotometría UV-VIS (método enzimático automatizado conforme OIV/OENO 391/2010), respectivamente. Adicionalmente, se determinaron el glicerol, amino nitrógeno libre (FAN) y los azúcares (glucosa + fructosa + sacarosa) por métodos enzimáticos de acuerdo con OIV/OENO 391/2010. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### 5.2.5.3. Análisis de compuestos volátiles por GC-ToF-MS

Los compuestos volátiles fueron analizados por GC-ToF-MS según los parámetros analíticos y las condiciones de detección descritas por (Prenafeta-Boldú et al., 2019), utilizando microcámaras térmicas de extracción. Se insertaron 25 mL de cada muestra en una microcámara individual de 114 mL completamente aislada del exterior a través de un cierre hermético y se estimuló la emisión de volátiles de la muestra, generando un flujo continuo de  $N_2$  ( $60 \text{ mL min}^{-1}$ ) hacia un tubo de termodesorción durante 33 min, necesarios para obtener un volumen adecuado de muestra (2 L) en el tubo de termodesorción (Figura 35). Posteriormente, los tubos de absorción se insertaron en la unidad de desorción térmica (Unity2, Markes, Reino Unido) del cromatógrafo de gases (Agilent 7890, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (BenchTOF-dx, Almsco, Alemania). Después, los compuestos volátiles fueron capturados en una trampa fría ( $-20$  a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que se calentó a  $300$  -  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , para liberar los volátiles hasta el cromatógrafo de gases para la separación cromatográfica. La separación se realizó en columna cromatográfica de polaridad media DB-624 (60 m,  $250 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $1,4 \text{ }\mu\text{m}$ ; Agilent, EE. UU.). Los compuestos una vez separados llegaron al detector de masas con diferentes tiempos de retención, donde fueron ionizados y, a través del selector *Flight Time (Time-of-flight, TOF)* se determinó la masa de iones para su identificación y se analizaron los datos digitales producidos por cada muestra.



**Figura 35.** Toma de muestra para el análisis de compuestos volátiles por GC-ToF-MS.

La concentración de los compuestos volátiles y sus respectivos Valores de Actividad de Aroma (VAO) fueron calculados según el cociente entre la concentración de un compuesto de aroma y su umbral de percepción olfativa.

#### **5.2.5.4. Análisis sensorial**

Las cervezas finales tras la fermentación secundaria se almacenaron a 4 °C y se analizaron sensorialmente por un panel de 10 jueces expertos, entre ellos cerveceros profesionales con una gran experiencia en el análisis sensorial de cervezas o jueces certificados por el BJCP (*Beer Judge Certification Program*) que evaluaron los principales descriptores olfativos y gustativos, así como sus principales características estructurales. Para cada atributo se utilizó una escala desde 1 (sin percepción del atributo) a 10 (atributo extremadamente perceptible) de acuerdo con el método *Sensory Analysis-10* (ASBC, 2009).

#### **5.2.6. Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 25 (SPSS, Inc., EE. UU.). Se utilizó la prueba *t* de *Student* pareada para determinar si había diferencias significativas entre los resultados de la cinética de fermentación.

### **5.3. Resultados**

En la selección de levadura no-*Saccharomyces* con potencial cervecero, se ha incluido una variedad de pruebas que cubren la evaluación de los requisitos esenciales de éstas para la fermentación y elaboración de cerveza (Figura 34).

#### **5.3.1. Capacidad de fermentación de maltosa**

Aproximadamente el 20 % de las 149 cepas de levadura en estudio tuvieron la capacidad de fermentar maltosa entre el tercer y quinto día de incubación, las cuales (n=28) están mencionadas en la Figura 36. Las levaduras que no tienen la capacidad de fermentar maltosa se descartaron para este estudio.

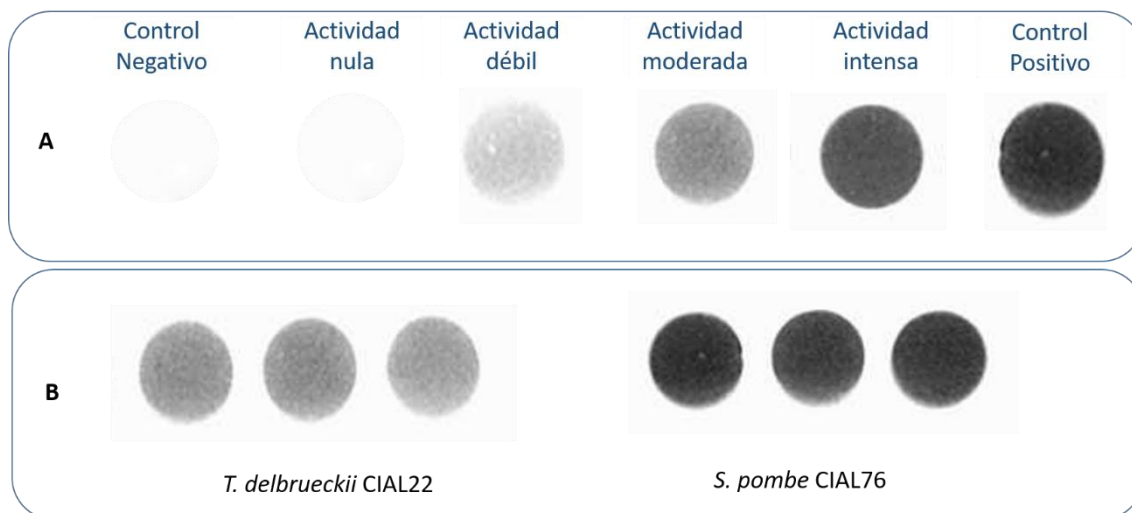
#### **5.3.2. Primera caracterización de levaduras**

El mapa de calor (Figura 36) resume los resultados de la primera caracterización de levaduras no-*Saccharomyces* que fermentan maltosa.

Código	Levadura	Fermentación maltosa	H <sub>2</sub> S producido	Producción de POF				Olor y sabor: fermentaciones a escala de laboratorio				2da. selección	
				Medio fértilico	4VG y derivados	4VP y derivados	4VS y derivados	Olor	Description del olor	Sabor	Descripción del sabor		
NSO4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>								Sulfuroso, whisky			No	Fermentación de maltosa Sin producción de H <sub>2</sub> S
NOO32	<i>Lachancea thermotolerans</i>								Frutal, a vino		Sour	Yes	
CIAL85	<i>Pichia fluxuum</i>								Disolvente			No	POF negativo
CIAL81	<i>Pichia membranaefaciens</i>								Sulfuroso			No	Aroma agradable
CIAL75	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>					Establo	Porexpan		Establo, sulfuroso			No	Sabor agradable
CIAL76	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>								Sulfuroso			No	
CIAL78	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>								Sulfuroso			No	
CIAL79	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>				Clavo				Frutal, especiado		Ácido	No	
CIAL22	<i>Torulaspora delbrueckii</i>								Sulfuroso, frutal			No	
CIAL24	<i>Torulaspora delbrueckii</i>								Frutal		Astringente	No	
CIAL29	<i>Torulaspora delbrueckii</i>								Frutal		Frutal	Yes	
CIAL34	<i>Torulaspora delbrueckii</i>								Frutal		Frutal	Yes	
CIAL35	<i>Torulaspora delbrueckii</i>								Frutal		Amargo	No	
CIAL36	<i>Torulaspora delbrueckii</i>								Sulfuroso, frutal			No	
CIAL37	<i>Lachancea thermotolerans</i>								Frutal		Frutal, sour	Yes	
CIAL42	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>								Disolvente			No	H <sub>2</sub> S producción débil
CIAL43	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>								Disolvente			No	
CIAL44	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>								Disolvente			No	
CIAL45	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo				Disolvente			No	
CIAL46	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>								Disolvente			No	
CIAL47	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>								Disolvente			No	
CIAL49	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo	Fenol			Medicinal			No	H <sub>2</sub> S producción moderada
CIAL50	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo	Fenol			Medicinal			No	
NSG34	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo	Picante			Disolvente			No	
NSO14	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo	Picante			Disolvente			No	POF positivo
NSO11	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo	Picante			Disolvente			No	Sabor desagradable
PDC167	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				Clavo				Disolvente			No	Olor desagradable
CIAL103	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>				Clavo	Picante	Porexpan		Sulfuroso, especiado, frutal			No	H <sub>2</sub> S producción intensa

Figura 36. Mapa de calor de las cepas de levadura no-*Saccharomyces* con capacidad de fermentar maltosa y resultados de su primera caracterización.

Respecto a la producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), la Figura 37 muestra la escala de la actividad sulfito reductasa utilizada (A) y los resultados para las cepas *T. delbrueckii* CIAL22 con actividad moderada y *Schizosaccharomyces pombe* CIAL76 con actividad intensa (B), a modo de ejemplo.



**Figura 37.** Actividad sulfito reductasa. (A), escala; (B), resultados de la actividad moderada e intensa de dos cepas analizadas.

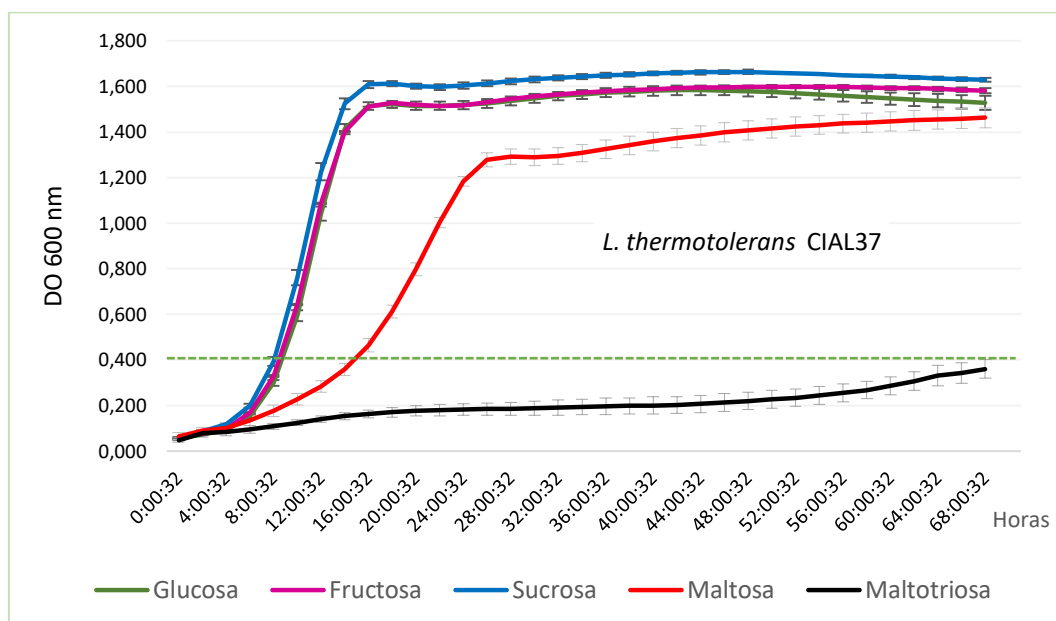
Tras descartar las levaduras POF+ que producían compuestos con olores desagradables como fenólico, establo, especiado/picante medicinal y espuma de poliestireno, con las levaduras que producían olores agradables se procedió a la cata del olor y sabor por el panel de cata para finalmente, seleccionar cuatro cepas de levadura: *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34) y *L. thermotolerans* (CIAL37 y NOO32) que destacaron por su producción de compuestos con aroma y sabores más agradables, por lo que se continuó una segunda caracterización con estas levaduras seleccionadas.

### 5.3.3. Segunda caracterización de levaduras

#### 5.3.3.1. Asimilación y fermentación de azúcares

Se analizó la asimilación de los azúcares fermentables más abundantes del mosto cervecero determinando el crecimiento ( $DO_{600nm}$ ) de las levaduras en presencia de cada azúcar. A modo de ejemplo, la Figura 38 muestra las curvas de crecimiento de *L. thermotolerans* CIAL37 en soluciones de glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, las cuales claramente superaron el umbral de crecimiento, que fue establecido en la extinción de  $DO_{600nm} = 0,4$  de acuerdo con (Methner et al., 2019). Las cuatro cepas seleccionadas (*T. delbrueckii* CIAL29 y CIAL34, y *L. thermotolerans* CIAL37 y NOO32) fueron capaces de fermentar glucosa, fructosa, sacarosa y

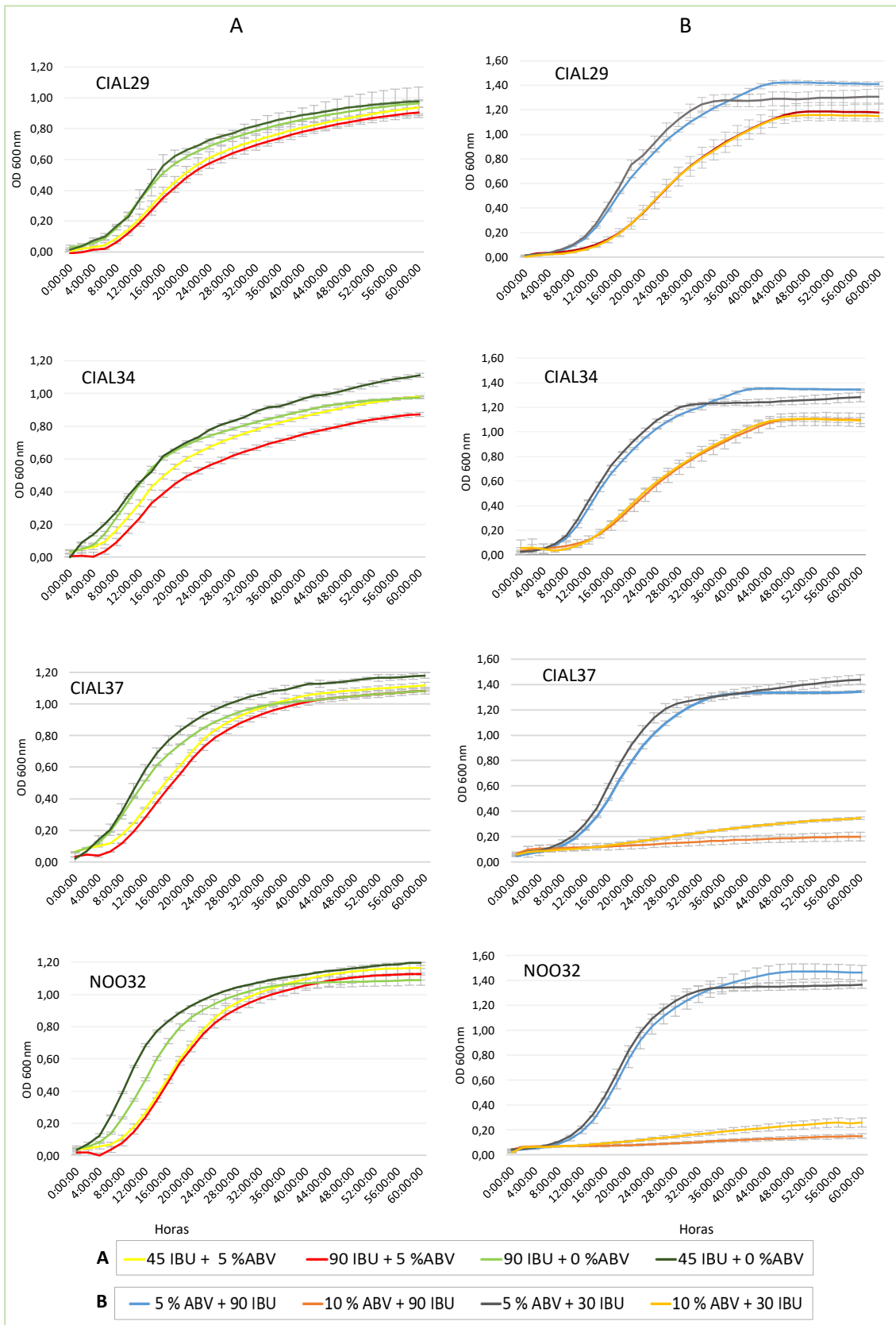
maltosa, pero ninguna pudo fermentar maltotriosa ni lactosa. Las cuatro cepas mencionadas exhibieron el mismo comportamiento de la Figura 38.



**Figura 38.** Asimilación de azúcares por *L. thermotolerans* CIAL37. Las líneas representan la  $DO_{600nm}$  promedio y las barras de error las desviaciones estándar ( $n=3$ ). El umbral de crecimiento ( $\text{---}$ ) corresponde a una extinción de  $DO_{600nm} = 0,4$ .

### 5.3.3.2. Crecimiento en presencia de lúpulo y etanol

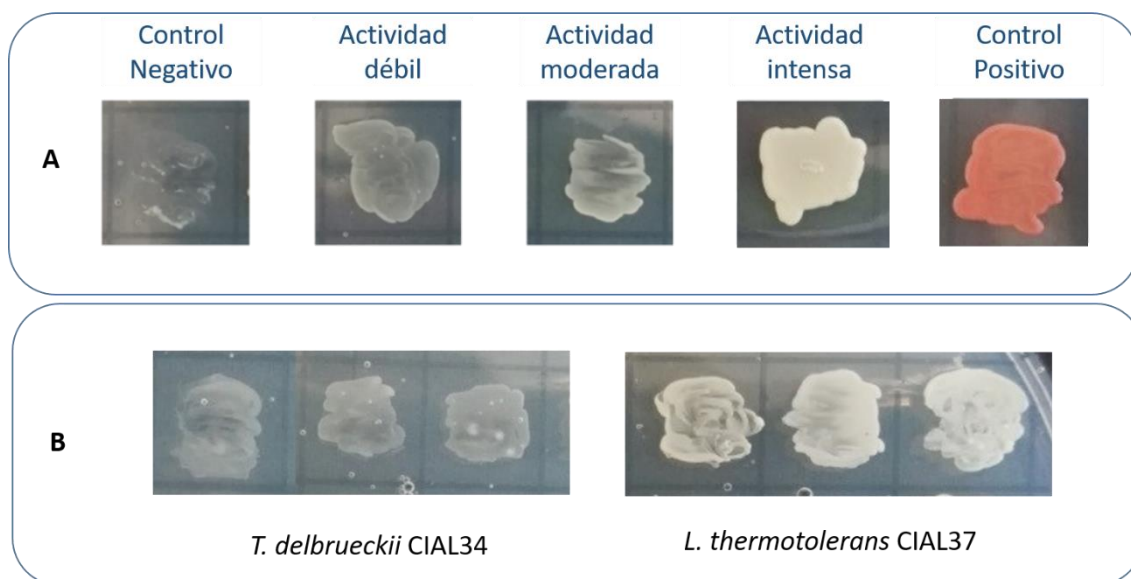
Los gráficos de la columna A (Figura 39) muestran las curvas de crecimiento de las levaduras en mosto suplementado con diferentes concentraciones de iso- $\alpha$ -ácidos y etanol, simulando su crecimiento como inóculo de levadura en una fermentación primaria. De manera similar, las curvas de crecimiento de la levadura en cerveza verde con glucosa añadida, simulando su crecimiento en una fermentación secundaria (acondicionamiento en botella) se muestran en la columna B (Figura 39).



**Figura 39.** Crecimiento de levadura a diferentes valores de IBU y % ABV. (A), en mosto; (B), en cerveza verde. Las líneas representan la  $DO_{600nm}$  promedio y las barras de error las desviaciones estándar ( $n = 3$ ).

### 5.3.3.3. Actividad $\beta$ -glucosidasa

La Figura 40 muestra la escala de la actividad  $\beta$ -glucosidasa utilizada (A) y a modo de ejemplo los resultados obtenidos con las cepas *T. delbrueckii* CIAL34 y *L. thermotolerans* CIAL37 (B). Las dos cepas de *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34) mostraron una actividad  $\beta$ -glucosidasa débil, mientras que ambas cepas de *L. thermotolerans* (CIAL37 y NOO32) mostraron una actividad moderada.



### 5.3.3.4. Floculación de las levaduras

Los porcentajes de floculación de las levaduras fueron muy elevados para las cepas *L. thermotolerans* CIAL37 y NOO32 (87 % y 90 %, respectivamente), mientras que para *T. delbrueckii* CIAL29 y CIAL 34 fueron más bajos (47 % y 49 %, respectivamente). La observación microscópica (1000 X) confirmó las agregaciones celulares (flóculos) que formaron ambas cepas de *L. thermotolerans*.

### 5.3.3.5. Cinéticas de fermentación

La Figura 41 muestra una imagen de los ensayos de fermentación a escala de laboratorio en estático; los burbujeadores de aire permitieron la salida de  $\text{CO}_2$  emitido, mientras que se retuvo toda la espuma generada durante la fermentación, especialmente la que se forman durante el *Krausen*.



**Figura 41.** Fermentación a escala de laboratorio en estático a 20 °C. Cada fermentador está provisto de un *airlock* para permitir la salida de CO<sub>2</sub> y retener la capa de espuma.

La Tabla 30 muestra la cinética de fermentación y los parámetros fisicoquímicos obtenidos con cada cepa después de 14 días de fermentación.

**Tabla 30.** Parámetros de la cinética de fermentación y valores fisicoquímicos a los 14 días de fermentación.

Levadura	Temperatura	pH final	Gravedad final (° P)	Total, g CO <sub>2</sub> emitido <sup>a</sup>	Tasa media de fermentación (g CO <sub>2</sub> día <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Atenuación aparente media
CIAL29	20 °C	4,15 ± 0,02	6,8 ± 0,0	19,90 ± 0,2	1,42	43 %
	25 °C	4,14 ± 0,03	6,7 ± 0,0	20,26 ± 0,2	1,45	44 %
CIAL34	20 °C	4,15 ± 0,03	6,9 ± 0,0	18,41 ± 0,1	1,32	42 %
	25 °C	4,21 ± 0,03	6,7 ± 0,0	20,67 ± 0,2	1,48	44 %
CIAL37	20 °C	3,73 ± 0,04	6,9 ± 0,0	18,69 ± 0,1	1,34	42 %
	25 °C	3,73 ± 0,01	6,9 ± 0,0	18,82 ± 0,1	1,34	42 %
NOO32	20 °C	3,56 ± 0,06	7,0 ± 0,1	17,61 ± 0,2	1,26	41 %
	25 °C	3,42 ± 0,08	6,9 ± 0,0	18,75 ± 0,3	1,34	42 %

<sup>a</sup> g CO<sub>2</sub> desprendido (en 600 mL de mosto)

<sup>b</sup> Valor medio de la tasa de fermentación (CO<sub>2</sub> g día<sup>-1</sup>)



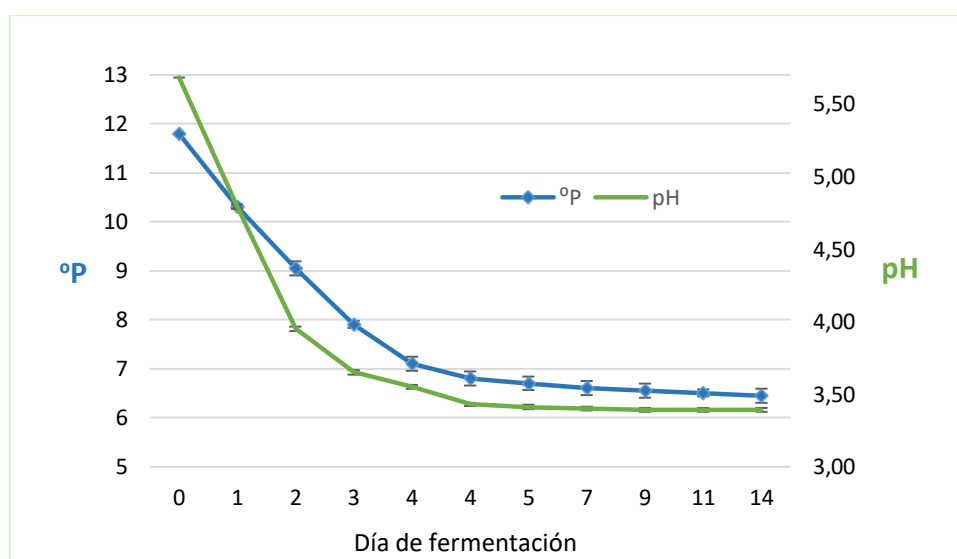
La formación de compuestos aromáticos puede modificarse mediante cambios de temperatura durante la fermentación (Lasanta et al., 2021; S. M. G. Saerens et al., 2008) Por ello, algunos jueces detectaron aroma apenas perceptible a plástico y fenol a 25 °C para ambas cepas de *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34), ningún juez detectó aromas desagradables en las dos temperaturas de fermentación para las cepas de *L. thermotolerans* (CIAL37 y NOO32).

En general, los resultados obtenidos de las cuatro cepas de levadura indicaron un uso potencial prometedor en la elaboración de cerveza. Para la elaboración a escala piloto de un lote pequeño de cerveza y asegurar un marco experimental manejable, solo se seleccionó *L. thermotolerans* CIAL37 para continuar el estudio.

#### 5.3.4. Elaboración a escala piloto de laboratorio de un lote de cerveza con la levadura *L. thermotolerans* CIAL37

##### 5.3.4.1. Propagación de la levadura y fermentación del mosto con *L. thermotolerans* CIAL37

Cada fase de propagación de la levadura duró entre 26 a 28 h, con una viabilidad al final de cada fase de 99,8 %. Para la fermentación del mosto en la elaboración de cerveza, la tasa de inoculación fue de  $15 \times 10^6$  células viables  $\text{mL}^{-1}$ , con una viabilidad de 99,8 %. La Figura 42 muestra el rápido descenso del pH en los dos primeros días, de pH 6,0 a < 4,0 y la bajada lenta del extracto durante la fermentación primaria con la cepa seleccionada.



**Figura 42.** Evolución del pH y extracto durante la fermentación primaria con por *L. thermotolerans* CIAL37. Las líneas representan el valor promedio y las barras de error las desviaciones estándar ( $n=2$ ).

### 5.3.4.2. Análisis de mosto y cerveza

En los análisis microbiológicos (enterobacterias, BAL y bacterias acéticas) no se detectaron contaminantes microbianos en el mosto ni en la cerveza. Las concentraciones de los ácidos orgánicos y glicerol en la cerveza terminada se muestran en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Concentración de ácidos orgánicos y glicerol en la cerveza terminada.

Compuesto	Concentración g L <sup>-1</sup>	Umbral de percepción g L <sup>-1</sup>	Referencia
Ácido láctico	2,37 ± 0,1	0,40 – 0,45	(Siebert, 1999)
Ácido acético	0,36 ± 0,1	0,13 – 0,20	(Spedding & Aiken, 2015)
Ácido cítrico	0,16 ± 0,0	0,29 – 0,35	(Siebert, 1999)
Ácido málico	0,14 ± 0,1	0,34 – 0,35	(Siebert, 1999)
Glicerol	2,75 ± 0,1	10	(Briggs et al., 2004)

La Tabla 32 muestra los resultados de los parámetros fisicoquímicos de la cerveza terminada, así como las concentraciones de FAN, los azúcares (glucosa + fructosa + sacarosa), y la acidez total. A los 14 días de fermentación la producción de alcohol solamente era un 2,6 ± 0,2 % ABV, el 40% de la cerveza terminada.

**Tabla 32.** Resultados de análisis fisicoquímicos y concentración de FAN, azúcares y acidez total de la cerveza terminada.

Análisis	Resultados
% ABV	4,5 ± 0,2
pH	3,37 ± 0,01
Extracto	6,3 ± 0,1
IBU	19 ± 0,5
Acidez total (como % de ácido láctico)	0,49 ± 0,03
Azúcares (glucosa + fructosa + sacarosa)	0,1 ± 0,0 g L <sup>-1</sup>
FAN	20 ± 0,2 mg L <sup>-1</sup>

(FAN), amino nitrógeno libre

### 5.3.4.3. Compuestos volátiles de la cerveza elaborada con *L. thermotolerans* CIAL37

La Tabla 33 muestra la concentración de los principales compuestos volátiles, como alcoholes, acetaldehídos, ésteres y cetonas, analizados en la cerveza terminada, sus respectivos Valores de Actividad de Aroma (VAO) y sus descriptores de olor.

**Tabla 33.** Concentración y VAO de los principales compuestos volátiles en la cerveza producida por *L. thermotolerans* CIAL37 y sus atributos sensoriales.

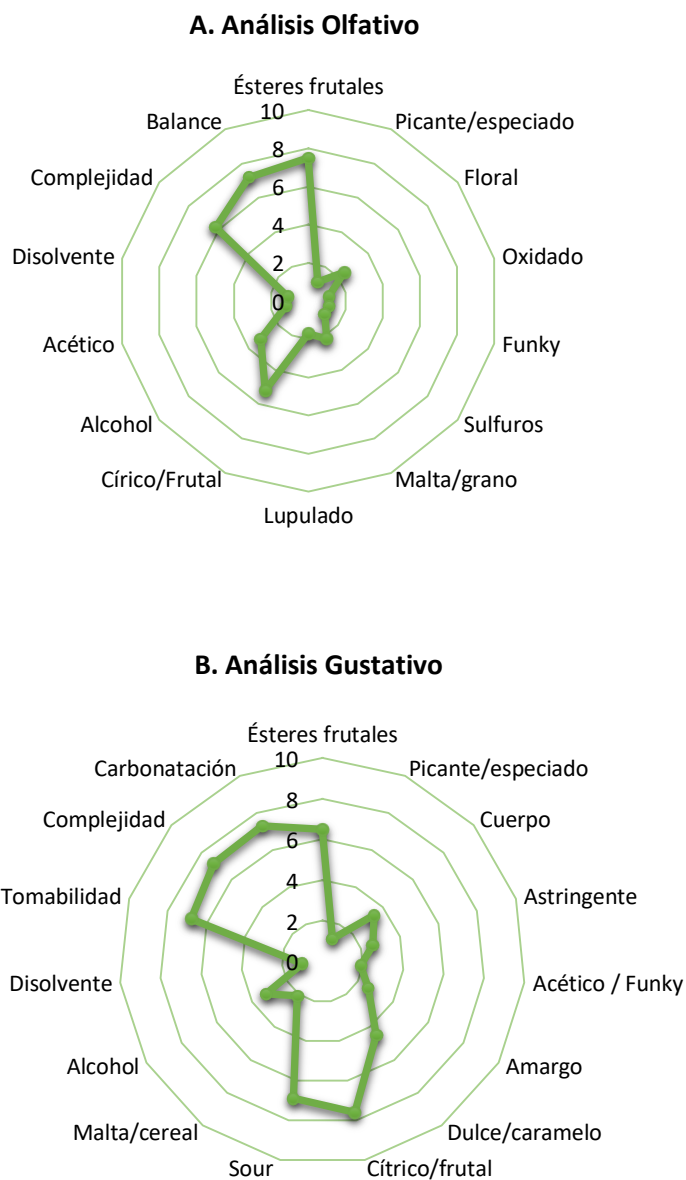
Compuesto (Sinónimo)	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )			VAO			Descripción del olor
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	
<b>Alcoholes</b>							
1-Propanol	523,9	537,0	511,8	2	2	2	Golosina, fruta madura
1-Propanol, 2-metil (Alcohol isobutílico)	1097,3	1166,6	1176,2	32	34	35	Manzana, cocoa, fusel, malta
1-Butanol	166,2	161,0	152,8	1	1	1	Alcohol, fruta, medicina, fenol
1-Butanol, 3-metil (Alcohol isoamílico)	1796,5	2080,6	1873,8	288	334	301	Plátano, cocoa, floral, frutal, fusel
1-Butanol, 2-metil-	991,2	999,5	983,1	7	7	7	Plátano, malta, aceite de fusel
1-Pentanol, 4-metil (Isohexanol)	6,7	8,0	7,4	<1	<1	<1	Longan, nuez
Feniletil alcohol	0,5	0,5	0,6	1	1	2	Flores, rosas, dulce
<b>Aldehídos</b>							
Propanal, 2-metil-	6,0	4,8	6,7	6	4	7	Caramel, cocoa, flores
Metacroleína	25,2	25,6	17,6	1	1	1	Flores
Butanal, 3-metil (Isovaleraldehído)	114,2	103,0	138,1	189	171	229	Almendra, chocolate, cocoa
Heptanal	0,3	0,4	0,4	<1	<1	<1	Fruta cítrica, nuez, grasa
<b>Ésteres</b>							
Ácido acético, etenil éster	4,6	3,9	3,2	<1	<1	<1	Ligeramente dulce
Acetato de etilo	1119,7	1166,3	1209,5	<1	<1	<1	Fruta, pera
Ácido propanoico, etil éster (Etil propionato)	332,5	329,9	332,4	11	11	11	Piña, ron, fresa
n-Propil acetato (Propil acetato)	17,7	18,2	20,7	<1	<1	<1	Fruta, pera
Ácido propanoico, 2-metil-, etil éster (Isobutanoato de etilo)	42,1	41,8	40,6	396	393	382	Manzana, flores, fresa, fruta tropical
Acetato de isobutilo	99,7	73,1	75,6	3	2	2	Manzana, plátano, floral, hierba, pera
Ácido butanoico, etil éster (Etil butanoato)	31,3	32,6	30,6	162	169	158	Manzana, plátano, fruta verde, piña
Ácido butanoico, 2-metil-, etil éster	0,6	0,6	0,5	10	10	8	Manzana, goma de mascar, kiwi, fresa
1-Butanol, 3-metil-, acetato (Acetato de isoamilo)	219,2	211,5	222,2	4	4	4	Plátano, pera, dulce
1-Butanol, 2-metil-, acetato (Amilacetato activo)	76,1	60,8	66,2	<1	<1	<1	Cáscara de manzana, plátano
1-Butanol, 3-metil-, propanoato (Isoamilpropionato)	0,7	0,5	0,6	<1	<1	<1	Albaricoque, piña, fruta
Ácido hexanoico, etil éster (Etilhexanoato)	47,6	51,2	48,2	16	17	16	Cáscara de manzana, plátano, brandy, fruta madura
Ácido propanoico, 2-oxo-, etil éster (Etilpiruvato)	1,6	1,2	1,5	<1	<1	<1	Fruta, ligeramente dulce, ron, caramelo
Ácido propanoico, 2-hidroxi-, éster	74,6	90,3	72,3	<1	<1	<1	Fruta, coco
<b>Cetonas</b>							
Acetona	15,2	14,7	11,5	<1	<1	<1	Disolvente
2,3-Butanediona (Diacetilo)	0,01*	0,01*	0,01*	-	-	-	Mantequilla
2-Pentanona	57,0	50,8	52,6	<1	<1	<1	Fruta, acetona
2-Heptanona	0,5	0,6	0,8	<1	<1	<1	Plátano, fruta

Los números en negrita superan el valor del umbral de percepción; \* La concentración es  $< 0.01 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . La escala del Valor de Actividad de Aroma (VAO) empleada es: **1 a 15**, muy débil, apenas reconocible; **15 a 500**, distintivo, fácilmente reconocible pero no fuerte; **500-5000**, olor moderado a fuerte.

Entre los compuestos volátiles con mayor concentración destacan: alcohol isobutílico e isomamílico, isovarelaldehído, etilisobutanoato, etilbutanoato y etilhexanoato, todos ellos sobrepasan el umbral de percepción.

#### **5.3.4.4. Análisis sensorial de la cerveza elaborada con *L. thermotolerans* CIAL37**

En los análisis olfativos se observó que predominan los aromas frutales y cítricos, así como un buen balance y complejidad, mientras que en boca sobresalen los sabores cítricos y frutales con carácter sour, así como una buena *drinkability* (tomabilidad), carbonatación y complejidad.



**Figura 43.** Análisis sensorial de la cerveza elaborada con *L. thermotolerans* CIAL37. (A), análisis olfativo; (B), análisis gustativo.



## *Capítulo IV*





## 6. CAPÍTULO IV. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL E IMPACTO DE LA CERVEZA EN LA COMPOSICIÓN Y METABOLISMO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

### 6.1. Planteamiento

El consumo de bebidas fermentadas alcohólicas, y sus efectos sobre la salud, es en la actualidad un tema controvertido, sin que existan recomendaciones claras y bien definidas. Las organizaciones de salud afirman que los posibles beneficios del consumo de cerveza no superan los riesgos, y ponen el énfasis en evitar el consumo de alcohol (González-Zancada et al., 2020). Hasta el momento las evidencias disponibles indican que el consumo crónico de alcohol puede conducir a disbiosis en el intestino humano (Engen et al., 2015). Sin embargo, la cerveza consumida con moderación debe ser examinada como una ingesta compleja, ya que la cantidad de etanol estaría en un rango bajo, incluso menor que el del vino, y la evaluación de sus potenciales efectos en el organismo podría reflejar los efectos beneficiosos de sus compuestos bioactivos, muchos de los cuales provienen de las materias primas o se producen durante el proceso de elaboración. Entre estos compuestos se encuentran polifenoles, melanoidinas,  $\beta$ -glucanos, arabinosilanos y vitaminas, entre otros, los cuales han demostrado ciertos efectos beneficiosos cuando se les ha analizado individualmente.

En cuanto al posible efecto de la cerveza en la función intestinal humana, la asociación entre consumo moderado de cerveza, composición y funcionalidad de la microbiota intestinal se ha evaluado de forma prospectiva y mayoritariamente en relación con el perfil de consumo de alcohol. Hasta ahora, sólo se ha publicado un estudio de intervención en humanos (Hernández-Quiroz et al., 2020), que ha mostrado que el consumo regular de cerveza no alcohólica durante 30 días incrementa la diversidad de la microbiota intestinal, mientras que la cerveza alcohólica no parece mostrar este efecto, aunque ambas favorecieron la proliferación de miembros del filo Bacteroidetes en relación con el filo Firmicutes. Estos autores observaron cambios significativos en la abundancia relativa de varios taxones con ambos tipos de cerveza, que en el caso de la cerveza sin alcohol los autores proponen como una tendencia a mayor abundancia de bacterias beneficiosas.

Aunque los estudios de intervención en humanos a gran escala constituyen la aproximación más decisiva para correlacionar la dieta con la salud de diferentes grupos poblacionales, el empleo de modelos de simulación gastrointestinal relevantes fisiológicamente también puede proporcionar información muy útil sobre el efecto de los

alimentos y sus componentes bioactivos en la función intestinal, que no siempre es posible conseguir en los estudios en humanos (Tamargo García et al., 2017). En este contexto, en este capítulo de la Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto de la ingesta de cerveza en la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal. Para ello, mediante la utilización del simulador gastrointestinal dinámico simgi®, se ha optimizado un protocolo de simulación que permitió estudiar por primera vez las diferentes etapas del proceso de digestión y fermentación colónica de la cerveza, representativas de las transformaciones *in vivo*.

## 6.2. Materiales y Métodos

Para la digestión *in vitro* de las cervezas, se empleó el SIMulador dinámico del tracto GastroIntestinal simgi® ([www.cial.uam-csic.es/simgi/](http://www.cial.uam-csic.es/simgi/)), que es un modelo dinámico que simula la digestión gastrointestinal y la fermentación colónica que sufren los alimentos en el tracto gastrointestinal humano. El simgi® es una infraestructura singular situada en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (Figura 44) y que ha sido desarrollado por investigadores de este centro. Este complejo sistema incluye 5 compartimentos secuenciales que simulan las diferentes regiones del tracto digestivo: estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon trasverso y colon descendente. Estos compartimentos están interconectados por medio de tubos y bombas que permiten la transferencia de contenido entre ellos (Barroso et al., 2015; Cueva et al., 2015).



**Figura 44.** SIMulador dinámico del tracto GastroIntestinal simgi®

### **6.2.1. Muestras de cervezas**

Se utilizaron 3 cervezas comerciales con distinta composición: (i) Cerveza Märzen Doble malta (25 IBU, 7.2 % ABV), (ii) cerveza artesanal Brown Ale (21 IBU, 4.7 % ABV), (iii) cerveza artesanal Indian Pale Ale (IPA) (74 IBU, 5.1 % ABV). El contenido de alcohol y las IBU fueron analizados usando los métodos Beer-4F y Beer-23A (ASBC,2009), respectivamente. Para las tres cervezas, el sistema se alimentó una única vez (ingesta aguda) con un volumen de 80 mL como alimento introducido en el simgi®.

### **6.2.2. Fluidos gastrointestinales simulados**

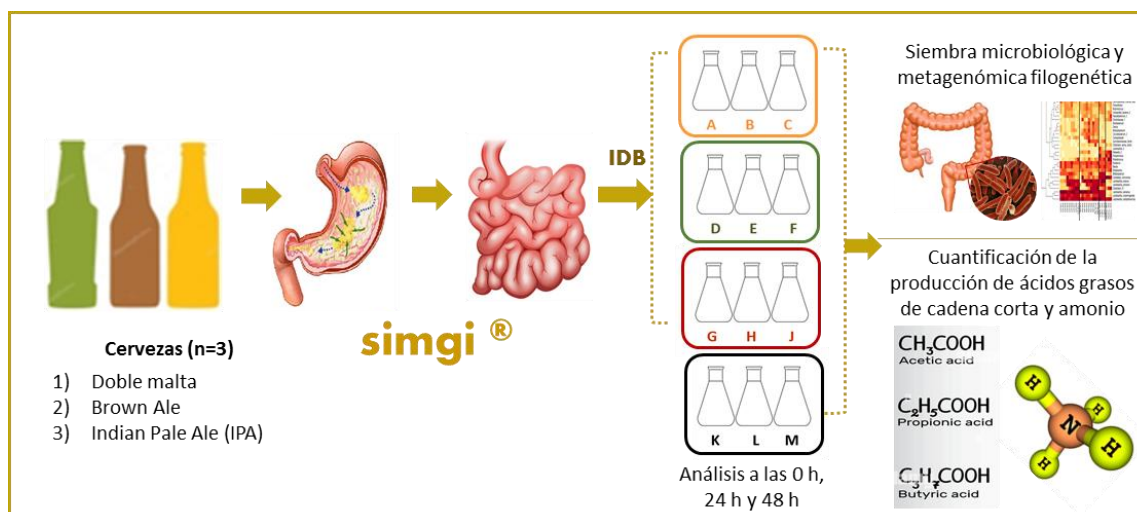
El jugo gástrico simulado (SFG) y el fluido intestinal simulado (SIF) se prepararon según el protocolo de (Minekus et al., 2014), y se filtraron a través de una membrana de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de su uso. El jugo gástrico contenía pepsina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a una concentración de 2000 U mL de jugo gástrico<sup>-1</sup> disuelta en el fluido gástrico simulado, preparado el día de la realización de la digestión y se conservó en frío hasta el momento de su uso. Se añadió a la digestión 15 mL de este jugo.

El jugo pancreático contenía extracto de pancreatina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a una concentración de 4,24 gL<sup>-1</sup> y bilis fresca deshidratada Ovgall (Difco™, EE. UU.) 6 g L<sup>-1</sup> disueltos en el fluido intestinal simulado (SIF). La solución se esterilizó empleando una membrana de polietersulfona PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de su uso.

### **6.2.3. Diseño experimental y funcionamiento del simgi®**

La simulación dinámica de la digestión gastrointestinal se realizó por separado para cada cerveza, siguiendo el mismo protocolo de funcionamiento. Partiendo de metodologías previas del grupo de investigación para digestiones de otras bebidas fermentadas, como vino tinto (Cueva et al., 2015; Tamargo et al., 2022). Se ha optimizado un protocolo de trabajo en el simgi® en el que se utilizaron los compartimentos del estómago e intestino delgado para llevar a cabo la digestión gastrointestinal, mientras que las fermentaciones colónicas se llevaron a cabo en estático (tipo *batch*).

La Figura 45 esquematiza el diseño experimental de las simulaciones.



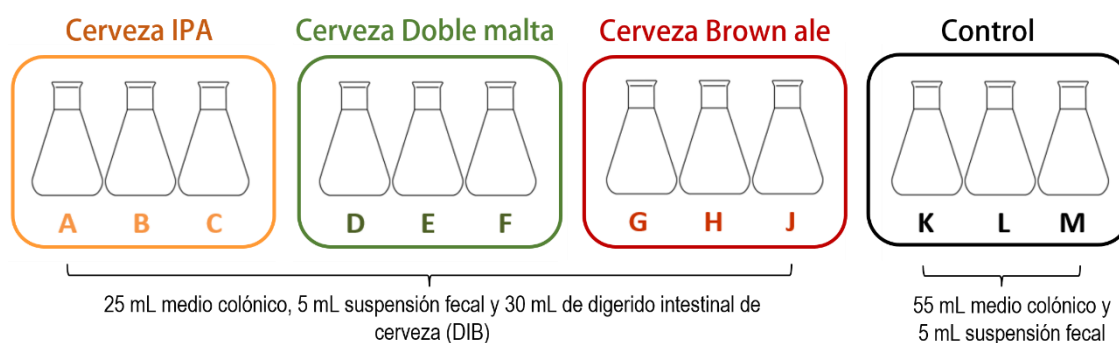
**Figura 45.** Esquema experimental de los ensayos realizados en el simgi® con las tres cervezas comerciales.

En primer lugar, el compartimento del estómago se llenó con 65 mL de SGF y el del intestino delgado con 55 mL de SIF. A continuación, el sistema al completo se acondicionó a 37 °C. Las digestiones se simularon alimentando el sistema con 80 mL de la cerveza en estudio. En la fase gástrica, la peristalsis se fijó en  $10 \text{ s}^{-1}$ , la curva de pH disminuyó desde el pH inicial de cada una de las cervezas hasta 1,8 añadiendo HCl 0,5 M, y se adicionó 15 mL de jugo gástrico a un flujo de  $3,9 \text{ mL min}^{-1}$ . Durante la digestión, el flujo de vaciado gástrico hacia el intestino se programó siguiendo la función de Elashoff (Elashoff et al., 1982) para simular condiciones fisiológicas. En el compartimento del intestino delgado, el volumen total transferido del estómago fue 95 mL, que se mezcló con el SIF previamente añadido y con 40 mL de jugo pancreático, que fue añadido en un flujo de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . La digestión intestinal se llevó a cabo durante 120 minutos a una temperatura de 37 °C, pH 7 y 150 rpm. Al final de esta fase, se obtuvo el digerido intestinal de la cerveza (IDB por sus iniciales en inglés), resultando en una dilución 1:4 (v/v). El IDB se alicuoteó y se conservó a - 80 °C hasta su utilización.

#### 6.2.4. Fermentación colónica

Para la fermentación colónica, los distintos IDB (procedentes del intestino delgado) fueron sometidos a fermentación en estático con la microbiota fecal obtenida de un donante sano que declaró no haber consumido antibióticos durante los 6 meses previos al estudio, ni padecer enfermedades, ni trastornos digestivos. Inmediatamente después a la recogida de la muestra fecal, se preparó una suspensión homogenizando 1 g de heces en 10 mL de PBS (0,1 M, pH 7) como se ha descrito previamente (Tamargo et al., 2018).

Las fermentaciones se realizaron por separado con los digeridos de cada cerveza por triplicado en matraces Erlenmeyer estériles a los que se añadieron 25 mL de medio colónico (CDM), preparado según lo descrito (Gil-Sánchez et al., 2017), 5 mL de la suspensión fecal fresca y 30 mL de IDB. Las fermentaciones colónicas se realizaron simulando las condiciones de la porción distal del intestino grueso: pH 6,8, 37 °C, en anaerobiosis y con agitación orbital a 120 rpm durante 48 horas. Paralelamente, se llevaron a cabo fermentaciones control, por triplicado, en las que los IDB fueron reemplazados por medio CDM (Figura 46). En ambos casos se tomaron muestras a 0, 24 y 48 horas. Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y tanto los sobrenadantes como los pellets se conservaron a -80 °C hasta su análisis.



**Figura 46.** Esquema de fermentaciones colónicas. (A-J), digeridos de cervezas; (K-L), control.

En las muestras recogidas a todos los tiempos mencionados, se determinó la composición de la microbiota fecal (recuentos microbianos en medios generales y selectivos como primera aproximación, seguido del análisis metagenómico filogenético) y su funcionalidad (análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y de la concentración de amonio).

## 6.2.5. Análisis de la comunidades microbianas

### 6.2.5.1. Recuentos bacterianos en medios de cultivo

Para el recuento de las distintas poblaciones microbianas, se realizaron diluciones seriadas (1:10, v/v) en solución salina (0,9 % NaCl) de las muestras de los digeridos intestinales de las cervezas y el control. Estas diluciones se sembraron en spot (10 µL) y por triplicado en ocho medios de cultivos: *Tryptic Soy Agar* o TSA (Difco™ BD, EE. UU.) para aerobios totales; agar Wilkins-Chalgren (Difco™ BD, EE. UU.) para anaerobios totales; agar MacConkey (Difco™ BD, EE. UU.) para enterobacterias; agar de enterococos (Difco™ BD, EE. UU.) para *Enterococcus*

spp.; *Tryptose Sulfite Cycloserine* (TSC) para *Clostridium* spp.; agar MRS a pH 5.4 (Conda-Pronadisa, España) para bacterias lácticas y LAMVAB para especies específicas de *Lactobacillus* fecales preparado según (Hartemink et al., 1997), *Mannitol Salt agar* (Difco™ BD, EE. UU.) para *Staphylococcus* spp. Los microorganismos aerobios se incubaron en una cámara Nüve Incubator EN 120 (NÜVE, Turquía), mientras que los anaerobios en la cámara de anaerobiosis BACTRON Anaerobic/Environmental Chamber, SHELLAB. Las placas de TSA, Wilkins-Chalgren y MacConkey se incubaron durante 24 h y las del resto de medios se incubaron durante 72 h, todos a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se contaron las colonias que crecieron y los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 6.2.5.2. Extracción de ADN y secuenciación del ADN ribosómico 16S

Se utilizaron 2 mL de muestra de cada matraz de fermentación colónica para la extracción de ADN, utilizando el kit QIAmp® *Fast DNA Stool MiniKit* (Qiagen Inc. Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. La concentración de ADN obtenida en cada muestra se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Posteriormente se procedió a la amplificación de la región V3-V4 del gen de ARN ribosómico 16S empleando los *primers*: forward 5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3' y reverse 5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3'. Se siguió el protocolo de PCR en dos pasos de Illumina® para la preparación de las librerías, y se llevó a cabo la secuenciación en un instrumento Illumina® MiSeq (Illumina®, San Diego, EE. UU.) realizando lecturas de 2 x 500 pb de extremos emparejados o "paired-end". Se utilizó el software RStudio v.1.3.1093 para procesar los archivos con lecturas crudas obtenidas del instrumento Illumina®. Los archivos fastq se filtraron para eliminar lecturas de baja calidad y ADN extraño mediante el algoritmo DADA2 (Callahan, McMurdie, et al., 2016). DADA2 también se utilizó para de-replicar, unir los extremos pareados o *paired-end* y filtrar las quimeras en los datos brutos (Callahan, McMurdie, et al., 2016; Callahan, Sankaran, et al., 2016). Este algoritmo permite diferenciar las lecturas por un único nucleótido, lo que lleva a la formación de variantes de secuencia única o *Amplicon Sequence Variants* (ASV). La asignación taxonómica se realizó utilizando la base de datos Silva v.138 (Quast et al., 2013). La biodiversidad, expresada en términos de  $\alpha$ -diversidad, se estimó utilizando los ASVs mediante el cálculo de los índices Observados, Shannon y Simpson a través del paquete "Phyloseq". La  $\beta$ -diversidad se evaluó empleando una matriz de disimilitud de Bray-Curtis representada por un escalamiento multidimensional no métrico

(NMDS). Se calcularon las abundancias relativas de cada taxón para cada muestra, a nivel de filo, familia y género.

### **6.2.6. Evaluación del metabolismo microbiano**

#### **6.2.6.1. Análisis de ácidos grasos de cadena corta por GC-MS**

Las alícuotas de los sobrenadantes de las muestras procedentes de la fermentación colónica de las cervezas y el control se descongelaron y filtraron previo a los análisis utilizando un filtro de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . El análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se llevó a cabo siguiendo el método de SPME-GCMS previamente descrito (Cueva et al., 2015). En primer lugar, se mezclaron 290  $\mu\text{L}$  de la muestra (sobrenadante a analizar o stock para la calibración) con 10  $\mu\text{L}$  de la solución de estándar interno (1  $\text{g L}^{-1}$  de ácido 2-metilvalérico) y con 30  $\mu\text{L}$  de una solución 0.9 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 2) y de esta mezcla se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  a un vial de 20 mL cerrado herméticamente. Se prepararon 2 viales por muestra, cada uno de una alícuota diferente. El proceso de extracción se realizó con un sistema automático CombiPAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza) con una fibra DVB/CAR/PDMS SPME de 50/30  $\mu\text{m}$  y 2 cm de longitud (Supelco, Bellefonte, EE. UU.). La separación cromatográfica tuvo lugar en una columna DB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25) (J&W, Agilent). La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación con los tiempos de retención y los espectros de masas de los compuestos de referencia y la cuantificación se llevó a cabo por calibración interna. Las curvas de calibración se construyeron a partir de una recta de 7 puntos de cada ácido graso obtenidas por dilución seriada (1/2) del stock original (20  $\text{g L}^{-1}$ ).

#### **6.2.6.2. Producción de amonio**

Para determinar la concentración de amonio en las muestras de la fermentación colónica se empleó el método colorimétrico propuesto en el kit de análisis de amonio (*Photometric Spectroquant® ammonium reagent test*, Merck, Kenilworth, EE. UU.). Las muestras se diluyeron empleando agua destilada para adecuar su concentración al rango de medida del kit (2 a 75  $\text{mg L}^{-1}$ ) y los resultados se evaluaron a una longitud de onda de 690 nm, siguiendo el protocolo descrito por los fabricantes. Los análisis se realizaron por duplicado.

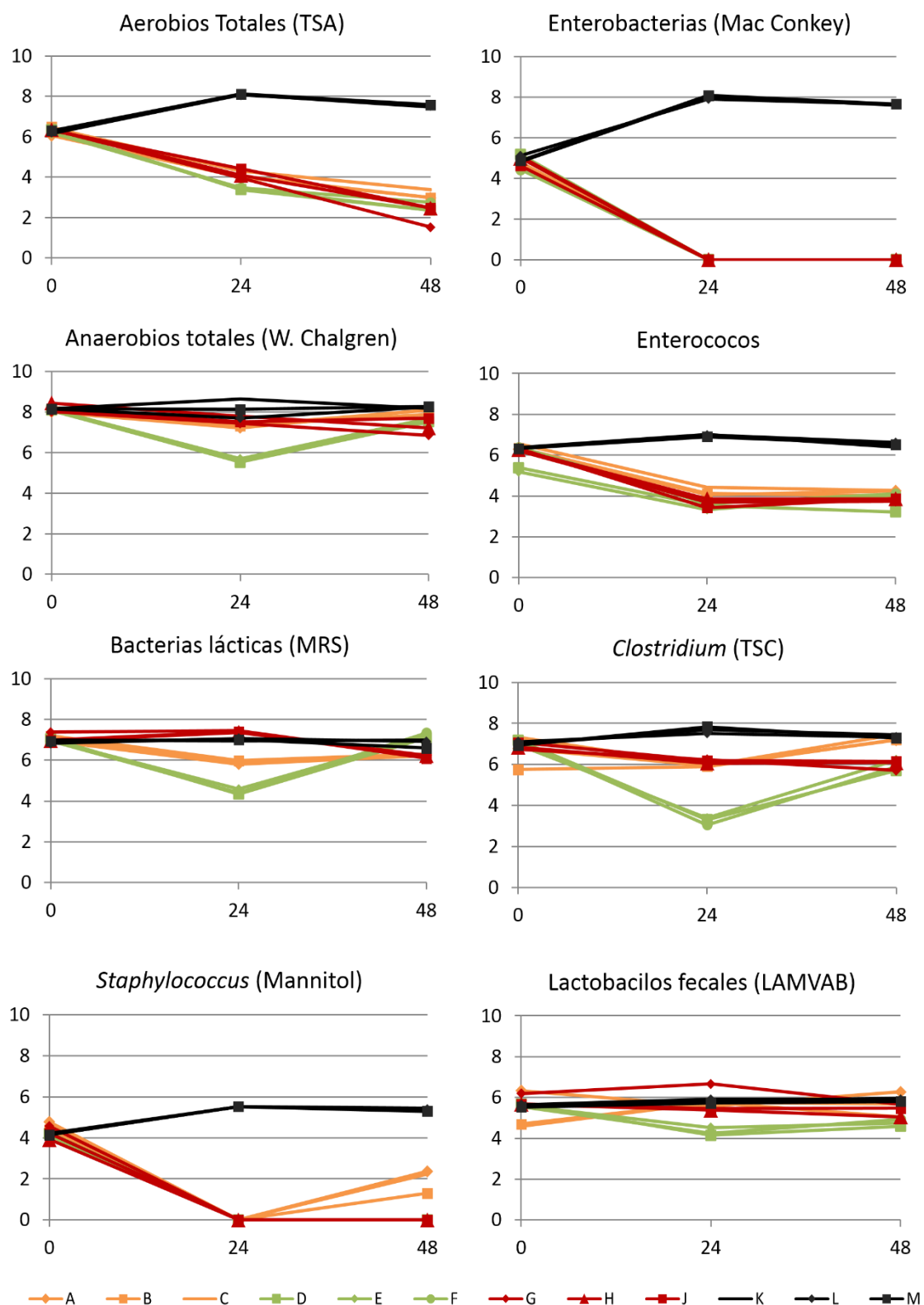
### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Evolución del microbioma intestinal tras la ingesta de cerveza

##### 6.3.1.1. Recuento de las poblaciones microbianas

Se realizó el recuento de las poblaciones microbianas viables y cultivables mediante el método de siembra microbiológica, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 47. En los microorganismos aerobios totales, enterobacterias, enterococos y estafilocos se observó una disminución progresiva a medida que avanzaba la fermentación colónica; mientras que en el caso de *Clostridium* se observó una disminución en presencia de los IDB Doble malta y Brown ale. Los anaerobios totales, bacterias lácticas y lactobacilos fecales mantuvieron constantes sus niveles a lo largo del estudio.

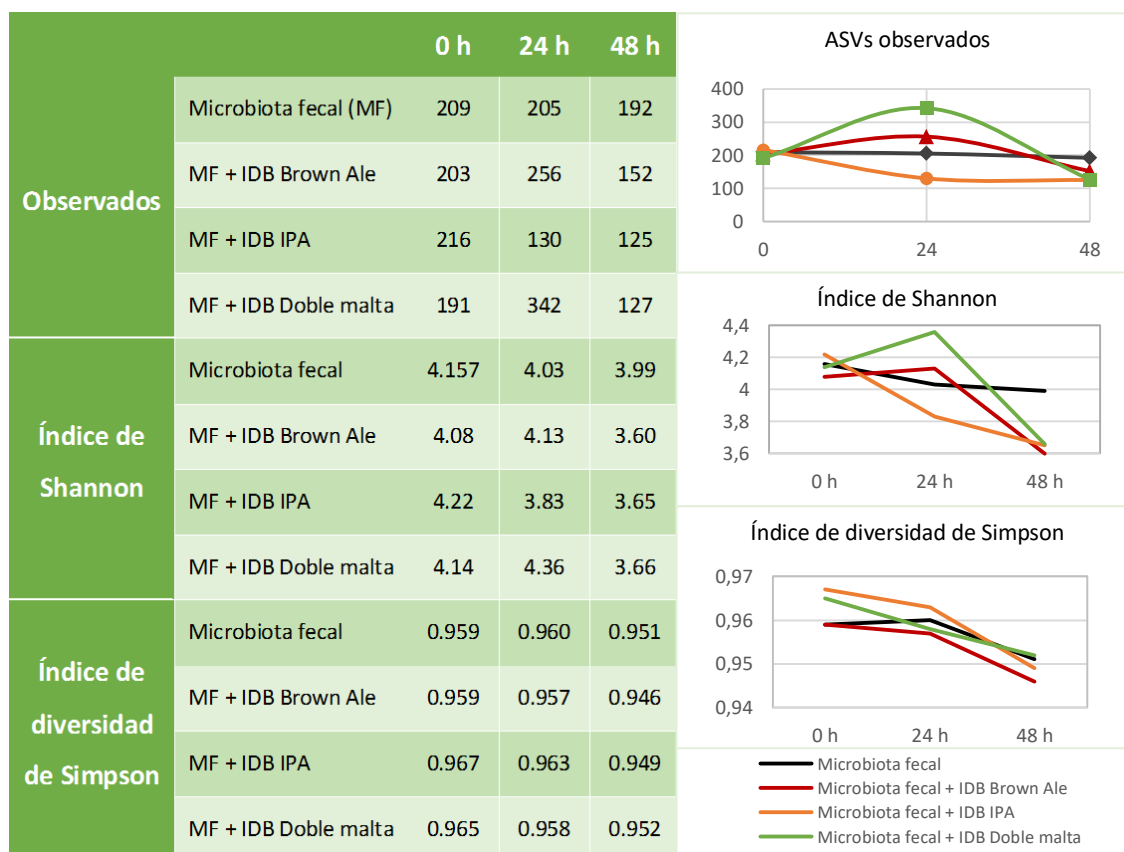




**Figura 47.** Evolución de los recuentos de las poblaciones microbianas en log UFC mL<sup>-1</sup> vs horas en las fermentaciones colónicas en presencia del digerido intestinal de las cervezas (IDB) o en ausencia (control). (A-C), IDB IPA; (D-F), IDB Doble malta; (G-I), IDB Brown ale; (K-L), controles.

### 6.3.1.2. Análisis de la diversidad

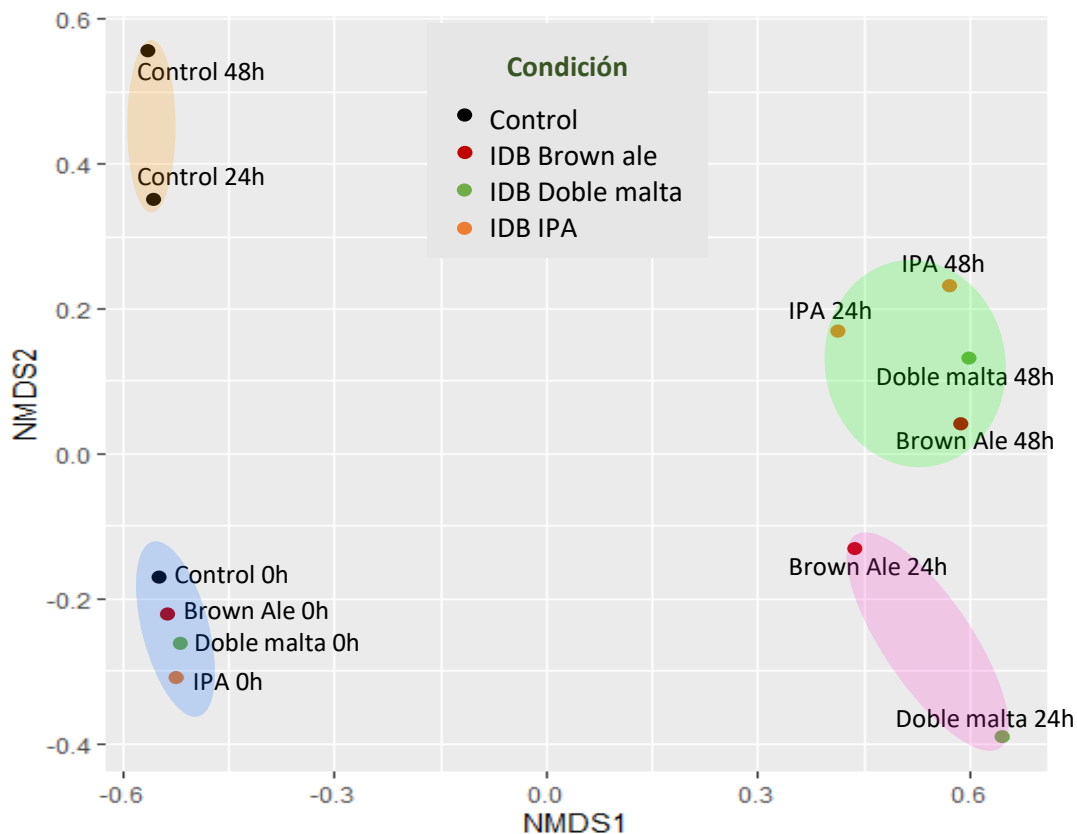
La evolución de la  $\alpha$ -diversidad durante las fermentaciones colónicas en ausencia o presencia del digerido intestinal de las tres cervezas estudiadas se muestran en la Figura 48.



**Figura 48.** Evolución de la  $\alpha$ -diversidad durante las fermentaciones colónicas en ausencia o presencia del digerido intestinal de las cervezas (IDB).

En el estudio de la evolución del microbioma intestinal se confirmó que la microbiota fecal utilizada en la simulación de la digestión colónica de las cervezas presentaba una buena diversidad bacteriana, evaluada en términos de riqueza (ASVs observadas), dominancia (Índice de Shannon) y equidad (Índice de diversidad de Simpson) (Figura 48, datos correspondientes al tiempo 0 horas). Como era de esperar, por tratarse de fermentaciones estáticas, el índice de diversidad de Simpson mostró que la diversidad evolucionó hacia a una ligera disminución a lo largo del tiempo para todas las muestras, incluido el control (Pérez-Burillo et al., 2021). El índice de Shannon mostró que la diversidad en presencia de los IDB Brown ale y Doble malta fue variable en el tiempo, mostrando un ligero aumento a las 24 h y disminuyendo a las 48 h, mientras que en presencia del IDB IPA la disminución fue progresiva desde las 0 h (Figura R1).

Respecto al análisis de la  $\beta$ -diversidad, el escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) demuestra que los patrones de las comunidades bacterianas en las muestras analizadas tras las fermentaciones colónicas son claramente diferentes (Figura 49).



**Figura 49.** Gráfico de dispersión bidimensional aplicado a las fermentaciones en ausencia (control) y presencia de los IDB (IPA, Brown ale y Doble malta), y a los tiempos de fermentación (0 h, 24 h y 48 h) representada por un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) empleando una matriz de disimilitud de Bray-Curtis.

Como era de esperar, las cuatro muestras en tiempo 0 h mostraron un agrupamiento entre sí (elipse azul). El control evolucionó de forma similar a las 24 y 48 h, mostrando un agrupamiento separado del resto de muestras. Por otro lado, las comunidades microbianas mostraron una evolución similar en presencia de los IDB Brown Ale y Doble malta a las 24 h (elipse rosa), observándose también esta similitud entre ambas a las 48 h (elipse verde) aunque con cambios en la estructura de la microbiota entre estos dos tiempos. En cuanto a la presencia del IDB IPA, la evolución entre las 24 h y 48 h fue similar, no detectándose cambios importantes en la estructura de las comunidades microbianas entre ambos tiempos, y mostrando similitud con las muestras en presencia de los IDB Brown Ale y Doble malta a las 48

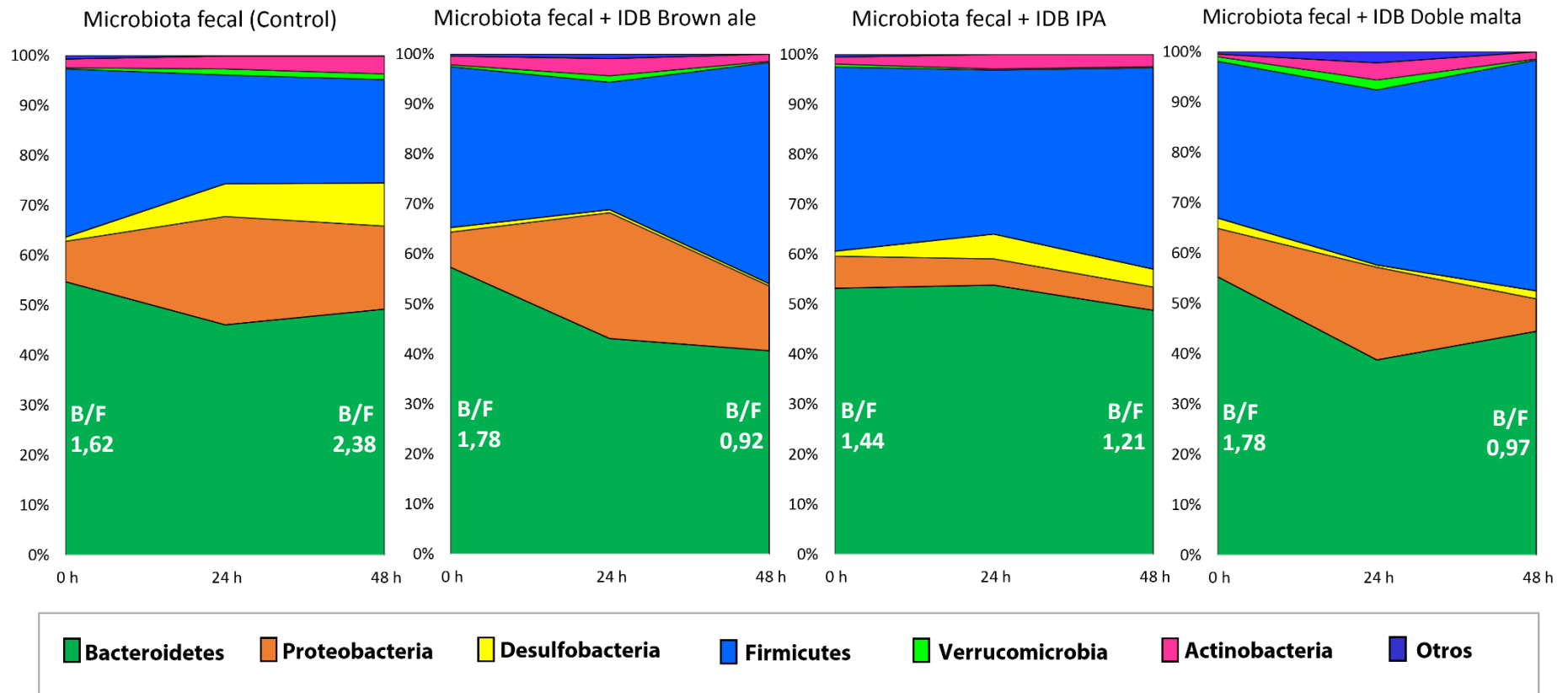
---

h (elipse verde). El círculo verde muestra la mayor similitud de la comunidad respecto a la presencia de los IDB incluidos.

### **6.3.1.3. Análisis a nivel de filo de los perfiles microbianos**

El análisis a nivel de filo de los perfiles microbianos se llevó a cabo analizando los cambios en las abundancias relativas para aquellos taxones con una abundancia superior al 0,5 % en al menos una de las condiciones analizadas (Figura 50). Los filos predominantes en las muestras fecales en la fase inicial de las fermentaciones fueron tres: Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria, en ese orden (Figura 50, tiempo 0 h). Durante todas las fermentaciones, Bacteroidetes experimentó una pequeña disminución en su abundancia relativa en presencia de todos los IDB y el control.

En el control además se observó una drástica reducción de la abundancia relativa de miembros del filo Firmicutes, así como un aumento de la abundancia relativa de miembros de Proteobacteria, Desulfobacteria, Actinobacteria y Verrucomicrobia, en ese orden. Por el contrario, se detectó un aumento considerable de la abundancia de bacterias del filo Firmicutes en todos los IDB. El filo Proteobacteria, además de aumentar su abundancia relativa en el control, también lo hizo en presencia del IDB Brown ale. En el caso del filo Desulfobacteria se observó una disminución de su abundancia relativa en presencia de los IDB Brown ale y Doble malta, mientras que en presencia del IDB IPA aumentó. En el filo Verrucomicrobia se detectó un aumento en todos los casos, excepto en la presencia del IDB IPA. Finalmente, en el caso de Actinobacteria, se observó un ligero aumento de su abundancia relativa en presencia de los IDB IPA y Doble malta. En general, el microbioma conservó el orden y los tres filos dominantes iniciales a lo largo del tiempo. En el caso de la fermentación colónica con el IDB IPA y del control, el filo Desulfobacteria pasó a ser el cuarto filo dominante desde las 24 horas y se mantuvo a las 48 h.



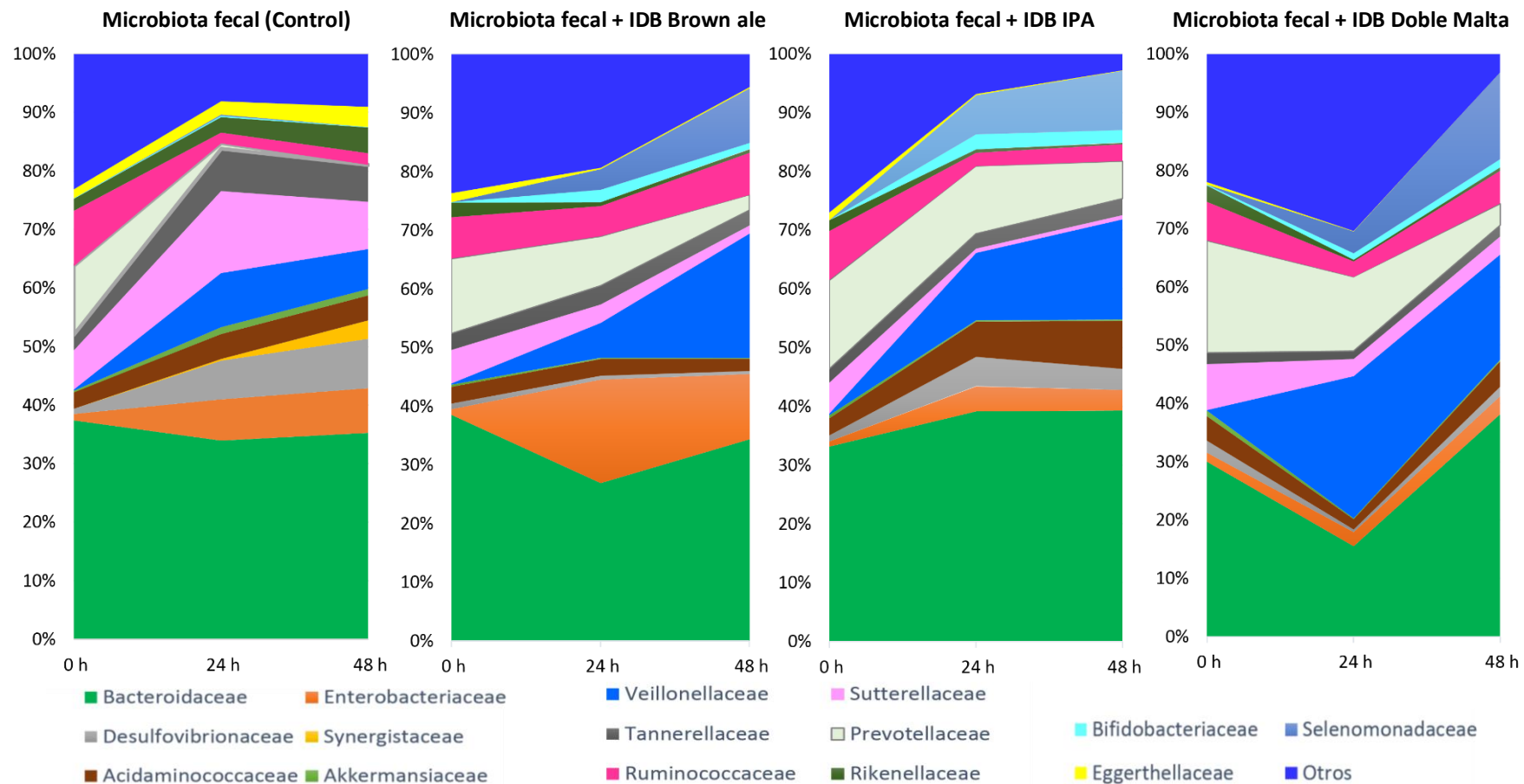
**Figura 50.** Evolución de los filos bacterianos con abundancia relativa superior al 0,5 % durante las fermentaciones en ausencia (control) y presencia de los distintos digerido intestinales de cervezas (IDB Brown ale, IDB IPA e IDB Doble malta); (B/F), proporción Bacteroidetes/Firmicutes.

#### 6.3.1.4. Análisis a niveles de familia y género de los perfiles microbianos

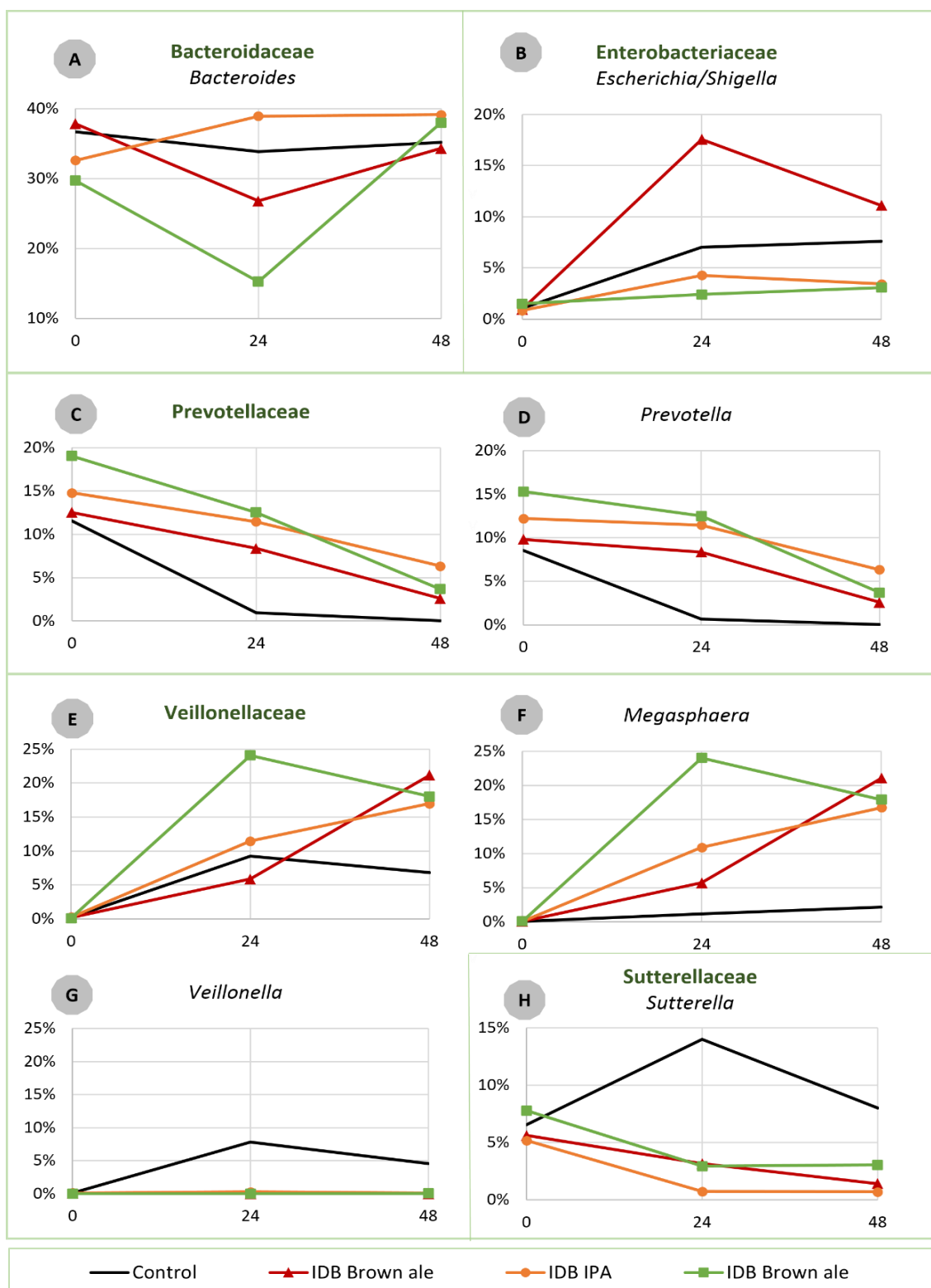
El análisis a nivel de familia se llevó a cabo analizando los cambios en las abundancias relativas para aquellos taxones con una abundancia superior al 0,5 % en al menos una de las condiciones analizadas. En la Figuras 51, se observa que las familias predominantes en las muestras fecales en la fase inicial de las fermentaciones fueron Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae y Sutterellaceae (tiempo 0 h).

Los resultados mostraron una disminución de la abundancia relativa de miembros de la familia Bacteroidaceae a las 24 h en presencia de los IDB Brown Ale y Doble malta, principalmente debido a la disminución observada en los niveles de miembros del género *Bacteroides* (Figura 51 y 52A). En presencia del IDB IPA se detectó un incremento a las 24 h. A las 48 h se observaron proporciones similares en todas las condiciones, detectándose un importante aumento de los niveles de *Bacteroides*, y por tanto de miembros de la familia Bacteroidaceae, en presencia del IDB Doble malta.

En el caso de los miembros de la familia Enterobacteriaceae, fundamentalmente dominada por miembros del género *Escherichia/Shigella*, se observó un incremento importante de la abundancia relativa en presencia del IDB Brown ale, mientras que en presencia de los IDB IPA y Doble malta se observó un retardo considerable en el crecimiento y alcanzaron niveles similares, pero más bajos de abundancia en comparación con el control (Figuras 51 y 52B). En el caso de la familia Prevotellaceae, dominada principalmente por el género *Prevotella*, se observó una disminución de la abundancia relativa tanto para el control como en presencia de los IDB (Figuras 51 y 52 C-D), siendo esta disminución menor en presencia de los IDB IPA y Brown ale. La familia Veillonellaceae, dominada fundamentalmente por miembros de los géneros *Megasphaera* y *Veillonella*, reveló un importante aumento, en presencia de los tres IDB, siendo este resultado debido al incremento en las proporciones abundancias de miembros del género *Megasphaera*. En cuanto al género *Veillonella* se detectó un importante aumento en la condición control, sin embargo, no se detectaron cambios en presencia de los IDB, que mantuvieron los niveles iniciales de abundancia relativa (Figuras 51 y 52 E-G).

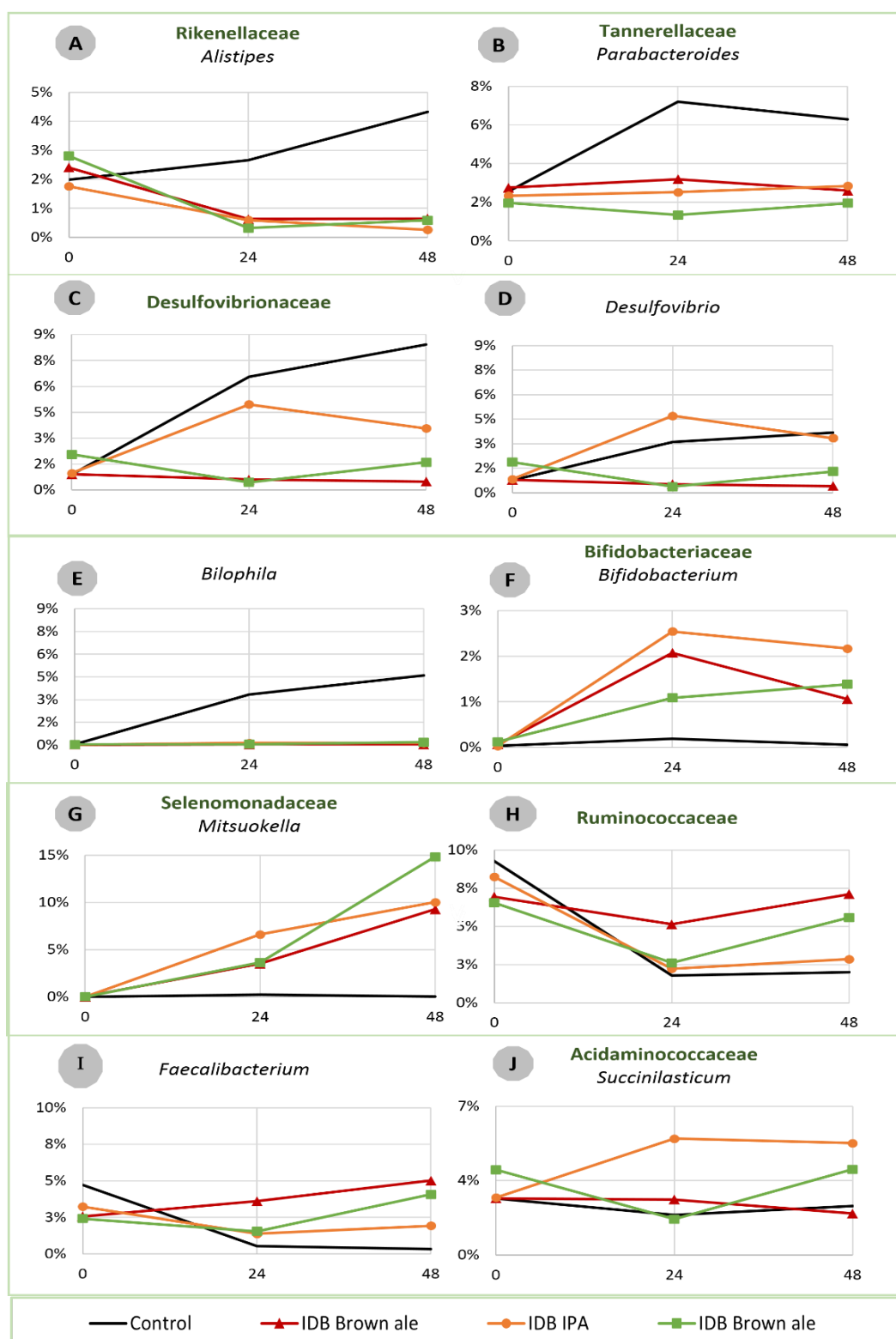


**Figura 51.** Evolución de la abundancia relativa a nivel de familia durante las fermentaciones en ausencia (control) y presencia de los distintos digeridos intestinales de cervezas (IDB Brown ale, IDB IPA e IDB Doble malta). Se muestran aquellos taxones con una abundancia relativa superior al 0,5 %.



**Figura 52.** Evolución de algunos géneros bacterianos, seleccionados en base a su importante papel en el microbioma intestinal y en la salud humana, durante las fermentaciones en ausencia (control) y presencia de los distintos digeridos intestinales de cervezas (IDB Brown ale, IDB IPA e IDB Doble malta).





**Figura 53 (A-J).** Evolución de algunos géneros bacterianos, seleccionados en base a su importante papel en el microbioma intestinal y en la salud humana, durante las fermentaciones en ausencia (control) y presencia de los distintos digeridos intestinales de cervezas (IDB Brown ale, IDB IPA e IDB Doble malta).

En lo que se refiere a los miembros de la familia Sutterellaceae, dominada principalmente por el género *Sutterella*, se observó un incremento de su abundancia en el control, mientras que en presencia de los IDB se detectó una clara disminución a lo largo del tiempo (Figuras 51 y 52 H). La misma tendencia fue observada en el caso de los miembros de las familias Rikenellaceae (principalmente dominada por el género *Alistipes*), y Eggerthellaceae (dominada fundamentalmente por *Slackia*) (Figuras 51 y 53 A), y en el caso de los miembros de la familia Tannerellaceae, dominada por *Parabacteroides*, se observa un incremento de la abundancia en el control, mientras que los niveles parecieron mantenerse a lo largo del tiempo en presencia de los tres IDB (Figuras 51 y 53 B).

En la familia Desulfovibrionaceae, dominada por los géneros *Bilophila* y *Desulfovibrio*, se observó un aumento continuo de su abundancia relativa en el control y en presencia del IDB IPA, debido principalmente al incremento de la abundancia del género *Desulfovibrio*, mientras que en presencia de los IDB Brown Ale y Doble malta los niveles de esta familia se mantuvieron o disminuyeron ligeramente en el tiempo. En el género *Bilophila*, se observó un incremento de su abundancia en el control, mientras que en presencia de los IDB se mantuvieron sus bajos niveles iniciales (Figuras 51 y 53 C-E). Por otro lado, y de forma interesante, se detectó un aumento en los niveles de miembros de la familia Bifidobacteriaceae en presencia de los tres IDB, más notable en el caso del IDB IPA mientras que en el control se mantuvieron los niveles bajos iniciales, observándose la misma tendencia a nivel del género *Bifidobacterium*. (Figuras 51 y 53 F). Un resultado similar se observó en el caso de la familia Selenomonadaceae y el género *Mitsuokella*, aunque este incremento fue mayor en presencia del IDB Doble malta (Figuras 51 y 53 G). También fue relevante el resultado en el caso de *Faecalibacterium*, perteneciente a la familia Ruminococcaceae, en el que se observó un incremento de su abundancia en presencia de los IDB Brown ale y Doble malta; mientras que en presencia del IDB IPA la abundancia disminuyó ligeramente, aunque con menor intensidad en relación con el control (Figuras 51 y 53 H-I). Finalmente, se detectó un incremento en los miembros de la familia Acidaminococcaceae en presencia del IDB IPA, fundamentalmente debido al incremento de los miembros del género *Succinilasticum*, mientras que, en el resto los niveles iniciales y finales fueron similares (Figuras 51 y 53 J). La evolución de la abundancia relativa de los principales géneros durante el transcurso de cada fermentación se muestra en la Figura 54 y Tabla 34.

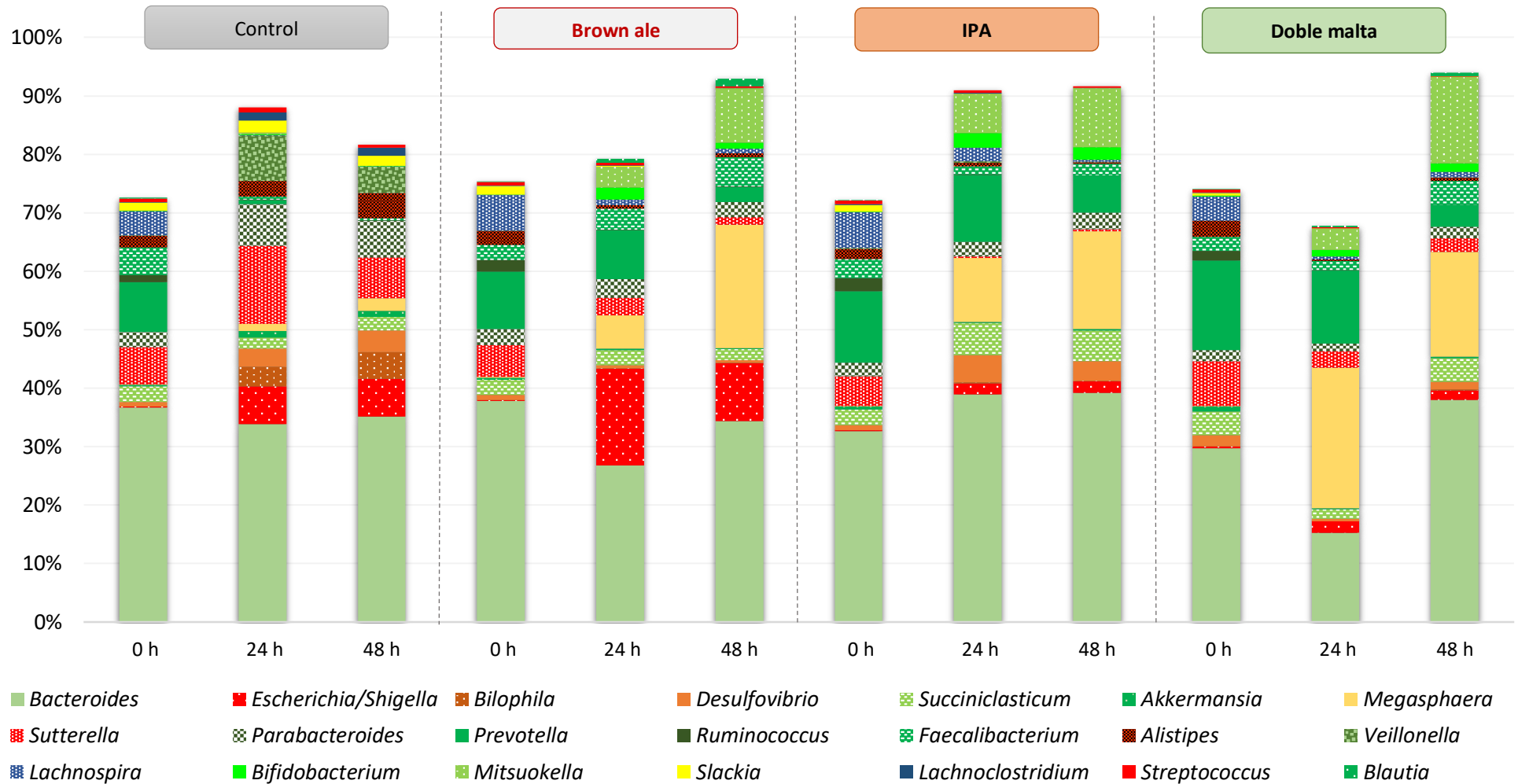
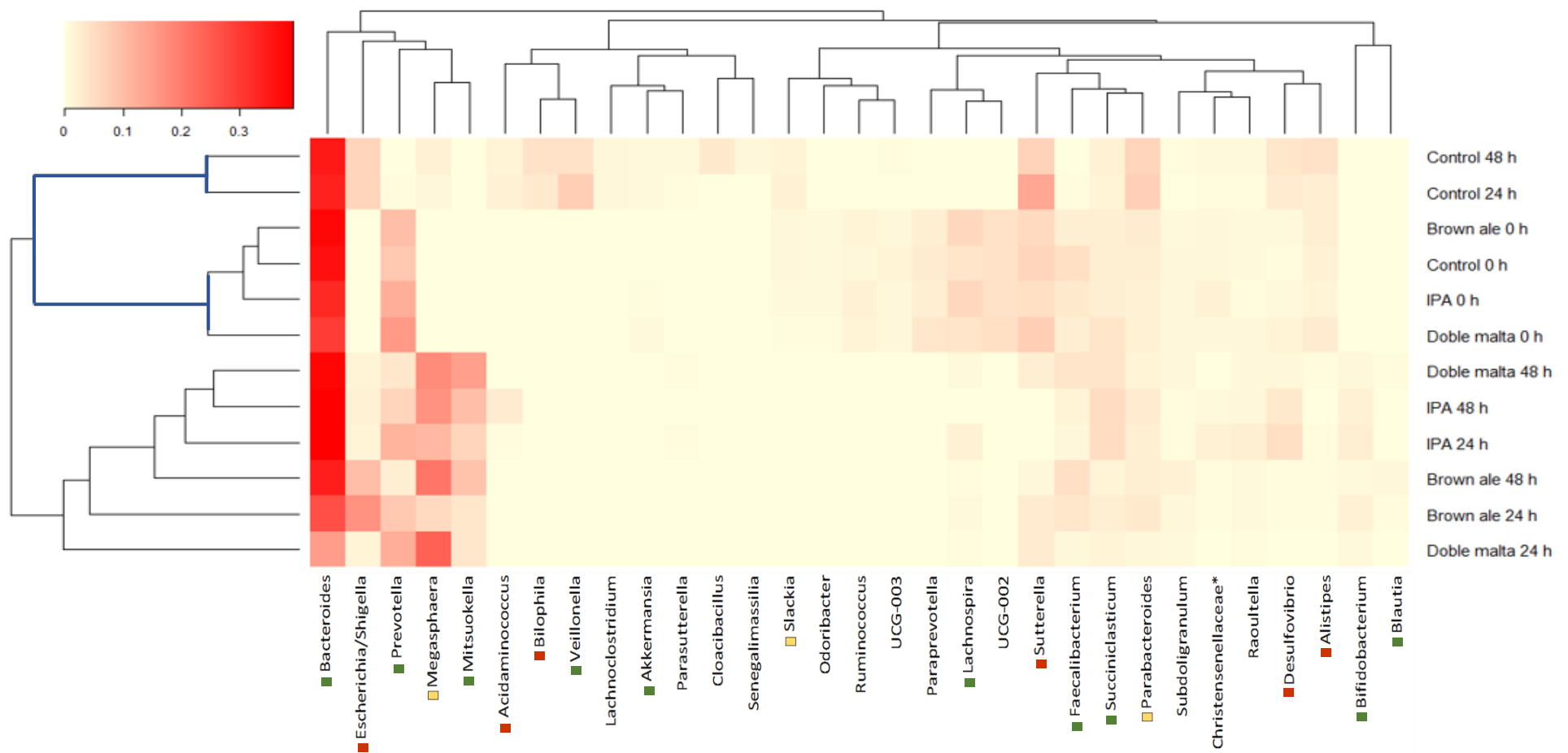


Figura 54. Abundancia relativa de los principales géneros presentes en el control y en presencia de los IDB (Brown ale, IPA y Doble malta) a 0 h, 24 h y 48 h.

**Tabla 34.** Porcentajes de abundancia relativa de los principales géneros presentes en el control y en presencia de los IDB (Brown ale, IPA y Doble malta) a 0 h, 24 h y 48 h.

Género / MUESTRA	CONTROL			BROWN ALE			IPA			DOBLE MALTA		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
<i>Bacteroides</i>	36,65 %	33,82 %	35,14 %	37,82 %	26,76 %	34,30 %	32,59 %	38,90 %	39,13 %	29,71 %	15,24 %	37,96 %
<i>Megasphaera</i>	0,10 %	1,20 %	2,18 %	0,10 %	5,75 %	21,09 %	0,09 %	10,94 %	16,76 %	0,09 %	24,06 %	17,94 %
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,19 %	6,48 %	6,42 %	0,16 %	16,56 %	9,99 %	0,19 %	1,91 %	1,98 %	0,31 %	1,94 %	1,62 %
<i>Mitsuokella</i>	0,00 %	0,22 %	0,02 %	0,02 %	3,53 %	9,28 %	0,00 %	6,62 %	10,02 %	0,00 %	3,65 %	14,83 %
<i>Prevotella</i>	8,53 %	0,66 %	0,02 %	9,82 %	8,37 %	2,59 %	12,20 %	11,45 %	6,34 %	15,31 %	12,51 %	3,69 %
<i>Faecalibacterium</i>	4,71 %	0,52 %	0,33 %	2,57 %	3,61 %	5,01 %	3,23 %	1,37 %	1,93 %	2,41 %	1,54 %	4,07 %
<i>Sutterella</i>	6,40 %	13,33 %	6,98 %	5,50 %	2,96 %	1,32 %	5,08 %	0,23 %	0,34 %	7,62 %	2,86 %	2,37 %
<i>Succiniclaticum</i>	2,66 %	1,88 %	2,30 %	2,66 %	2,61 %	1,95 %	2,70 %	5,48 %	5,26 %	4,01 %	1,69 %	4,03 %
<i>Lachnospira</i>	4,13 %	0,09 %	0,05 %	6,11 %	0,96 %	0,75 %	6,18 %	2,27 %	0,36 %	4,13 %	0,51 %	0,99 %
<i>Desulfovibrio</i>	0,77 %	3,10 %	3,67 %	0,79 %	0,52 %	0,40 %	0,83 %	4,71 %	3,34 %	1,87 %	0,37 %	1,30 %
<i>Akkermansia</i>	0,24 %	1,16 %	1,06 %	0,34 %	0,22 %	0,15 %	0,50 %	0,18 %	0,25 %	0,91 %	0,11 %	0,24 %
<i>Parabacteroides</i>	2,58 %	7,20 %	6,29 %	2,76 %	3,19 %	2,61 %	2,34 %	2,52 %	2,85 %	1,96 %	1,32 %	1,95 %
<i>Bilophila</i>	0,04 %	3,34 %	4,61 %	0,02 %	0,04 %	0,04 %	0,03 %	0,14 %	0,13 %	0,03 %	0,05 %	0,19 %
<i>Ruminococcus</i>	1,22 %	0,05 %	0,03 %	1,94 %	0,05 %	0,08 %	2,30 %	0,09 %	0,04 %	1,61 %	0,03 %	0,06 %
<i>Alistipes</i>	1,99 %	2,66 %	4,33 %	2,41 %	0,63 %	0,65 %	1,76 %	0,60 %	0,26 %	2,80 %	0,32 %	0,59 %
<i>Veillonella</i>	0,11 %	7,79 %	4,57 %	0,06 %	0,03 %	0,00 %	0,12 %	0,28 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %
<i>Bifidobacterium</i>	0,03 %	0,19 %	0,06 %	0,07 %	2,08 %	1,06 %	0,03 %	2,54 %	2,17 %	0,12 %	1,09 %	1,39 %
<i>Slackia</i>	1,42 %	2,05 %	1,72 %	1,41 %	0,13 %	0,05 %	1,17 %	0,13 %	0,04 %	0,44 %	0,06 %	0,01 %
<i>Lachnospiridium</i>	0,09 %	1,39 %	1,32 %	0,10 %	0,10 %	0,05 %	0,10 %	0,10 %	0,12 %	0,09 %	0,06 %	0,00 %
<i>Streptococcus</i>	0,60 %	0,87 %	0,53 %	0,58 %	0,48 %	0,25 %	0,68 %	0,47 %	0,18 %	0,56 %	0,11 %	0,13 %
<i>Blautia</i>	0,15 %	0,00 %	0,00 %	0,08 %	0,63 %	1,33 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,09 %	0,26 %	0,55 %

Adicionalmente, se realizó un mapa de calor con el fin de analizar de forma global los resultados y mostrar los cambios en el tiempo a nivel de género (aquellos con una abundancia superior al 1 %). Los resultados se muestran en la Figura 55. Como se esperaba, además de los resultados previamente comentados, este gráfico muestra, marcado en línea azul (—), una correlación entre los controles (0, 24 h y 48 h) y las fermentaciones iniciales de los IDB en tiempo 0 h, corroborando las tendencias visualizadas en el análisis de la  $\beta$  diversidad y demostrando que la presencia de los distintos IDB modula la microbiota presente en el fermentador.



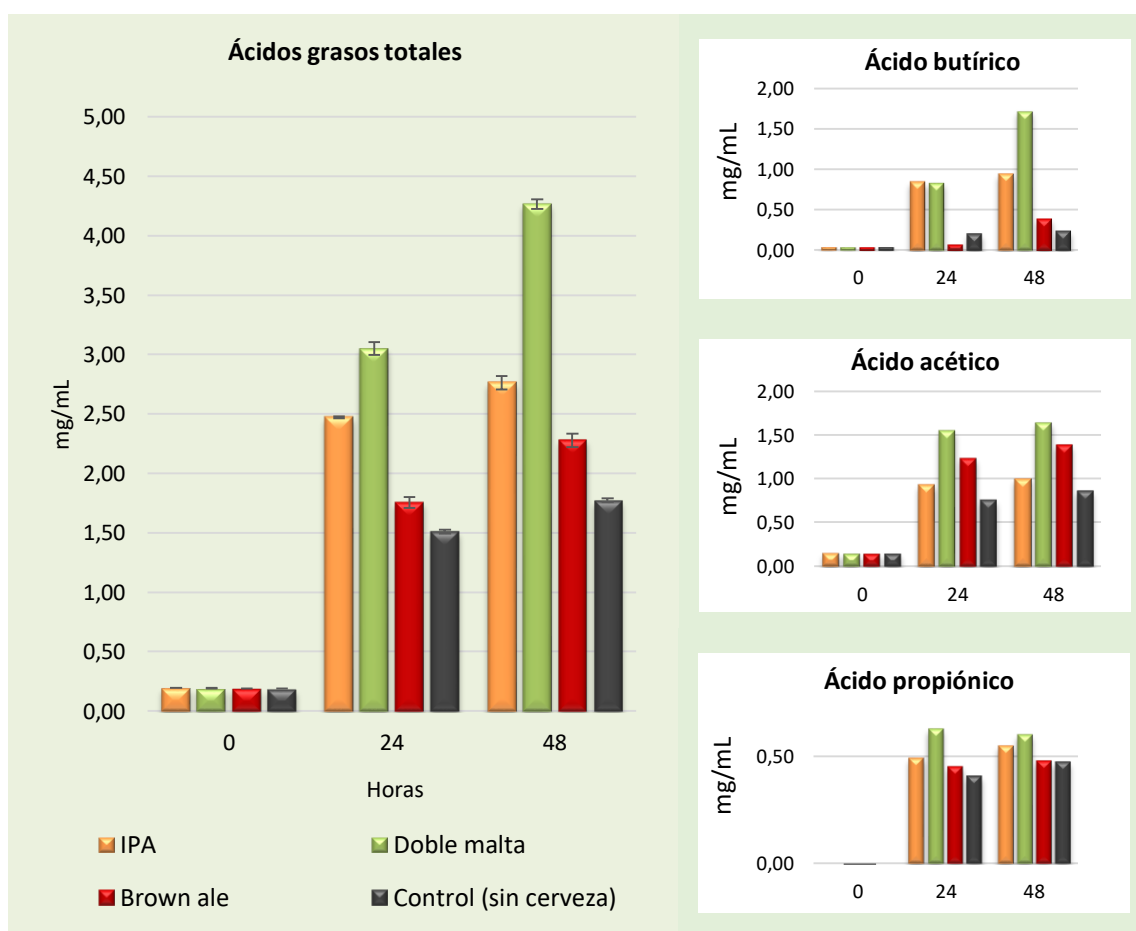
**Figura 55.** Evolución de la microbiota fecal a nivel de género durante las fermentaciones fecales ausencia (control) y presencia de los digeridos intestinales de las cervezas (Brown ale, IPA, Doble malta). Se han utilizado aquellos géneros con una abundancia relativa superior al 1 % para la generación del diagrama de calor. (\*), Christensenellaceae\_R.7\_grupo; (■), bacterias con posibles efectos positivos en la salud del huésped; (■), bacterias con posibles efectos adversos a la salud del huésped; (□), bacterias con efectos en debate según literatura.

### 6.3.2. Cambios en la actividad metabólica de la microbiota intestinal

Como indicadores de la actividad metabólica de la microbiota intestinal, se analizaron las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y del ion amonio.

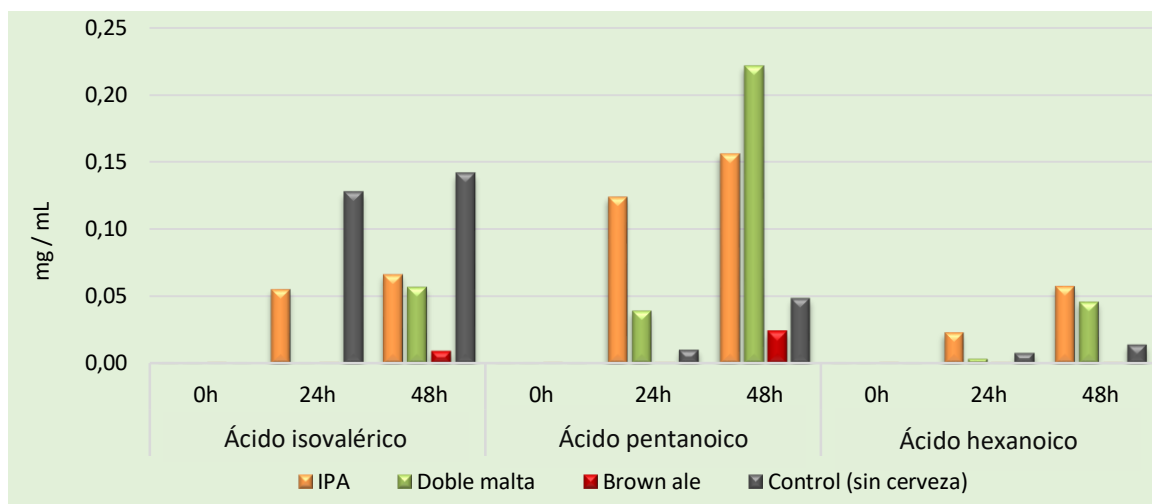
#### 6.3.2.1. Concentración de ácidos grasos en el intestino

Se determinó la concentración de AGCC (ácidos: butírico, acético, propiónico, isovalérico, pentanoico y hexanoico) en las heces para estimar qué compuestos se producen y en qué cantidad tras la fermentación del control y en presencia de los IDB. Entre los AGCC evaluados, los ácidos butírico, acético y propiónico mostraron las concentraciones más altas en una proporción de 1,71 : 1,82 : 1 en presencia del IDB IPA; 2,87 : 2,73 : 1 para el IDB Doble malta, mientras que para el IDB Brown ale fue de 1 : 3,64 : 1,26; respectivamente. Como se esperaba, sus concentraciones aumentaron durante el transcurso de la fermentación fecal. Durante las fermentaciones el aumento de las concentraciones de los AGCC se produjo mayoritariamente en las primeras 24 h, continuando este incremento a las 48 horas, debido principalmente al incremento de ácido butírico con un porcentaje de incremento medio de 72,5 % (Figura 56).



**Figura 56.** Evolución de la concentración media de AGCC totales y AGCC más abundantes (ácidos butírico, acético y propiónico) durante las fermentaciones fecales en ausencia (control) y presencia de los digeridos intestinales de las cervezas (IPA, Brown ale y Doble malta). Las barras reflejan la desviación estándar de los triplicados.

Al comparar las fermentaciones en presencia de los IDB con respecto a su ausencia (control), se encontraron concentraciones mayores para los tres ácidos grasos mencionados, tanto a las 24 como a las 48 horas. Los valores más altos de AGCC se obtuvieron en presencia del IDB Doble malta, tanto para los AGCC totales, como para los principales AGCC: ácidos acético, propiónico y butírico (Figura 56), seguido del IDB IPA. Además, en presencia de los IDB IPA y Doble malta se detectaron los valores más altos para los ácidos pentanoico y hexanoico. Sólo el ácido isovalérico mostró una concentración mayor a las 24 y 48 horas en ausencia de IDB (control) (Figura 57).

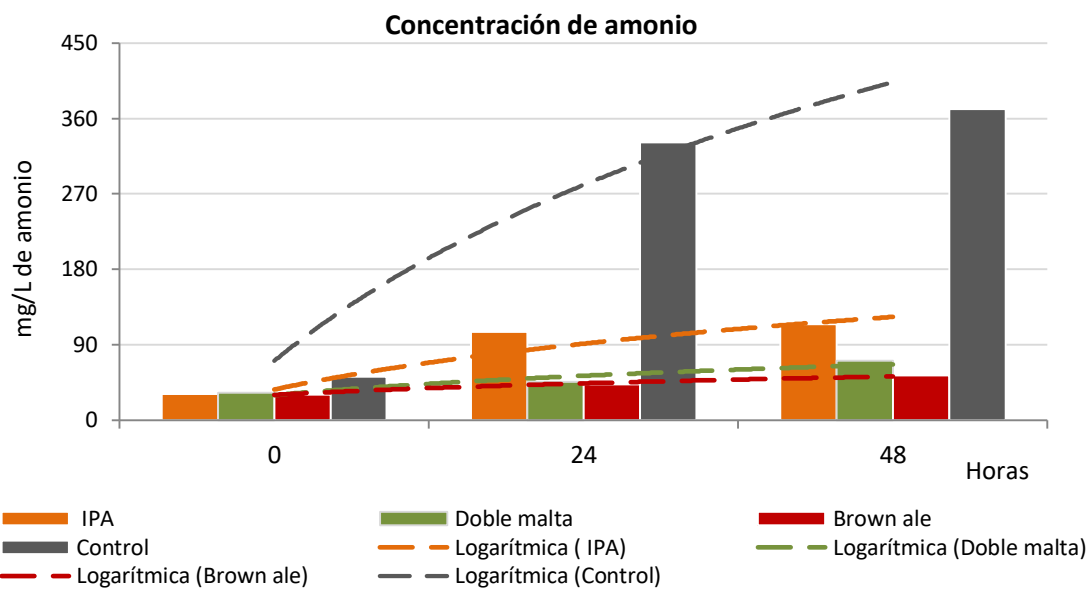


**Figura 57.** Evolución de la concentración media de los AGCC minoritarios (ácidos isovalérico, pentanoico y hexanoico) durante las fermentaciones fecales en ausencia (control) y presencia de los digeridos intestinales de las cervezas (IPA, Brown ale y Doble malta).

### 6.3.2.2. Concentración de amonio en el intestino

La Figura 58 muestra la evolución del contenido de amonio durante las fermentaciones fecales. Se observó una notable menor producción de amonio en presencia de los IDB, en comparación con el control, ya que el incremento desde las 0 h a las 48 h en presencia de los IDB Brown ale, Doble malta e IPA fueron de 73 %, 119 % y 264 %, respectivamente; mientras que en el control se incrementó un 613 %.





**Figura 58.** Evolución del contenido medio de amonio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) durante las fermentaciones fecales en ausencia (control) y presencia de los digeridos intestinales de las cervezas (IPA, Doble malta y Brown Ale).



*Discusión*



## 7. DISCUSIÓN

Como se ha comentado en los capítulos anteriores, cada vez hay más interés en reinventar la cerveza convencional para hacerla más atractiva y actualmente los cerveceros tienen más flexibilidad para enfatizar diferentes perfiles sensoriales y diseñar cervezas especiales. Ante una tendencia mundial hacia un estilo de vida más saludable y de mejorar las cualidades de los productos, en la última década el mercado de las cervezas especiales ha evolucionado significativamente ofreciendo características adicionales del producto, como una mayor funcionalidad, nuevos sabores y gustos. Las cervezas artesanales aumentan constantemente su cuota de mercado, frente a los productos de las grandes multinacionales cerveceras. El carácter diferencial de este tipo de cervezas es muy apreciado por los consumidores y esto incluso hace que disminuya la importancia de sus precios, principal factor de elección de alimentos y bebidas. En el proceso de elaboración de la cerveza, la eficacia de la fermentación, el carácter y la calidad del producto final están íntimamente relacionados. En general, las cervecerías artesanales se enfrentan a muchos retos, debido al menor volumen de producción, suelen carecer de un laboratorio para el control de calidad de la cerveza y desde el punto de vista biotecnológico, priorizar la calidad y seguridad del producto a la vez que mejorar el perfil del sabor es una operación compleja. Esto requiere un profundo conocimiento de los procesos, caracterización de las materias primas, las diferentes bacterias y levaduras fermentadoras para modular el *flavor* y otras propiedades sensoriales de la cerveza para un consumidor cada vez más exigente. En definitiva, hay una necesidad acuciante de investigar más a fondo las técnicas de producción de cerveza.

La presente Tesis Doctoral se ha estructurado en cuatro capítulos. En primer lugar, partiendo de la base de que la cerveza artesanal puede estar expuesta a microorganismos alterantes desde las primeras etapas de su producción en la planta y hasta llegar al mercado, se ha llevado a cabo un estudio sistemático de caracterización de la microbiota de bacterias lácticas representativa del proceso de elaboración en una cervecería artesanal y se han identificado los puntos más críticos del proceso. En los microorganismos aislados de la planta se ha evaluado la producción de exopolisacáridos y aminas biógenas, así como la detección de genes de resistencia al lúpulo y su capacidad deteriorante, considerados en conjunto como los principales riesgos de alteración de la calidad microbiológica y seguridad alimentaria en la cerveza envasada (Rodríguez-Saavedra et al., 2020). Una vez identificadas las principales especies de bacterias lácticas y sus riesgos, se llevó a cabo el desarrollo de un modelo de regresión logística binomial de tipo G/NG mediante una amplia combinación de variables de

predicción del crecimiento microbiano en la cerveza que, tras su validación, se propone como una herramienta de fácil implementación para determinar la susceptibilidad al crecimiento microbiano en las cervezas artesanales (Rodríguez-Saavedra, Pérez-Revelo, et al., 2021). Teniendo en cuenta que la nueva tendencia en biotecnología cervecera implica a las levaduras no convencionales en el proceso de fermentación, dadas las mejoras que pueden producir en la calidad y diferenciación sensorial, incluyendo las cervezas artesanales de bajo alcohol, otro objetivo de esta Tesis Doctoral fue la selección de nuevas levaduras no-*Saccharomyces*, a partir de una amplia colección de aislados y mediante un enfoque holístico que implica la evaluación de sus características fermentativas, metabólicas y sensoriales. La selección de la cepa *Lachancea thermotolerans* CIAL37 y el abordaje de su aptitud tecnológica a escala de laboratorio, por su capacidad fermentativa produciendo ácidos láctico y cítrico a partir de azúcares e interesantes efectos en el *flavor* de la cerveza, enfatiza el gran interés por explotar sus propiedades en cervecería (Rodríguez-Saavedra et al., en preparación), especialmente considerando las escasas cepas de levaduras de esta especie disponibles comercialmente para los cerveceros. Esta Tesis Doctoral también ha integrado un capítulo relativo a las propiedades saludables de la cerveza artesanal, asumiendo el aumento de la preocupación por la salud por parte de los consumidores y la necesidad de estudios en este ámbito siempre controvertido por las consecuencias negativas del contenido en alcohol. Mediante un enfoque muy novedoso se ha abordado el estudio del impacto de diferentes estilos de cerveza sobre el microbioma intestinal y biomarcadores de salud intestinal. Para ello, se ha realizado un ensayo de simulación *in vitro* de la ingesta de cerveza en la plataforma de SIMulación GastroIntestinal dinámica simgi® seguido de la evaluación de la actividad sobre la microbiota colónica de los digeridos (Rodríguez-Saavedra et al., en preparación).

Además, la presente Tesis Doctoral recoge tres revisiones bibliográficas acerca de la descripción de especies de bacterias alterantes y nuevas levaduras y su repercusión industrial en cervecería (Rodríguez-Saavedra et al., 2019; Rodríguez-Saavedra, González de Llano, et al., 2021) así como del estado del arte de las investigaciones sobre el consumo moderado de cerveza en la función y salud intestinal y la comprensión de los mecanismos de acción, con perspectivas muy prometedoras para este fin (Rodríguez-Saavedra et al., en preparación). A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los distintos aspectos de esta Tesis Doctoral en el marco de la literatura científica más reciente.

### 7.1. Implicaciones de las bacterias lácticas en la calidad y seguridad de la cerveza artesanal

Como se ha comentado en la introducción, la cerveza, en general, se considera un sustrato de crecimiento desfavorable para los microorganismos debido a varios factores intrínsecos y a la limitada disponibilidad de nutrientes, sin embargo, algunos pueden crecer y causar contaminación microbiológica. Específicamente, por sus características, la cerveza artesanal puede ser un producto más susceptible microbiológicamente, e incluso en ocasiones perecedero, y son muchos los factores que pueden mermar su calidad desde el momento de su elaboración hasta el momento de su consumo. Salvo algunas bacterias ácido-lácticas específicas que se encuentran en algunas cervezas especiales, especialmente, las 'cervezas ácidas', se considera que éstas son las causantes principales del deterioro de la cerveza, y por tanto las estrategias centradas en el estudio de sus características para prevenir su crecimiento y posterior deterioro del producto se hacen indispensables en cervecería, teniendo en cuenta que muchos de los desarrollos en la producción de cerveza, están impulsados en gran medida por razones comerciales, que se enfocan en la mejorar de la estabilidad y propiedades sensoriales del producto. Además, las cervecerías artesanales habitualmente no ejecutan controles microbiológicos que incluya métodos fiables para la detección temprana de microorganismos contaminantes. Por tanto, predecir y controlar el potencial impacto de estos microorganismos alterantes en las etapas de elaboración de la cerveza es un reto para los cerveceros artesanales e investigadores.

Hasta el momento, hay pocos estudios publicados sobre las BAL presentes en la microbiota de las cervecerías, sus posibles fuentes de origen y capacidades de crecimiento en los diversos estilos cerveceros; y especialmente es un tema muy poco explorado en el caso de las cervezas artesanales. Previo a la realización de esta Tesis Doctoral, los estudios estaban enfocados en el papel de cultivos aislados de BAL en la producción de compuestos indeseables para la cerveza, pero no se han realizado estudios que de forma sistemática abarquen desde la monitorización y aislamiento en cervecería y el producto, hasta las pruebas de caracterización de los aislados, así como la identificación de las bacterias y su caracterización en la cerveza, tras la adecuación de un método de adaptación apropiado.

Como primer paso de este estudio, se seleccionó una cervecería artesanal que elabora más de 15 marcas/variedades de cerveza en su producción, excepto los estilos *sour* y *lambic*, por tanto, representativa de este sector, y para la toma de muestras en colaboración con el personal directivo y técnico de la cervecería, se consideraron las zonas con mayor probabilidad

de contaminación primaria o secundaria. Se tomaron 60 muestras de los puntos más críticos, que incluían la monitorización ambiental, hisopados de superficie de equipos y accesorios, productos intermedios, cerveza embotellada y producto terminado del almacén.

La detección de las BAL con los medios modificados basados en MRS con maltosa  $2 \text{ gL}^{-1}$  e indicador rojo de clorofenol (0,04 %), facilitaron el reconocimiento de las colonias productoras de ácido láctico. Para realizar la técnica de exposición de placas al aire durante 30 min, se adicionó al agar-MRSm el agente reductor L-cisteína clorhidrato al 0,05 % y 15 ppm de cicloheximida con el fin de incrementar la selectividad del medio e inhibir a las levaduras cerveceras *Saccharomyces* spp. Así mismo, la adición de 0,2 % de agar al caldo MRS ayudó a mantener los hisopos fijos dentro del medio durante su transporte desde la fábrica hacia los laboratorios del CIAL.

Las BAL aisladas de la cervecería artesanal pertenecieron principalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, aunque los dos últimos en menor medida, y la mayoría de ellas se detectaron en áreas que podrían causar contaminación secundaria. Estos resultados concuerdan con estudios previos como los de (Maifreni et al., 2015) y (García-García et al., 2017), en los cuales también se describe al género *Lactobacillus* como el más frecuente en los entornos cerveceros.

El control de ambientes en las cervecerías artesanales es un factor importante ya que todos los procesos se llevan a cabo dentro de una misma nave de fabricación, en la cual el aire del ambiente podría transportar contaminantes desde la etapa de molienda de granos hasta las zonas de fermentación e incluso hasta el envasado (Rodhouse & Carbonero, 2019). De diversas áreas y superficies muestreadas, se aislaron las cepas *P. acidilactici* CIALBP3, *L. citreum* CIALB1 y *L. mesenteroides* CIALB3, que podrían tener origen en las materias primas, ya que estas especies forman parte de la microbiota de frutas y de granos de cebada (Olstorpe et al., 2010), trigo (Booyesen et al., 2002) y malta (Justé et al., 2014) (Vaughan et al., 2001). El aislado *L. mesenteroides* CIALB3 fue detectado en la tolva y canal de coronas, por ello, para lograr precisar el origen, se ampliaron los controles rutinarios desde la etapa de recepción de las coronas, incluyendo el fraccionamiento, hasta su uso en el coronador. Estudios similares han descrito previamente la presencia de *Leuconostoc* en mosto, áreas de fermentación, cerveza fermentada, equipos de elaboración de cerveza (Bokulich et al., 2015; Poveda et al., 2017; Zheng et al., 2018) y en las máquinas de llenado de cervecerías artesanales (Garofalo et al., 2015). La cepa *P. acidilactici* CIALBP2 se aisló tanto en el ambiente de la llenadora como en el coronador, es decir, estaba diseminada en toda la zona de envasado. Este hecho podría



deberse a que durante el vaciado de la malta en las tolvas de molienda (Figura 20), el polvo originado queda suspendido en el aire y, a través de corrientes de aire, contamina las demás zonas de la nave.

*L. plantarum* CIALB2 se detectó en la superficie externa de un fermentador, indicando la formación de una biopelícula incipiente debido probablemente a una limpieza deficiente. En la zona de fermentación la concentración de extracto de los desechos de mosto es mayor, lo que podría favorecer su adherencia al interior de una posible biopelícula (Storgårds et al., 2006). En estudios previos, se ha descrito la presencia de *L. plantarum* en mosto fermentado, levadura recuperada y en cerveza filtrada de una cervecería artesanal (Manzano et al., 2011), mientras que la de *L. paracasei* en biopelículas de microcervecerías (Maifreni et al., 2015).

Es importante destacar el aislamiento en un mismo punto de muestreo de tres aislados de BAL diferentes; *L. paracasei* CIALB6, *L. paracasei* CIALB7 y *L. brevis* CIABD1 (Tabla 17), todos ellos presentes en la superficie de la estrella de ingreso al coronador. La presencia de varias cepas, incluso de diferentes especies, indica la presencia de una biopelícula bien establecida cuya formación se vio favorecida por el desgaste de la estrella por su uso constante, las pequeñas fisuras presentes sobre la superficie de la estrella a causa de las partículas de vidrio proveniente de las explosiones de botellas de vidrio durante el llenado, y los restos de producto depositados sobre la superficie durante todo el proceso de llenado. Este hallazgo sugiere que existe un alto riesgo de contaminación secundaria, a través de la propagación de micro aerosoles formados en el ambiente durante las operaciones de llenado y limpieza. Por lo tanto, una limpieza deficiente de las máquinas de llenado y coronador puede dar lugar a la introducción de bacterias en la cerveza antes de su cierre, cuyo desarrollo podría llegar al consumidor final, ya que, en una cervecería artesanal no se pasteuriza el producto envasado. Por ello, para minimizar este riesgo, se sugirió la utilización de cepillos especiales para la limpieza y el desmantelamiento de las estrellas para luego sumergirlos en una solución desinfectante adecuada.

El aislamiento de dos cepas distintas de la misma especie de *L. brevis*, CIALBD1 y CIALBL1, fue particularmente crucial porque no fueron detectadas en los controles microbiológicos llevados a cabo por el personal de la cervecería (comunicación personal). Este hallazgo es coherente con los resultados obtenidos por (Garofalo et al., 2015), en el que nunca lograron detectar una cepa de *L. brevis* dentro del entorno de una cervecería artesanal a pesar de los resultados positivos observados en cerveza envasada. Otros estudios han descrito la presencia de *L. brevis* en la etapa de fermentación y en cerveza artesanal filtrada (Manzano et

al., 2011), en grifos de llenado de una cervecería artesanal (Poveda et al., 2017) y en muestras de pellets de lúpulo (Bokulich et al., 2015). Aunque (García-García, Galán-Wong, et al., 2017), habían sugerido que esta especie ingresa por primera vez a las cervecerías a través del aire cuando aún no está adaptada a las condiciones de la cerveza, este estudio evidenció que ambas cepas aisladas ya estaban adaptadas al entorno cervecero puesto que *L. brevis* CIALBL1 se aisló en un lote de cerveza del estilo Brown ale que se encontraba inmovilizado por sospecha de contaminación.

El crecimiento de las BAL en la cerveza requiere un proceso previo de adaptación a los factores intrínsecos de la cerveza (pH, % ABV e IBU) que ocasionan inhibición de su crecimiento. Asimismo, (Haakensen, Schubert, et al., 2008) encontraron aislados que no presentaban genes relacionados con la resistencia al lúpulo, como el gen *horA*; pero se convirtieron en *horA* PCR positivos después de su crecimiento en cerveza. Por el contrario, algunas cepas de BAL cultivadas repetidamente en un medio sin los compuestos antimicrobianos de lúpulo (iso- $\alpha$ -ácidos) perdieron su capacidad de deterioro (Suzuki et al., 2006). Por ello, antes de realizar las pruebas de caracterización se simuló esta adaptación mediante el crecimiento sucesivo en las tres bebidas tipo cerveza, en las cuales se incrementó progresivamente los valores de los factores intrínsecos que ocasionan estrés a los microorganismos, siendo la última bebida (BEB 3) la más similar a la cerveza. Los resultados indicaron que los tiempos de adaptación fueron diferentes para cada cepa, incluso dentro la misma especie, y que algunos aislados solo lograron crecer en concentraciones sub-inhedoras de iso- $\alpha$ -ácidos, no logrando crecer en BEB 3 (Tabla 19). Este hecho concuerda con la observación que la capacidad de crecimiento en cerveza no es un fenotipo conservado por especies (Haakensen et al., 2007). Una vez adaptadas a los factores intrínsecos de la cerveza, las BAL se mantuvieron viables mediante pases sucesivos en BEB 3 durante todo el estudio.

En las pruebas de caracterización de las BAL, la producción de exopolisacáridos es de especial interés para las cervecerías, ya que los EPS favorecen la colonización de microorganismos incluso después de la limpieza. Además, recubren las biopelículas formadas y ayudan a que las células bacterianas se anclen a las superficies, protegiéndolas de los agentes externos físicos (limpieza mecánica) y químicos (productos químicos de limpieza y desinfección) (Priha et al., 2015). En diversos estudios se han utilizado los azúcares sacarosa y glucosa para determinar la capacidad de producción de EPS (Paulo, Boffo, et al., 2012), sin embargo, debido a que la formación de biopelículas depende en gran medida del sustrato

(Storgårds et al., 2006), en este estudio se incluyó maltosa por ser el azúcar mayoritario del mosto cervecero.

El hecho que los dos aislados de *L. paracasei*, que se encontraron en conjunto con *L. brevis* CIALD1, muestren fenotipo *ropy* en maltosa, sugiere que existe una alta probabilidad de que hayan producido EPS y favorecido el desarrollo de una biopelícula fuerte y mixta dentro de las pequeñas fisuras de la superficie. Si bien, el aislado *L. brevis* CIALD1 no produjo EPS, esta especie ha sido descrita como un colonizador tardío en biopelículas de fábricas cerveceras (Back, 2003), por lo que su persistencia pudo ser favorecida por los EPS producidos por los dos aislados de *L. paracasei*. Otro riesgo asociado a las biopelículas es la transferencia de plásmidos relacionados con la resistencia al lúpulo, entre los microorganismos que cohabitan (Bergsveinson et al., 2015), por tanto, el aislado *L. brevis* CIALBD1 podría transferir sus genes de resistencia al lúpulo, entre ellos *horA* y *horC*.

Como paso siguiente, se estudió la capacidad deteriorante de estos aislados en cervezas artesanales comerciales, embotelladas en la cervecería seleccionada, con el fin de evaluar el desarrollo microbiano en condiciones reales de un producto envasado en planta, ya que tiene en cuenta la presencia de levadura activa, presencia de CO<sub>2</sub> y la presión dentro de la botella. De los resultados de los parámetros fisicoquímicos de las diversas cervezas analizadas se observa que tienen amplios rangos de pH, IBU y alcohol, dependiendo de la marca y estilo de cerveza, en contraste a la cerveza *lager* industrial. La cerveza artesanal puede llegar incluso a valores mayores de 50 IBU debido al uso de lúpulos más amargos (Rodhouse & Carbonero, 2019), a diferencia de la cerveza *lager* que tienen alrededor de 25 IBU. Los estilos de cerveza con bajas IBU son Lite, Dark y Standard American Lager, Weizen/Weissbier y Berliner Weisse, mientras que las cervezas con más IBU son Imperial IPA y American Barleywine. En relación con el contenido de alcohol, podemos encontrar cervezas con valores inferiores a 3 % ABV, en los estilos Scottish, Lite American Lager, Southern English Brown y Berliner Weisse, mientras que pueden ser superiores al 10 % ABV en Eisbock, Russian Imperial Stout, Belgian Dark Strong y Barleywine. Aunque en España el consumo de cervezas ácidas es mucho menor que en otros países del mundo, como Bélgica y Estados Unidos, se trata de un mercado en expansión. Por lo expuesto, el rango de estudio de los factores intrínsecos de la cerveza fue amplio, incluyendo valores de 10 - 50 IBU, 2,3 - 10,0 % ABV y pH de 4,50 - 3,50 (Tabla 21).

Se observó que cada nivel de factor intrínseco tenía un efecto cepa-dependiente sobre el crecimiento microbiano. En este sentido, cabe destacar que algunas bacterias presentes en la microbiota de la cervecería artesanal toleran altos contenidos de alcohol y pudieron crecer

en condiciones restrictivas de alto estrés (altos % ABV e IBU) (Tabla 21), siendo los dos aislados de *L. brevis* los que mostraron mayor probabilidad de ocasionar un deterioro en la cerveza. Este hecho fue confirmado en el estudio de su capacidad deteriorante sobre diversas cervezas comerciales y la razón, en gran parte, fue la presencia de varios genes relacionados con la resistencia al lúpulo.

En el estudio de los genes relacionados con la resistencia al lúpulo y la capacidad de deteriorante en las BAL aisladas y previamente adaptadas a la cerveza, observamos la ausencia de estos genes en los aislados *L. plantarum* CIALB2, *L. mesenteroides* CIALB3 y *P. acidilactici* CIALBP3; no obstante, estas cepas solo crecieron en cervezas con menos de 20 IBU, especialmente *L. plantarum* CIALB2. Nuestros resultados mostraron que *L. plantarum* CIALB2 es una bacteria potencialmente deteriorante, pero el deterioro es dependiente de los valores de los factores intrínsecos de la cerveza. En los últimos años, se han descrito algunos incidentes de deterioro de la cerveza por *L. plantarum* (Schneiderbanger et al., 2018). Respecto a *Leuconostoc* spp., solo se ha informado una frecuencia de incidentes < 1 % (Suzuki et al., 2008). En este estudio, tanto *L. citreum* CIALB1 como *L. paracasei* CIALB6, mostraron poseer el gen ORF5 y solo pudieron crecer en dos cervezas testadas. Estos resultados explican el hecho de porqué estos aislados no hayan causado ningún incidente de deterioro en la cervecería artesanal seleccionada, ya que la marca de cerveza elaborada con las IBU más bajas es una Brown Ale (22 IBU, 5,0 % ABV, pH 4,3). De manera similar, (Ruiz et al., 2018) reportaron que *L. mesenteroides* no tuvo ningún impacto negativo cuando se testeó en una cerveza con 25 IBU. En América del Sur, *L. mesenteroides* y *L. citreum* solo han causado incidentes de deterioro en bebidas de malta sin lúpulo, siendo la adición de lúpulo a niveles muy bajos y sensorialmente indetectables, una medida preventiva eficaz (comunicación personal). Según los resultados, *L. mesenteroides* CIALB3 puede ser un riesgo para cervezas con muy bajo contenido de lúpulo, como los estilos de cerveza de trigo bávara (10 - 14 IBU), como también lo indica (Riedl et al., 2017).

Como era de esperar, los genes de resistencia al lúpulo, principalmente *horA* y *horC* fueron los que más contribuyeron con la capacidad deteriorante de los aislados. El aislado *L. brevis* CIALBD1 contiene *horA*, *horC*, y ORF5, mientras que *L. brevis* CIALBL1 contiene todos los genes testeados, incluido *hitA*. Ambos aislados deterioraron el 91 % de las cervezas testadas; y no pudieron crecer únicamente en la cerveza B11, posiblemente por tener el valor de pH más bajo (pH = 3,47). Sin embargo, es importante mencionar que recientemente se han

identificado nuevos genes implicados en la resistencia al lúpulo (Feyereisen et al., 2020), cuya presencia en todos los aislados sería conveniente ensayar posteriormente.

Respecto a la capacidad de producir aminas biógenas, el potencial aminogénico no se distribuyó homogéneamente dentro de la misma especie, acorde con la hipótesis que la presencia de genes aminoácido-descarboxilasas es un rasgo dependiente de cada cepa en las BAL (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014). Aunque algunos aislados que contienen los genes *tdc*, *hdc*, u *odc*, no produjeron las correspondientes aminas biógenas en cerveza, tiramina, histamina y putrescina, respectivamente, probablemente por el efecto de los iso- $\alpha$ -ácidos provenientes del lúpulo (cerveza con 22 IBU), la falta de disponibilidad de aminoácidos precursores, la inexistencia de condiciones ambientales favorables para la descarboxilación y/o presencia de genes silenciosos (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014; Linares et al., 2012).

En la cerveza sin inocular (control), solo se detectó putrescina (4,2 mg L<sup>-1</sup>) (Tabla 22), la cual puede estar presente de forma natural en las cervezas, proveniente de materias primas como la malta, la fermentación o el propio proceso de elaboración (Loret et al., 2005). En las cervezas inoculadas con *L. brevis* CIALBL1, se observó la producción de tiramina y putrescina (5,6 y 4,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), mientras que *L. brevis* CIALBD1, solo produjo putrescina (4,4 mg L<sup>-1</sup>). En estudios previos se encontraron concentraciones similares de estas aminas biógenas en cerveza (Almeida et al., 2012) (Kalač et al., 2002) (Poveda et al., 2017). (Geissler et al., 2016), también puntualizó que algunas cepas de *L. brevis* ocasionaban un aumento de la producción de tiramina como estrategia metabólica para sobrevivir en la cerveza. De hecho, se ha descrito que el metabolismo de las BAL es una fuente importante de aminas biógenas en cerveza (Romero et al., 2003)(Loret et al., 2005). Además, *L. brevis* también está considerado como un productor de aminas biogénicas en otras bebidas fermentadas, como la sidra (Garai et al., 2007) y el vino (Moreno-Arribas et al., 2000), siendo un riesgo potencial para la seguridad alimentaria.

Los cerveceros deben considerar que el riesgo de contaminación por las BAL no se debe solo a su actividad deteriorante, sino también a su potencial producción de aminas biógenas, que pueden provocar efectos tóxicos en individuos sensibles cuando se ingieren grandes cantidades o se inhibe el proceso de desintoxicación natural (Alvarez & Moreno-Arribas, 2014). En condiciones normales si se ingieren AB a través de los alimentos, rápidamente actuarían las monoamino-oxidasas (MAO) de la mucosa intestinal para prevenir una intoxicación (Barbieri et al., 2019). Cuando hay disfuncionalidad de estas enzimas, ya sea por problemas genéticos o la presencia de inhibidores de la MAO, como ciertos fármacos o el

etanol presente en la cerveza, es difícil restablecer los niveles normales de aminas en el organismo. En este caso, se puede ocasionar niveles de exposición potencialmente peligrosos sobre todo cuando se consumen grandes cantidades de cerveza en una sola ingesta (Poveda et al., 2017).

De forma global, según estos resultados y coincidiendo con estudios previos, *L. brevis* es la bacteria que más comúnmente ocasiona deterioro de la cerveza, por lo que se debe tener precaución en un entorno industrial sin líneas diferenciadas de elaboración de cerveza (Dysvik et al., 2020). Algunas cepas de *L. brevis* se utilizan como cultivos iniciadores para la elaboración de cerveza ácida, por su rápida producción de grandes cantidades de ácido láctico, en ese caso se debe considerar utilizar cepas de *L. brevis* sin capacidad deteriorante para evitar alteraciones de la cerveza, y sin actividad aminoácido descarboxilasa para no poner en riesgo la salud del consumidor.

El enfoque microbiológico de la cervecería artesanal debe basarse en medidas efectivas para la prevención y evitar el riesgo de la contaminación. Para ello, se debe conocer las zonas con potencial contaminación cruzada, a través de monitorizaciones microbiológicas frecuentes, así como la formación del personal e implementación de programas efectivos de limpieza y saneamiento de ambientes y equipos.

## **7.2. Herramienta de predicción de la susceptibilidad de la cerveza artesanal al crecimiento microbiano**

Hasta el momento no se dispone de ningún modelo de predicción de la susceptibilidad al deterioro bacteriano que sea aplicable en cervecería, así como no hay ninguna estrategia que asegure la ausencia total de microorganismos contaminantes como las BAL en la producción de cerveza, sin embargo, se dispone de estrategias cada vez más eficaces y avanzadas para controlarlos, entre ellas las basadas en modelados estadísticos. Para ello es esencial proporcionar escenarios lo más realistas posible del riesgo microbiano.

En este estudio se incluyeron varios microorganismos, aislados de cerveza o el entorno cervecero, con diferentes capacidades de deteriorar la cerveza y que se asemejan a la microbiota presente en las cervecerías artesanales. Los microorganismos seleccionados estuvieron mantenidos en BEB 3 durante todo el estudio, a través de pases sucesivos con la finalidad de mantenerlos viables y en condiciones que garanticen la conservación de la

capacidad de crecer a pesar de los factores de estrés, ya que el subcultivo repetido en medios inapropiados puede resultar en la pérdida de resistencia e inadaptación a crecer en cerveza.

Durante la adaptación a una bebida tipo cerveza, la reducción del tamaño celular de las tres cepas adaptadas de *L. brevis* puede tener origen en la reducción de la superficie de contacto por parte de las BAL como mecanismos de resistencia a factores más hostiles presentes en la cerveza. (Asano et al., 2007) describieron que *L. brevis* puede presentar una superficie de contacto mayor cuando se encuentran en medios enriquecidos como MRS, ya que le permite incorporar un contenido elevado de nutrientes, mientras la exposición a condiciones adversas como sustancias antimicrobianas o etanol, reducen su tamaño para mejorar el despliegue de sus mecanismos de defensa. Similares resultados han sido descritos recientemente (Y. Zhao et al., 2017).

El tiempo de incubación en BEB 3 determinado por la fase de crecimiento de la cepa, puede influir en los resultados del estudio, ya que los cultivos en fase exponencial son más susceptibles a condiciones adversas que los cultivos en fase estacionaria (Lechner et al., 2012). En la fase estacionaria las células viables desarrollan mecanismos de adaptación frente a condiciones de estrés prolongado y, además, los microorganismos en esta fase se encuentran en condiciones similares a las que presentan el entorno natural (Navarro Llorens et al., 2010). Por ello, en este estudio se determinó el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria temprana.

El tiempo para alcanzar la fase estacionaria temprana fue mayor para todas las cepas en la BEB 3, que en el medio MRS. Este mayor tiempo es esperable dado que las bebidas tipo cerveza generan condiciones de estrés para las células microbianas y previamente se ha descrito que conlleva a una extensión de sus etapas de crecimiento (Y. Zhao et al., 2017).

De los resultados de los análisis fisicoquímicos de las veinte cervezas comerciales, el contenido de alcohol en las muestras de cerveza varió de 0.3 % ABV (cerveza sin alcohol) a 12 % ABV (cerveza Bock A). Este rango de % ABV abarcó en su mayoría la escala teórica de alcohol en cerveza, cuyo valor máximo es 14 % ABV (Strong & England, 2015). Los valores de pH oscilaron entre 4,70 (cerveza IPA B) y 3,14 (cerveza Weissbier-Trigo B), de modo que los valores de pH de las cervezas más ácidas quedasen incluidos en el estudio. Se observó que las cervezas con pH de 4,06 a 4,37 no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sí, a pesar de pertenecer a diferentes estilos de cerveza. Los valores del amargor se extendieron de 10 IBU (cerveza Bock B) a 75 IBU (cerveza IPA B) abarcando casi toda la escala teórica de

amargor, ya que sólo algunos pocos estilos sobrepasan los 75 IBU (Strong & England, 2015). Tanto en los valores de las IBU como en los % YFE se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en muestras pertenecientes al mismo estilo de cerveza (Tabla 24).

Los valores fisicoquímicos de algunas cervezas artesanales estaban fuera de los rangos teóricos indicados para su estilo respectivo. Por ejemplo, la cerveza Brown ale B presentó un valor de 44 IBU, sin embargo, las cervezas Brown ale en general tienen un valor teórico de 10 – 40 IBU, y la cerveza Bock B presentó un valor de 10 IBU mientras que una cerveza Bock oscila teóricamente de 16 - 35 IBU. Esto puede deberse a que los cerveceros priorizan, en las formulaciones de la cerveza, obtener el *flavor* deseado sobre un cumplimiento estricto de los parámetros fisicoquímicos de cada estilo de cerveza (Daniels, 2000).

Respecto a los resultados de los análisis microbiológicos de un total de 35 cervezas comerciales diferentes utilizadas en este estudio (5 utilizadas para la preparación de cervezas-ajustadas, 20 analizadas para la generación del segundo grupo de datos y otras 10 para la validación externa), solo tres cervezas tenían presencia de BAL, lo que corresponde a un 8,57 %. Aunque la carga presente en las cervezas aparentemente no generó alteraciones en sus parámetros fisicoquímicos, estas cervezas potencialmente contaminadas fueron descartadas para este estudio.

De los resultados correspondientes a la evaluación de G/NG en las cervezas-ajustadas del primer grupo de datos, se observó que todas las cepas fueron capaces de crecer en los rangos de 0 - 5 % ABV, 10 - 30 IBU, pH 4,1 – 4,7, y en todos los niveles de % YFE analizados. Sin embargo, ocho cepas crecieron a pH 3,8, seis cepas a pH 3,5, seis cepas bajo niveles extremos de amargor (40 - 50 IBU), cuatro cepas crecieron en las cervezas con alto contenido de alcohol (7,5 - 10 % ABV), mientras que la cepa de levadura *Dekkera* H2 fue la única capaz de crecer en condiciones con alto contenido de alcohol y a muy bajo pH (12 % ABV y pH 3,2).

De los resultados G/NG del segundo grupo de datos y de acuerdo con los resultados de los porcentajes de los casos de crecimiento microbiano (% CCM), las cervezas más susceptibles fueron las cervezas sin alcohol A y Bock B, las cuales permitieron el crecimiento de todas las cepas inoculadas (100% CCM), mientras que ningún microorganismo pudo crecer en la cerveza Bock A (0 % CCM) probablemente debido a su mayor contenido de alcohol (12 % ABV) (Tabla 24). Por otro lado, en las cervezas altamente lupuladas cervezas IPA (~ 75 IBU) solo pudieron crecer las cepas tolerantes al lúpulo. La cepa *Dekkera* pudo crecer en todas las cervezas (excepto en la cerveza Bock A), esto puede deberse en parte a la mayor asimilación de



nutrientes en comparación con las otras cepas, ya que la mayoría de las *Dekkera* spp. tienen la capacidad de metabolizar una amplia gama de azúcares, incluyendo dextrinas, que constituyen la mayor parte del contenido de azúcar residual en la cerveza (Steensels et al., 2015).

Como era de esperar, la cerveza sin alcohol A tuvo 100 % CCM debido a sus parámetros fisicoquímicos: graduación alcohólica muy baja (0,3 % ABV), un valor de pH que permite el crecimiento de varios microorganismos (pH = 4,22), una concentración baja de iso- $\alpha$ -ácidos (11 IBU, y el valor más alto de extracto fermentable (2,37 % YFE). En el caso de las cervezas de trigo, se observó un menor % CCM en la cerveza Weissbier-Trigo B a pesar de tener menor contenido de alcohol y de iso- $\alpha$ -ácidos, así como un mayor valor de extracto fermentable que la cerveza de Trigo A, lo que sugiere que el efecto inhibitor del crecimiento pudo deberse al bajo valor de pH (pH = 3.14). Un efecto similar del pH bajo se observó en las Brown ale, donde la cerveza Brown ale A presentó un menor % CCM que la cerveza Brown ale B, a pesar de que la primera tenía un menor contenido de alcohol e IBU. También se observaron diferencias significativas en los % CCM entre cervezas del mismo estilo, excepto para el estilo IPA (74 - 75 IBU), ya que en estas cervezas solo crecieron los microorganismos más resistentes al lúpulo, que a su vez son los principales agentes contaminantes en cerveza.

En el desarrollo del modelo la asignación de niveles dicotómicos (G/NG = 1/0) fue muy útil y permitió crear una herramienta para predecir la probabilidad de crecimiento de microorganismos en la cerveza. Los resultados del diagnóstico de multicolinealidad confirmaron que no existía multicolinealidad entre las variables independientes y se podía utilizar el modelo de regresión logística, ya que la multicolinealidad provoca inestabilidad al calcular los predictores individuales del modelo.

Respecto a los parámetros estadísticos de bondad de ajuste, la prueba ómnibus de coeficientes de modelo indicó que las variables independientes (parámetros fisicoquímicos) sí permiten predecir la variable dependiente (crecimiento de microorganismos en la cerveza) y que el modelo es estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). El valor  $R^2$  de Nagelkerke (0,41) indicó que el modelo solo explica el 41 % de la varianza en la susceptibilidad al crecimiento microbiano. Debido a que este valor por sí solo no permite tener una idea completa del ajuste del modelo, se realizó la prueba de HL, cuya hipótesis nula plantea que el modelo se ajusta a la realidad, es decir que los valores predichos coinciden con los observados. Como se observa en la Tabla 27 se obtuvo un valor de  $p \geq 0,05$  (0,133) por lo que se acepta la hipótesis nula y se puede considerar que el modelo presenta un nivel de ajuste adecuado.

Además, la prueba  $\chi^2$  de Wald confirmó que las variables independientes (pH, % ABV e IBU) contribuyen significativamente a la predicción de la variable dependiente (G/NG), por lo que puede generalizarse a una población ( $p < 0,05$ ). El valor de Odd ratio (OR) para el pH no sólo fue  $> 1$  sino que tiene un alto valor (23,58), lo que confiere al pH la mayor influencia en el crecimiento de los microorganismos que los valores de alcohol y amargor ( $OR < 1$ ). Esto indica que un aumento en el valor de esta variable podría incrementar el riesgo de crecimiento microbiano en la cerveza, es decir cuanto más alto es el pH mayor es la susceptibilidad de la cerveza, mientras que un aumento de las IBU o % ABV reduce la susceptibilidad de la cerveza al deterioro microbiano.

Esta menor influencia del % ABV e IBU respecto al pH, puede estar relacionada con la alta tolerancia de *Lactobacillus* spp. al contenido en alcohol e iso- $\alpha$ -ácidos. Por el contrario, las cepas de este género no pudieron crecer a pH bajos a pesar de tener cierta habilidad para regular su pH intracelular cuando se encuentra en condiciones ácidas. Además, esta ausencia de crecimiento puede deberse al efecto sinérgico de los pH bajos con la actividad antimicrobiana de los iso- $\alpha$ -ácidos, ya que se ha descrito que pequeños descensos del pH en la cerveza (de 4,4 a 4,2) inducen un aumento de más del 50 % en la actividad antibacteriana de los compuestos amargos derivados del lúpulo (Simpson & Hammond, 1991; Simpson & Smith, 1992). (Menz et al., 2011), también encontraron que reducciones del pH de 4,3 a 4,0 limitaba el crecimiento de patógenos en cervezas sin alcohol, así como en cervezas con mayor contenido de etanol, que poseen una mayor estabilidad contra el deterioro microbiano (Menz et al., 2011).

El hecho de que los valores de pH bajos tuvieran un gran impacto en el efecto inhibitorio también es consistente con estudios previos basados en análisis estadísticos o en modelos de regresión. De esta forma, (Fernandez & Simpson, 1995), describieron que una disminución del pH de la cerveza afecta significativamente el crecimiento de las BAL, y (Uljas et al., 2001) concluyeron que el pH era el factor más importante para reducir las poblaciones de *E. coli* en la sidra de manzana. Además, en tres modelos diferentes realizadas en bebidas refrigeradas, se determinó que el valor del pH era estadísticamente significativo cuando se estudió su deterioro por mohos, levaduras o bacterias (Battey et al., 2001, 2002; Battey & Schaffner, 2001).

Según los datos que evalúa la distribución de los valores observados y predichos con un nivel de confianza del 95 %, Tabla de Clasificación (Tabla 28), la probabilidad de acertar el resultado G/NG cuando se conoce los factores intrínsecos de la cerveza (pH, % ABV e IBU) es

83,4 %, evidenciando una adecuada predicción, ya que las pruebas con alta sensibilidad robustecen las pruebas de tipo diagnósticas (Bernard-Morell E., 2014). En este sentido el modelo presentó un 87 % de sensibilidad y un valor de VPP (91,4 %) mayor que el VPN (60,5 %). Puesto que los VPP permitirían conocer la probabilidad de una cerveza que ha sido clasificada como susceptible al crecimiento microbiano cumpla con esta condición; y mediante los VPN conocer cuál es la probabilidad de acierto en aquellas cervezas que no han sido consideradas susceptibles (Bernard-Morell E., 2014), el método permitiría clasificar correctamente el 91,4 % de las susceptibles, por tanto, reducir los riesgos desde el punto de vista de seguridad alimentaria y evitar pérdidas económicas predecibles, con la toma de decisiones al poner en cuarentena o rechazar un lote de producto sin contaminación.

La expresión funcional de la ecuación del modelo de regresión logística binaria, indica que los factores de pH, % ABV e IBU son los que tienen un gran impacto en la predicción del crecimiento microbiano. Este es un modelo sencillo, que con solo la evaluación de tres parámetros permite describir adecuadamente el límite G/NG de los microorganismos en las cervezas artesanales, por lo que sería de fácil uso e implementación por los cerveceros.

Respecto a los gráficos de contorno, que visualizan la probabilidad de crecimiento microbiano en función del % ABV e IBU (Figura 30) se observa que la probabilidad es mayor en los niveles de IBU y % ABV más bajos, y que disminuye a medida que aumenta el % ABV. La probabilidad de crecimiento microbiano en función del pH y % ABV (Figura 31) muestra que a medida que el pH disminuye, el porcentaje de crecimiento disminuye, incluso en los niveles más bajos de % ABV, lo que indica que la probabilidad de crecimiento sería más baja en cervezas ácidas (valores de pH alrededor de 3,50), respecto a la mayoría de los estilos de cerveza (pH de 4,1 a 4,5). Asimismo, el efecto del pH en función de la IBU sobre el crecimiento microbiano (Figura 32) muestra que a medida que el pH disminuye, y a pesar de estar en los niveles más bajos de IBU, el porcentaje de crecimiento microbiano disminuye. Estos resultados de secciones transversales de las interfaces G/NG confirman que el modelo presentó un buen ajuste con los datos observados ya que las observaciones de crecimiento se han clasificado correctamente.

En concordancia a lo expuesto anteriormente, la Figura 33a muestra que a pH bajos la probabilidad de crecimiento es baja, incluso a bajos niveles de alcohol y que son necesarias concentraciones muy altas de alcohol (> 10 %) para producir una disminución del 50 % en la probabilidad de crecimiento a los pH más altos. De igual modo, en la Figura 33b se observa que, pequeñas transiciones en los valores de pH, casi independientemente del contenido de

alcohol, producen fuertes efectos sobre la probabilidad de crecimiento. Teniendo en cuenta que estos parámetros fisicoquímicos, se monitorizan lote a lote, durante la elaboración de cerveza artesanal, el crecimiento de microorganismos indeseables se puede controlar principalmente reduciendo el pH de la cerveza y, en menor medida, aumentando el % ABV. Además, la IBU debe considerarse un factor de influencia menor, ya que muchos microorganismos que deterioran la cerveza son resistentes a los antimicrobianos provenientes del lúpulo.

En la validación externa del modelo se utilizó un conjunto de pruebas y datos adicionales a los ya empleados en la construcción del modelo, siendo ésta una forma eficaz de evaluar la capacidad predictiva de un modelo (Consonni et al., 2010) cuyas transiciones en los valores de pH, casi independientemente del contenido de alcohol, producen fuertes efectos sobre la probabilidad de crecimiento. Teniendo en cuenta que estos parámetros fisicoquímicos, se monitorizan lote a lote, durante la elaboración de cerveza artesanal, el crecimiento de microorganismos indeseables se puede controlar principalmente reduciendo el pH de la cerveza y, en menor medida, aumentando el % ABV. Además, la IBU debe considerarse un factor de influencia menor, ya que muchos microorganismos que deterioran la cerveza son resistentes a los antimicrobianos provenientes del lúpulo.

El modelo desarrollado predijo correctamente el crecimiento microbiano observado en las cervezas (100 %), a pesar de que cada cerveza tiene una matriz compleja y que se utilizaron diferentes cepas inoculadas individualmente.

### **7.3. Selección y aplicación de levaduras no-*Saccharomyces* como levaduras fermentativas en monocultivo para la elaboración de cerveza artesanal**

La levadura y el tipo de fermentación utilizado para la elaboración de la cerveza permite diferenciar la calidad y características sensoriales de la cerveza, un alimento elaborado con cuatro ingredientes básicos (malta, agua, levadura y lúpulo). Actualmente, el uso de levaduras no-*Saccharomyces*, como alternativa a las cepas de *Saccharomyces* convencionales, es una forma de responder a nuevos patrones de consumo y a nichos de mercado que demandan una mayor diversidad de cervezas, nuevos estilos con *flavor* mejorados, y destacando la producción de la cerveza artesanal, así como cervezas sin alcohol con una mayor aceptación sensorial. Por ello, el objetivo de este estudio fue seleccionar cepas de levadura no-*Saccharomyces* con uso potencial como levadura fermentativa en monocultivo para la

---

producción de cerveza, debido al gran potencial enzimático de estas levaduras, relacionado directamente con la producción de compuestos volátiles.

La fermentación con monocultivos se realiza de manera habitual en cervecerías ya que permite la reutilización de la levadura recolectada, mientras que la co-fermentación o la fermentación secuencial no son prácticas convenientes para la elaboración de cerveza. Puesto que la maltosa es el azúcar más abundante en el mosto cervecero (50 – 60 %), inicialmente se evaluó la fermentación de maltosa como primer atributo a analizar en el cribado de levaduras. De las 141 cepas seleccionadas, un porcentaje notable de las levaduras (20 %) tuvieron la capacidad de fermentar este azúcar, ya que levaduras no domesticadas comúnmente no asimilan azúcares como la maltosa o la maltotriosa.

En la primera etapa de caracterización de las levaduras con capacidad de fermentar maltosa (n = 28), los ensayos se enfocaron en evaluar la producción de sustancias relacionadas con sabores y olores desagradables (*off-flavors*) en las fermentaciones a escala de laboratorio como el H<sub>2</sub>S, compuestos fenólicos simples y otros compuestos perceptibles. El sulfuro de hidrógeno es un gas con olor a huevo podrido y, aunque se volatiliza con relativa rapidez, se considera como un volátil indeseable porque posee un alto poder para enmascarar aromas deseables en la cerveza (Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016). También, el H<sub>2</sub>S está asociado con contaminaciones por bacterias que deterioran la cerveza, como *Pectinatus* sp. (Rodríguez-Saavedra, González de Llano, et al., 2021).

Dado que algunas levaduras pueden producir compuestos fenólicos odorantes (POF, del inglés *phenolics-off-flavor*), los cuales se producen por descarboxilación o posterior reducción de los ácidos ferúlico, cumárico y cinámico provenientes de la malta (Vanbeneden et al., 2008), se realizaron pruebas para determinar su producción. Los resultados (Tabla 36) revelaron que las cepas de levadura POF+ produjeron aromas a clavo, fenol y picante, principalmente por las cepas de *Wickerhamomyces anomalus*, mientras que todas las cepas de *T. delbrueckii* y ambas cepas de *L. thermotolerans* fueron POF-. La presencia de olor a clavo se acepta en algunos estilos de cerveza, como las de trigo de Alemania (Weissbier, Weisenbock) y las belgas (IPA, Dubbel, Tripel) (Strong & England, 2015), por lo que en este cribado no se consideró su producción como una característica indeseable, pero sí se rechazaron los aromas como los fenólicos, a establo y a espuma de poliestireno. Todos los resultados POF+ obtenidos por el método espectrofotométrico se correlacionaron con los resultados olfativos del panel de cata.

Para comparar el comportamiento de diferentes cepas de levadura, el uso de extracto de malta concentrado aseguró la realización de fermentaciones a escala de laboratorio con un mosto estandarizado. En cuanto a la evaluación del aroma en las fermentaciones, la mayoría de las cepas de *T. delbrueckii* produjeron compuestos con aromas agradables y afrutados, excepto dos cepas de *T. delbrueckii* (CIAL22 y CIAL36) que produjeron ligeras notas sulfurosas. La mayoría de las cepas de *W. anomalus* y *S. pombe* fueron responsables de olores desagradables, a disolvente y sulfuroso, respectivamente. Una de las cepas de *S. pombe* y la única cepa de *Zygosaccharomyces fermentati* revelaron notas afrutadas y especiadas, pero esta última cepa también produjo notas sulfurosas. En cuanto al sabor, dos cepas de *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34) produjeron sabores predominantemente afrutados. La cepa *L. thermotolerans* CIAL37 produjo un agradable carácter afrutado y *sour*, mientras que *L. thermotolerans* NOO32 generó un aroma agradable con olor afrutado y vinoso que produjo un agradable carácter *sour* más intenso. La diferencia entre las dos cepas confirmó la variabilidad que existe entre cepas de la misma especie. En consecuencia y en base a los resultados de la primera caracterización de levaduras, para continuar con el cribado se seleccionaron las últimas dos cepas de *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34) y dos de *L. thermotolerans* (CIAL37 y NOO32) que producían mejores características sensoriales.

Respecto a la segunda caracterización, las curvas de crecimiento durante la asimilación de azúcares por parte de las cuatro levaduras (Figura 38) mostraron un metabolismo ligeramente más bajo en presencia de maltosa ya que el crecimiento aumentó dentro de las primeras 24 horas, mientras que para los otros tres azúcares fue dentro de las primeras 16 horas. Estos resultados indican que las cuatro cepas de levadura son capaces de sintetizar las enzimas invertasa y maltasa, así como las permeasas para la maltosa, pero no sintetizan la permeasa para la maltotriosa (Cousseau et al., 2013), lo que las hace incapaces de fermentar maltotriosa, el segundo azúcar más abundante del mosto cervecero. Aunque la capacidad de fermentación de la maltotriosa es deseable en términos de minimizar la pérdida del valor de extracto del mosto, la imposibilidad de fermentarla puede ser una característica útil para la producción de una cerveza estándar o con niveles de alcohol reducido. La lactosa es un azúcar que no está presente en el mosto cervecero, sin embargo, se utiliza como aditivo en las cervecerías artesanales para aumentar el dulzor residual o equilibrar la acidez en algunos estilos de cerveza, aunque su aporte en dulzor sea relativamente bajo. En este estudio, ninguna de las cepas de levadura pudo fermentar la lactosa, por lo que se puede usar lactosa con estos fines cuando se utilice cualquiera de estas levaduras.

Las levaduras deben poder crecer y fermentar en presencia de iso- $\alpha$ -ácidos (1 ppm de iso- $\alpha$ -ácido = 1 IBU) y tolerar el etanol además de producirlo. Los valores de IBU varían según el estilo de cerveza, encontrándose los valores más bajos en las cervezas de trigo (~15 IBU), mientras que los más altos en las cervezas altamente lupuladas como Imperial IPA (~100 IBU) (Strong & England, 2015). En las Figuras 39A las curvas de crecimiento apenas se vieron afectadas por el aumento de iso- $\alpha$ -ácidos; mientras que el incremento al 5 % de etanol afectó ligeramente las curvas de crecimiento, por lo que la prueba de resistencia cruzada etanol-lúpulo implicó en una fase adaptativa ligeramente más larga, así como una pendiente de la fase logarítmica ligeramente más baja, en comparación con la curva de crecimiento en mosto a 45 IBU en ausencia de etanol. En consecuencia, todas las cepas pudieron crecer en presencia de etanol hasta 5 % ABV y a altas concentraciones de iso- $\alpha$ -ácidos (90 IBU), por lo que pueden usarse como inóculos-monocultivo en fermentaciones primarias en un amplio rango de IBU.

En las cervecerías artesanales usualmente se realizan fermentaciones secundarias o acondicionamiento en botella, por ello, para evaluar la posibilidad de uso de estas levaduras en estos casos, se estudió su crecimiento en cerveza verde con glucosa. En términos de resistencia cruzada, el crecimiento de las cepas de *T. delbrueckii* CIAL29 y CIAL34 en cerveza verde con 10 % ABV presentó prolongaciones considerables de la fase adaptativa, así como una menor pendiente de la fase logarítmica (Figuras 39B), independientemente de los valores de IBU. Con respecto a las cepas de *L. thermotolerans* CIAL37 y NOO32, ninguna de ellas fue capaz de crecer en cerveza verde con 10 % ABV. Según estos resultados, las cepas de *T. delbrueckii* son capaces de post-fermentar cerveza verde con un contenido de alcohol hasta 10 % ABV, mientras que las cepas de *L. thermotolerans* hasta un 5 % ABV, incluso en presencia de un alto contenido de iso- $\alpha$ -ácidos para ambos géneros.

La hidrólisis enzimática de precursores del *flavor*, como los compuestos glucosilados, mejora la calidad organoléptica de la cerveza. Así, la enzima  $\beta$ -glucosidasa cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de compuestos no aromáticos (presentes en el lúpulo) para liberar un aceite aromático (monoterpeno). Algunas especies de levaduras que tienen esta actividad contribuyen con un aroma floral al *flavor* de la cerveza (Daenen et al., 2007). Aunque la actividad  $\beta$ -glucosidasa de las levaduras en estudio no fue intensa, los resultados obtenidos son favorables y prometedores, sin embargo, se requieren más estudios al respecto, ya que esta enzima también está presente en las levaduras típicas de cerveza, incluso a niveles altos; pero su ubicación principalmente dentro de la célula sugiere que probablemente no cataliza la hidrólisis de los  $\beta$ -glucósidos que se encuentran en el mosto (Kanauchi & Bamforth, 2012).

La floculación es un requisito previo para la sedimentación masiva de la levadura durante la fermentación (Vidgren & Londesborough, 2011). Los resultados de la prueba de floculación mostraron que ambas cepas de *L. thermotolerans* (CIAL37 y NOO32) pueden considerarse levaduras muy floculantes (87 % y 90 %, respectivamente), siendo comparables a las levaduras cerveceras, que se pueden recolectar y reutilizar. Recientemente, (Bellut, Michel, Hutzler, et al., 2019) también encontraron un valor alto de floculación para una cepa de *Lachancea fermentati* (84 %). Por otro lado, ambas cepas de *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34) pueden considerarse levaduras floculantes moderadas (47 % y 49 % respectivamente).

Para determinar qué tan rápido se han asimilado los azúcares por las células de levadura, se evaluó el rendimiento fermentativo en mosto a través de la pérdida de peso por emisión del CO<sub>2</sub> producido. Los resultados de atenuación de las levaduras fueron del 41 - 44 % (Tabla 30), que corresponde a casi la mitad del valor para una levadura comercial *S. cerevisiae* (80 %, aproximadamente) e indican rendimientos de fermentación intermedios, debido principalmente a sus incapacidades para fermentar maltotriosa. De manera similar, (Osburn et al., 2018) describieron un valor de atenuación del 40 % para una cepa de *L. thermotolerans*. Esta característica permite la producción de cervezas con baja y media graduación alcohólica, pero dependiendo de la composición del mosto, ya que se puede agregar adjuntos cerveceros ricos en glucosa, fructosa o sacarosa, como la caña de azúcar, jugos de frutas o jarabe de maíz con la finalidad de incrementar la producción de alcohol.

Los bajos valores de pH (Tabla 30) observados al final de la fermentación con las cepas de *L. thermotolerans* (CIAL37 y NOO32), sugieren que poseen una característica de bioacidificación adecuada, la cual es útil para la producción de cervezas *sour*, haciendo innecesaria la adición de bacterias ácido-lácticas (BAL) para la producción de acidez y evitando riesgos de contaminación. Además, cuando se usan las BAL para acidificar el mosto, se tiene que minimizar la adición de lúpulo durante el hervido, ya que muchas BAL son sensibles a los iso- $\alpha$ -ácidos del lúpulo. Con el uso de estas cepas, no existiría tal limitación ya que pueden crecer a altas concentraciones de iso- $\alpha$ -ácidos. De los datos de las cinéticas de fermentación de las cepas de *T. delbrueckii* (CIAL29 y CIAL34), se concluye que estas cepas podrían ser utilizadas para elaborar un abanico más amplio de estilos cerveceros, principalmente aquellos donde predomine o se requiera aromas frutales. Los parámetros de la cinética de fermentación de *L. thermotolerans* CIAL37 no presentaron diferencias significativas entre ambas temperaturas de fermentación, así como en sus características sensoriales. Por ello, aunque las cuatro presentaron características adecuadas para su uso en cervecería, se



seleccionó *L. thermotolerans* CIAL37 para elaborar un lote de cervezas una única cepa, puesto que era la que destacaba sensorialmente.

Con el fin de evaluar su potencial cervecero, el siguiente paso fue propagar la cepa seleccionada *L. thermotolerans* CIAL37. El principal objetivo de una propagación es obtener una gran cantidad de levadura con una alta calidad de biomasa (buena viabilidad y vitalidad) (Hutzler et al., 2015). La viabilidad alcanzada, tanto en las fases de propagación como de inoculación fue del 99,8 % evidenciando que la levadura se mantuvo en buenas condiciones. Con el fin de producir una cerveza con un *bioflavour* distintivo e innovador, se seleccionó el extracto de mosto Belgian Saison, de cebada y trigo malteados, moderadamente lupulado (20 IBU), para garantizar condiciones estandarizadas y evitar cualquier interferencia del lúpulo con el *flavor* producido específicamente por la levadura. Además, la malta de trigo puede añadir un sabor algo dulce a la cerveza, y ayudar a balancear el sabor cítrico o la acidez producida por la cepa seleccionada y mejorar la complejidad del carácter de la malta perfeccionando el *flavor*.

Durante la fermentación, se controló la evolución del extracto y del pH (Figura 42). El valor del pH del mosto (pH=5,68) decreció rápidamente a pH < 4,0 en las primeras 48 horas, lo que generó un ambiente más hostil para el crecimiento de microorganismos deteriorantes (Rodríguez-Saavedra, Pérez-Revelo, et al., 2021), este hecho es de especial interés para las cervecerías artesanales donde la susceptibilidad al deterioro microbiano es mayor, como se menciona previamente (Capítulo I y II de esta Tesis Doctoral) ya que la cerveza artesanal no se pasteuriza (Rodríguez-Saavedra et al., 2020). Estos resultados son consistentes con la capacidad que tiene esta especie de levadura para disminuir el pH a través de la producción de ácido láctico, lo que puede afectar tanto el sabor como la sensación en la boca (Domizio et al., 2016). Como era de esperar, se observó una bajada lenta de extracto, hasta 6,5 °P en el día 14, lo que indica que la levadura no logró atenuar completamente al mosto. El valor de atenuación fue del 44,9 % como consecuencia de la incapacidad de la levadura para fermentar completamente la maltotriosa, produciendo un contenido alcohólico de  $2,6 \pm 0,2$  % ABV al final de la primera fermentación (14 días), y de  $4,54 \pm 0,2$  % ABV al final de la segunda fermentación un (24 días), un valor similar a la encontrada en una cerveza promedio. El tiempo de fermentación de 14 días de fermentación fue suficiente para completar toda la fermentación primaria, ya que se observaron valores casi constantes a finalizar la fermentación (Figura 42). Este tiempo de duración es similar al de las cepas comerciales de *Saccharomyces*, lo cual es relevante para la potencial aplicación de esta levadura a nivel

industrial, donde el proceso de fermentación no debe exceder los 15 días para evitar altos costos de producción.

En concordancia con los valores altos de floculación de la cepa, después de cada fermentación, primaria y secundaria, se observó un buen aclaramiento del líquido de la cerveza, separándose bien tanto en los fermentadores como en la botella, lo que permite una fácil recuperación y manejo de la levadura, ahorrando dinero, espacio y tiempo a la cervecería.

Teniendo en cuenta que los alcoholes superiores y ésteres producidos por una levadura son cruciales para las características organolépticas y calidad final de la cerveza (Y. He et al., 2014), en este estudio se encontró que *L. thermotolerans* CIAL37 producía una gran variedad de estos compuestos con atributos sensoriales deseables. Entre ellos el alcohol isobutírico (que contribuye con el aroma de manzana), alcohol isoamílico (plátano), aldehído isovalérico (almendra), isobutanoato de etilo (fresa, fruta tropical), butanoato de etilo (fruta verde, piña) y hexanoato de etilo (manzana, fruta madura) estaban por encima del umbral de percepción del olor. De acuerdo con sus respectivos Valores de Actividad de Aroma (VAO), estos compuestos serían los responsables del distinguible y fácilmente reconocible *flavor* afrutado de la cerveza, pero no demasiado marcado.

Los compuestos como el alcohol feniletílico (dulce, miel y floral), acetato de isoamilo (plátano) y propionato de etilo (piña) estuvieron por encima del umbral del olor, y contribuyeron con olores muy débiles y apenas reconocibles. Otros compuestos como el isohexanol (afrutado), heptanal (afrutado), acetato de propilo (pera), acetato de amilo activo (cáscara de manzana), propionato de isoamilo (albaricoque, piña), 2-heptanona (plátano), piruvato de etilo (ron, caramelo), se detectaron en la cerveza, por debajo del umbral de olor, éstos pueden actuar en sinergia con otros compuestos, influyendo en el *flavor* final de la cerveza, tal como se ha descrito (Sterckx et al., 2011).

Es de destacar que no se detectaron compuestos aromáticos indeseables como acetaldehído o diacetilo durante la evaluación sensorial en consistencia con los resultados analíticos de los compuestos volátiles por GC-MS. El diacetilo, conocido por su aroma a mantequilla, estuvo por debajo del nivel de detección de  $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en las tres cervezas analizadas, descartando una posible floculación prematura (Vidgren & Londesborough, 2011). Los resultados del análisis de volátiles por GC-MS corroboraron los resultados obtenidos por los jueces en el análisis sensorial.

Los resultados del análisis olfativo (Figura 43A), revelaron un bouquet particularmente pronunciado y con énfasis a notas afrutadas/ésteres y afrutadas/cítricas, y a su vez los jueces describieron un olor afrutado con aromas similares a limón (30 %), lima (30 %), melocotón (20 %) y manzana roja (20 %). Por el contrario, ningún juez detectó defectos marcados en el aroma, ni sulfuros o diacetilo. Otros descriptores que destacaron en la cerveza elaborada con *L. thermotolerans* CIAL37 fueron su alta complejidad y buen equilibrio aromático.

Respecto a los resultados del análisis gustativo, la Figura 43B mostró una tendencia a un fuerte sabor *sour*, cítrico y afrutado (con notas de manzana, pera y maracuyá). Esto se relaciona con que *L. thermotolerans* CIAL37 produjo ácidos orgánicos, mayoritariamente ácido láctico, mientras que en menor cantidad ácido acético, por lo que predominó el carácter *sour* (*sourness*) sobre el ácido (*acidity*) en la cerveza, de forma análoga a los resultados sensoriales obtenidos por el panel de jueces. De manera excepcional esta cepa produjo cantidades de ácido cítrico que superaron el umbral de percepción en cerveza, lo que acentúa el carácter cítrico de la cerveza, resultando en un sabor agradable. La producción de ácido láctico es una característica para destacar en esta especie, pero existe una diversidad fenotípica notable entre sus cepas en cuanto a su capacidad de producción (Gatto et al., 2020). Cabe mencionar que en el vino esta especie ha producido cantidades de hasta 9,6 g L<sup>-1</sup> (Kapsopoulou et al., 2005). La producción de ácido láctico, que se realiza a partir de azúcares, explica la baja concentración de alcohol encontrada en la cerveza al finalizar los 14 días de fermentación, así mismo los 2,38 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico, se encuentra dentro del rango de las cervezas *sour*. A modo de comparación, la concentración de ácido láctico puede oscilar entre el 1,9 y el 8,9 g L<sup>-1</sup> en cervezas *sour* comerciales (Tipler et al., 2015), en las cervezas *gueuze* entre 1,50 y 3,50 g L<sup>-1</sup> y en las *lambics* puede llegar hasta 12,73 g L<sup>-1</sup>, mientras que las típicas *lagers* americanas tienden a tener concentraciones mucho más bajas, alrededor de 0,04 a 0,15 g L<sup>-1</sup> (Thompson Witrick et al., 2017).

Otro aspecto importante en esta especie es su capacidad de producir cantidades elevadas de glicerol de hasta 9,29 g L<sup>-1</sup> (Hranilovic et al., 2018; Zdaniewicz et al., 2020), contribuyendo a la sensación en boca (*mouthfeel*), cuerpo de la cerveza y a la plenitud de paladar (*palate fullness*) (Seo et al., 2020). Sin embargo, la producción de glicerol por *L. thermotolerans* CIAL37 es la que usualmente se encuentra en cervezas y concuerda con (Sheppard et al., 2021), que describieron concentraciones de 1,5 a 2,9 g L<sup>-1</sup> dependiendo del extracto original del mosto. Esta cantidad de glicerol, junto a la alta floculación de la levadura, y a la presencia de los ácidos orgánicos en la cerveza que contrarresta la dulzura de los

azúcares residuales del mosto, dan como resultado una cerveza fácil de beber, con un sabor *sour* complejo y a la vez equilibrado. Como se esperaba, *L. thermotolerans* CIAL37 consumió prácticamente los dos principales monosacáridos del mosto, la glucosa añadida para la fermentación secundaria, así como a la sacarosa del mosto, en concordancia con los resultados de la asimilación y fermentación de azúcares de la sección 5.3.3.1. Aunque la maltotriosa permaneció sin fermentar, esto no significa que la cerveza fuera dulce, ya que la dulzura de la maltotriosa es solo alrededor del 17 % de la sacarosa (Takasaki et al., 1991). Además, en general, los azúcares residuales compuestos principalmente por maltosa y maltotriosa no contribuyen en gran medida a la dulzura percibida de la cerveza (Esslinger, 2009).

La concentración de FAN en la cerveza terminada estuvo del dentro del rango aceptable (10 - 120 mg L<sup>-1</sup>), según el compendio de análisis en cervecería, MEBAK, (Jacob, 2012). La concentración determinada muestra que la levadura ha utilizado una gran cantidad de nitrógeno para generar proteínas que apoyan el crecimiento de la biomasa y crear compuestos volátiles como alcoholes superiores y ésteres. Mantener los niveles de FAN hacia valores bajos es positivo desde el punto de vista de la estabilidad del *flavor* de la cerveza, ya que un FAN alto puede conducir a una mayor producción de sabores extraños y, por lo tanto, a una menor estabilidad del *flavor* (Jaskula-Goiris et al., 2011).

Otros aspectos para destacar de la cerveza elaborada con la levadura seleccionada fueron la buena integración del alcohol producido en el aroma y sabor de la cerveza, su buena carbonatación y claridad, así como su espuma estable y persistente, ya que son características muy importantes en la aceptación y calidad de la cerveza.

La cepa de levadura *L. thermotolerans* CIAL 37 presentó aptitudes para ser utilizada en cervecería, ya que se puede utilizar para elaborar estilos de cerveza con un perfil sensorial distintivo e innovador en sabores y aromas, y con contenido de etanol relativamente bajo o moderado. Este hecho, es de gran interés en el sector cervecero debido al contenido relativamente más alto de etanol en la mayoría de las cervezas artesanales, en comparación con la *lager* industrial, y a que la tendencia actual es hacia un mayor consumo y producción de cerveza sin alcohol con el fin de evitar problemas relacionados con la salud y por el endurecimiento de la reglamentación con nuevas leyes que promueven la reducción del consumo de alcohol, para conducir. Por otra parte, su capacidad de producir cantidades notables de ácido láctico y cítrico, así como compuestos con impacto en el aroma y sabor afrutado potencia su aplicación industrial y para elaborar nuevas cervezas artesanales con un

peculiar y agradable *flavor sour* como respuesta a la alta competencia en el mercado cervecero.

#### **7.4. Impacto de la digestión gastrointestinal de la cerveza en la función y salud intestinal**

En la literatura, existen algunos estudios acerca de los efectos de los componentes de la cerveza sobre la microbiota intestinal, pero apenas existen trabajos enfocados en analizar el impacto de la cerveza como producto, sobre este ecosistema microbiano. En la presente Tesis Doctoral se ha abordado este objetivo estudiando el efecto de tres cervezas comerciales sobre la microbiota intestinal humana. Para ello, se seleccionaron: una cerveza comercial industrial Märzen Doble malta, por su alto contenido de fibra dietética soluble ( $2,02 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ ) (Goñi et al., 2009), compuestos fenólicos totales ( $\sim 550 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Saura et al., 2003) y alta capacidad antioxidante (respecto a otras varias cervezas comerciales) (Martínez A., 2015); una cerveza artesanal Indian Pale Ale (IPA) por su alto contenido de compuestos derivados del lúpulo como los iso- $\alpha$ -ácidos; y una cerveza artesanal del estilo Brown ale con bajo contenido de iso- $\alpha$ -ácidos, para poder comparar su efecto con la anterior. Se simuló las condiciones fisiológicas presentes en el tracto digestivo humano, utilizando el SIMulador GastroIntestinal dinámico simgi<sup>®</sup>, lo que nos permitió monitorizar la digestión de los tres tipos de cerveza y obtener los digeridos a nivel del intestino delgado, y posteriormente se realizaron fermentaciones colónicas en estático para evaluar los posibles cambios en la microbiota y en la actividad metabólica en respuesta a la presencia de los digeridos de las cervezas de estudio.

Como se ha enfatizado en la introducción, los polifenoles (derivados de la malta y el lúpulo), las melanoidinas y la fibra, componentes bioactivos de la cerveza, logran mayoritariamente alcanzar el intestino grueso sin haber sufrido modificaciones en su estructura. Es a este nivel cuando entran en juego las bacterias intestinales, en gran parte responsables de su metabolismo, e incluso se ha descrito una interacción recíproca o bidireccional entre algunos compuestos, como los polifenoles, y la microbiota colónica (Cueva et al., 2017; Z. Liu et al., 2020; Teixeira et al., 2018) La microbiota transforma estos compuestos en metabolitos más bioaccesibles a su vez, los metabolitos microbianos son capaces de modular la microbiota intestinal promoviendo o inhibiendo el crecimiento de determinadas bacterias o grupos bacterianos (Belda et al., 2021; Kemperman et al., 2010).

Los resultados de recuentos de las poblaciones microbianas viables y cultivables de las fermentaciones colónicas en presencia de los digeridos intestinales de la cerveza (IDB) y en comparación con la muestra control, mostraron una disminución de diversos grupos

bacterianos relacionados con una actividad patógena y un efecto negativo en la salud del huésped, destacando *Staphylococcus* spp., enterobacterias y enterococos (Krawczyk et al., 2021; Mizutani et al., 2021; Rasigade & Vandenesch, 2014); así como un mantenimiento de grupos bacterianos con efectos beneficiosos en la salud, como los lactobacilos y las bacterias lácticas (Claesson et al., 2007; Mathur et al., 2020). Además, los IDB Doble malta y Brown ale, promovieron una disminución de miembros del género *Clostridium* spp., grupo al que pertenecen ciertas especies relacionadas con episodios de diarreas y otras afecciones intestinales en el huésped (Lim et al., 2020).

Respecto a la metagenómica filogenética, en primer lugar, se evaluó la  $\alpha$  y  $\beta$  diversidad, para determinar si la presencia de los IDB inducía cambios en las mismas. Los índices de Shannon para todos los digeridos y los tiempos ensayados fueron mayores a 3 y a la vez, los valores de los índices de diversidad de Simpson estuvieron próximos a 1, mostrando que se mantuvo una buena  $\alpha$ -diversidad en especies durante todo el estudio. Los resultados revelaron un incremento importante de la  $\alpha$ -diversidad en presencia del IDB Doble malta durante las primeras 24 h, detectándose un incremento también en este tiempo en presencia del IDB Brown Ale. Esto podría deberse al alto contenido en fibra presente en los estilos de cerveza Doble malta y Brown Ale (Martínez A., 2015), sumado a su contenido en polifenoles, que podrían favorecer el crecimiento de algunos grupos microbianos beneficiosos y promover una mayor diversidad bacteriana. En este sentido, se sabe que una dieta rica en fibra y compuestos polifenólicos se asocia con una mayor diversidad microbiana (Dueñas et al., 2015; Makki et al., 2018). Por el contrario, se observó una disminución en este parámetro en presencia del IDB IPA, que podría deberse a su alto contenido en iso- $\alpha$ -ácidos procedentes del lúpulo (74 IBU), conocidos por su gran potencial antimicrobiano, especialmente frente a bacterias Gram positivas (Cermak et al., 2017; Michiu et al., 2019). Estos solo favorecerían el crecimiento o supervivencia de aquellos grupos bacterianos capaces de sobrevivir en presencia de estos compuestos, derivando así en una menor biodiversidad. Finalmente, el análisis de la  $\alpha$ -diversidad mostró una ligera disminución en presencia de los IDB a las 48 horas respecto al control, que podría deberse a la producción de ciertos metabolitos con actividad antimicrobiana durante la fermentación colónica a partir de los componentes de la cerveza y las condiciones derivadas que favorezcan el crecimiento de ciertos grupos bacterianos sobre otros, disminuyendo así la diversidad.

Por otro lado, el análisis de la  $\beta$ -diversidad mostró un agrupamiento de las muestras en función de la presencia y tiempos de fermentación con los distintos IDB, sugiriendo que los mismos producen cambios en la estructura de la microbiota.

El análisis de los distintos niveles taxonómicos reveló diferencias en las abundancias relativas de algunos taxones de interés. A nivel de filo los resultados mostraron que en presencia del IDB IPA se mantuvo el equilibrio de la relación inicial de Bacteroidetes/Firmicutes (B/F), de 1,44 a 1,21, mientras que en presencia de los IDB Brown ale y Doble malta esta proporción se vio alterada a favor de Firmicutes, de 1,78 a 0,92 y de 1,78 a 0,97. Una inversión de la relación B/F se ha relacionado con un estado de disbiosis intestinal, y se ha descrito que una disminución de este podría estar asociada a ciertas patologías como hipertensión arterial, obesidad y autismo (Grigor'eva, 2020; Tomova et al., 2015). Sin embargo, existen discrepancias en diversos estudios, por eso en la actualidad es difícil asociar esta relación con un estado de salud determinado y más concretamente considerarlo como un sello distintivo de la obesidad (Magne et al., 2020). Para interpretar estos resultados también es importante tener en cuenta, por un lado, que en el filo Firmicutes se encuentran bacterias que están relacionadas con efectos saludables, a destacar la familia Lactobacillaceae y los géneros *Ruminococcus*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium* y *Lachnospira*. Y que, por otro lado, las múltiples relaciones tróficas existentes entre las diversas cepas bacterianas dan lugar a la formación de comunidades de gran complejidad a lo largo del tracto gastrointestinal. Estos hechos evidencian la necesidad de abordar las complejas relaciones funcionales del microbioma intestinal más allá de su composición, un enfoque que, en la visión integrada de los efectos de los alimentos en la salud intestinal, está ganando cada vez más peso (Antushevich, 2020; Belda et al., 2021).

El análisis a nivel de familia y género mostró que la presencia de los distintos IDB producía cambios en las abundancias relativas de algunos taxones a lo largo del tiempo. Destacó el aumento de las proporciones de algunos géneros asociados a efectos beneficiosos en el organismo del huésped, como los niveles de *Bacteriodes*, en presencia de los IDB IPA y Doble malta, *Bifidobacterium*, *Mitsuokella*, la familia Ruminococcaceae (géneros *Subdoligranulum*, *Faecalibacterium*), y la familia Prevotellaceae en presencia de los IDB IPA y Brown ale), así como *Succinilasticum*, en presencia del IDB IPA.

*Bacteriodes* fue el género más abundante al inicio y final de las fermentaciones, mostrando un ligero aumento o mantenimiento de su abundancia relativa en presencia de los IDB IPA o Doble malta, respectivamente. La disminución drástica observada a las 24 h en

presencia del IDB Doble malta, puede deberse a la incorporación de factores de estrés provenientes de la cerveza como el alcohol (7,2 % alcohol); sin embargo, recuperó sus niveles e incluso incrementó su proporción a las 48 h con respecto al inicio, probablemente debido a que posee una amplia gama de mecanismos para adaptarse y persistir en diversos entornos y condiciones (Koropatkin et al., 2012; Wexler & Goodman, 2017). Además, otro factor a considerar es la presencia de  $\beta$ -glucanos de la cebada y carbohidratos complejos residuales en la cerveza, que algunos miembros de *Bacteroides* utilizan como sustrato y son ampliamente degradados (Fernandez-Julia et al., 2021), promoviendo un aumento significativo de los miembros de este grupo. Un aumento de la proporción de *Bacteroides*, en respuesta a la presencia de estos compuestos se ha relacionado con una reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular (Y. Wang et al., 2016), así como con una mayor concentración de AGCC considerados beneficiosos, como el propionato (Luo et al., 2017).

En cuanto al género *Bifidobacterium*, es un grupo bacteriano ampliamente conocido por sus propiedades beneficiosas en la salud y por el uso de algunas especies como probióticos en humanos, destacando su gran capacidad inmunomoduladora, de producción de vitaminas y AGCC y protección frente a patógenos, así como de mejorar los síntomas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, entre otros. (Bernini et al., 2016; Bottacini et al., 2014; Groeger et al., 2013; O'Mahony et al., 2005). Los miembros de este género son capaces de degradar  $\beta$ -glucanos y oligosacáridos pequeños, a veces a través de interacciones sintróficas con *Bacteroides* (Fernandez-Julia et al., 2021). En este sentido, y coincidiendo con lo observado en nuestro trabajo, se ha descrito que los  $\beta$ -glucanos de la cebada y melonoidinas de la cerveza promueven un aumento en la abundancia de *Bifidobacterium* y de los niveles de AGCC (Aljahdali et al. 2020; Pérez-Burillo et al. 2020; Zhong et al. 2015 b, a).

Por otro lado, los miembros del género *Mitsuokella*, utilizan carbohidratos fermentables para producir butirato, acetato, propionato, lactato y succinato (Gorham et al., 2017) y contribuyen a la acción antiinflamatoria (Shivaji, 2021). También, *Subdoligranulum* y *Faecalibacterium* pertenecientes a la familia Ruminococcaceae, son capaces de producir grandes cantidades de AGCC, como butirato, con un importante efecto antiinflamatorio y que sirve como fuente de energía para los colonocitos, mejorando así en conjunto la homeostasis e integridad de la barrera intestinal (Calderón-Pérez et al., 2020). En este sentido, existen numerosos estudios que han demostrado la actividad probiótica de *F. prausnitzii* (X. He et al., 2021). Algunos miembros de la familia Prevotellaceae son conocidos por su capacidad de metabolizar los carbohidratos complejos presentes en la fibra dietética y producir AGCC,



fundamentales, como ya se ha comentado, en la homeostasis intestinal. Además, la actividad de este grupo microbiano se ha relacionado con un importante papel en el correcto funcionamiento del sistema nervioso, ya que se han detectado menores niveles de *Prevotella* en pacientes con enfermedad de Parkinson (Bedarf et al., 2017; Nair et al., 2018; Shen et al., 2021; Unger et al., 2016). Finalmente, *Succinilasticum* tiene la capacidad de degradar al almidón y celulosa, que forman parte de los carbohidratos no fermentables por la levadura cervecera; y se caracterizan por producir AGCC, a través de la conversión de succinato a propionato (Daghio et al., 2021; E. Du et al., 2021).

Por el contrario, entre los géneros relacionados con un efecto negativo en el organismo del huésped y cuya abundancia disminuyó durante la fermentación o mostraron niveles inferiores al control destacaron: *Escherichia/Shigella* (en presencia de los IDB IPA y Doble malta), *Desulfovibrio* (en presencia de los IDB Doble malta y Brown ale), *Sutterella*, *Bilophila*, y *Alistipes* para los tres IDB. Los miembros de los géneros *Escherichia/Shigella* se han asociado ampliamente en la literatura con diversas patologías intestinales (Mizutani et al., 2021). Los resultados mostraron un importante incremento en los niveles de este grupo en presencia del IDB Brown ale, sin embargo, es conveniente ser prudentes en la interpretación de este efecto ya que no se cuentan con datos previos por lo que sería necesario más estudios. Teniendo en cuenta los efectos negativos en la salud de algunos miembros de este género, la disminución en la abundancia de los géneros *Escherichia/Shigella* en presencia de los IDB IPA y Doble malta, junto con la disminución de miembros de *Staphylococcus*, así como el incremento detectado en *Bifidobacterium* y otros grupos con potencial probiótico sugiere un efecto positivo del consumo de estos tipos de cerveza en la salud. Los miembros pertenecientes al género *Sutterella* se consideran comensales y forman parte del microbioma intestinal de forma común entre adultos y niños, sin embargo, un aumento de las proporciones de este grupo se ha relacionado con diversos problemas gastrointestinales (Nogay & Nahikian-Nelms, 2021) e incluso patologías a nivel sistémico, como trastornos del espectro autista (L. Wang et al., 2013). Igualmente, los miembros de los géneros *Bilophila* y *Desulfovibrio* forman parte del microbioma intestinal, sin embargo, contienen importantes patógenos oportunistas cuyo incremento ha sido asociado con diversas patologías intestinales (Han et al., 2021), así como trastornos de la conducta (Nogay & Nahikian-Nelms, 2021). En concreto, los miembros de *Desulfovibrio* se caracterizan por la producción de sulfuro, un metabolito tóxico para las células epiteliales del colon, y que se ha relacionado con un mayor riesgo de colitis ulcerosa (Fite, 2004), síndrome metabólico, además de autismo (Tomova et al., 2015) y osteoartritis (Wei et al., 2021). Se ha visto que inmunológicamente, *Alistipes* contribuye a la enfermedad tanto en

estudios clínicos como preclínicos. Curiosamente, algunos estudios lo correlacionan con un papel protector en la colitis, trastorno del espectro autista, trastornos cardiovasculares y hepáticos. Respecto a *Alistipes*, nuestros resultados coinciden con lo descrito previamente por (Aljahdali et al., 2020), que reportaron una menor abundancia relativa de miembros de este grupo tras el consumo de melanoidinas de la malta de cebada. En términos de patogenicidad, los resultados son contradictorios, de forma que *Alistipes* se ha relacionado con un posible efecto protector frente a algunas enfermedades, como la fibrosis hepática, la colitis, y algunos trastornos cardiovasculares; sin embargo, por el contrario, existen estudios que relacionan un incremento de miembros de *Alistipes* con el cáncer colorrectal, así como con otros trastornos como la ansiedad y depresión (Parker et al., 2020).

Cabe destacar el caso de los miembros del género *Megasphaera*, que mostraron un importante incremento en presencia de los tres IDB. Las especies de *Megasphaera* han sido aisladas de diversas fuentes como el rumen, muestras clínicas humanas y cervezas deterioradas (Paradh et al., 2011). *M. cerevisiae*, *M. paucivorans* y *M. sueciensis* son consideradas bacterias absolutamente deteriorantes para la cerveza y crecen fácilmente en éstas cuando tienen < 3,5 % ABV (Matoulková & Kubizniaková, 2014). Esto podría explicar su importante crecimiento en presencia de los tres IDB, ya que en éstos el contenido de alcohol se diluyó 1:4 de acuerdo con la metodología de estudio empleada. Varios estudios han descrito asociaciones tanto beneficiosas como perjudiciales de *Megasphaera* con la salud del huésped. En este sentido, se ha asociado un incremento de las proporciones de este grupo con obesidad (Walters et al., 2014), cáncer gástrico (Zhang et al., 2021), nefropatía diabética (X. Du et al., 2021), infarto agudo de miocardio, enfermedad de Parkinson y síndrome metabólico (Han et al., 2021). Sin embargo, este género está ampliamente presente en el intestino de la población saludable de la India (Bhute et al., 2016). Además, actualmente, se está investigando el papel de *Megasphaera elsdenii* como probiótico debido a su capacidad para convertir el lactato, un metabolito clave responsable de la acidosis, en AGCC beneficiosos para la salud (n-caproico, butirato, acetato y valerato principalmente) (Sedighi & Alipour, 2019; Shetty et al., 2013). Un estudio reciente ha descrito menores niveles de *Megasphaera*, en casos de criptosporidiosis diarrea, de forma que los autores proponen que *Megasphaera* puede prevenir la diarrea aguda durante la infección por parásitos o servir como un biomarcador de otros factores protectores mediados por el microbioma o el sistema inmunitario (Carey et al., 2021). En esta línea, se ha demostrado que los pentanoatos y butiratos producidos por *Megasphaera massiliensis* hicieron que las terapias con células CAR-T fueran mejores para atacar tumores

---

sólidos en ratones (Luu et al., 2021), por lo que se está desarrollando una cepa de la bacteria para producir fármacos candidatos para terapia del cáncer.

En relación con la funcionalidad de la microbiota intestinal, la concentración de AGCC y el contenido de amoníaco son parámetros asociados con la salud del colon. Ambos se consideran indicadores indirectos de la fermentación bacteriana y la producción de metabolitos. Respecto a los cambios de la actividad metabólica de la microbiota intestinal, la fermentación en presencia de los tres IDB promovió un efecto beneficioso sobre el metabolismo bacteriano ya que favoreció un aumento de la producción de AGCC y disminuyó el contenido de amonio. En comparación con la muestra control, el aumento más evidente se produjo en presencia del IDB Doble malta, probablemente debido al aumento en las abundancias relativas de *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Mitsuokella*, *Facecalibacterium* y *Subdoligranulum*, que como se ha comentado producen importantes cantidades de AGCC. Se observó un efecto similar, aunque con una concentración menor, en el caso del IDB IPA, en el que pudieron contribuir, a parte de los grupos anteriores, el aumento de las proporciones de *Bifidobacterium*. Como ya se ha comentado, el butirato tiene un papel fundamental en la salud del colon, contribuyendo a la homeostasis intestinal y proporcionando una fuente de energía para los colonocitos. Además, presenta propiedades antiinflamatorias, mejorando la función de barrera intestinal y la inmunidad de las mucosas, por lo que la acumulación de este compuesto a nivel colónico es favorable para la salud (H. Liu et al., 2018). En este estudio, la producción de butirato aumentó en presencia de los tres IDB, debido probablemente a la fermentación de los carbohidratos no fermentados por la levadura cervecera y la fibra soluble presentes en la matriz alimentaria por parte de las bacterias productoras de butirato antes mencionadas. En ese sentido, (Teixeira et al., 2018) describieron un aumento de bacterias productoras de butirato tras la alimentación de ratas con diferentes dietas que contenían fibra de malta de cebada, grano de cerveza y extractos de cebada, es decir con cantidades variables de  $\beta$ -glucano, arabinosilano soluble y arabinosilano insoluble. Sus resultados mostraron que existe la posibilidad de estimular las bacterias productoras de butirato y propionato en el ciego de ratas mediante la ingesta de dietas ricas en fibra procedente de la malta en comparación con una dieta sin fibra; y que, además, una mezcla compleja de fibra como la presente en las maltas, es de mayor importancia para la diversidad de la microbiota que los extractos de fibra más pura (Teixeira et al., 2018). Por otro lado, la cerveza además ha demostrado ser una fuente relativamente rica en arabinosilanos, en cuya presencia las bifidobacterias y las bacterias del colon productoras de butirato se estimulan simultáneamente, con un aumento significativo de la producción de butirato como resultado (Rivière et al., 2016). Según esto,

considerando un consumo moderado de cerveza ( $\approx 500 \text{ mL día}^{-1}$ ) con una cantidad promedio de arabinosilanos (de 0,49 a 1,90 g L<sup>-1</sup>), se puede estimar que la cerveza podría contribuir de manera relevante al efecto bifidogénico (González-Zancada et al., 2020), lo que pone de manifiesto el interés de estudios adicionales en este ámbito.

En cuanto a las concentraciones de amonio, se detectó una disminución en las mismas en presencia de los tres IDB. Es bien conocido que el catabolismo de proteínas por parte de la microbiota intestinal conduce a la producción de metabolitos potencialmente dañinos, que incluyen amonio, aminos, cresoles, indoles y fenoles, por lo que la baja concentración de amonio en el colon se considera positiva para la salud. En nuestro estudio, la baja producción de amonio detectada en presencia de los tres IDB podría deberse a varios factores o la sinergia de los mismos: (i) los carbohidratos no fermentados por la levadura cervecera (melibiosa, oligosacáridos, dextrinas, almidón) pueden servir como fuente de carbono y energía, retrasando la acumulación de amonio proveniente de la fermentación de proteínas (Verbeke et al., 2015), de esta manera la mayor actividad proteolítica observada en el control podría deberse a una disponibilidad limitada de fuentes de carbono, lo que favorecería el metabolismo proteico (Marzorati et al., 2010); y (ii) la capacidad de los polifenoles presentes en la cerveza, que del mismo modo, serviría como fuente de carbono para las bacterias productoras de butirato, disminuyendo así la fermentación de las proteínas y/o el metabolismo de aminoácidos en el colon (Jacobs et al., 2012).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de forma global, enfocándonos en los cambios en la biodiversidad, la abundancia relativa de ciertos grupos microbianos y la producción de AGCC y amonio, es posible indicar que la evolución más favorable de la microbiota se dio en presencia de la cerveza IPA, ya que, aunque se detectó una disminución en la biodiversidad bacteriana, se observó una buena relación y mantenimiento del ratio Bacteroidetes/Firmicutes, además del aumento en las proporciones de los grupos de bacterias beneficiosos antes mencionados y la disminución de grupos relacionados con un potencial patógeno, acompañado de la alta producción de AGCC y baja producción de amonio. En el caso del IDB Doble malta, que, aunque se detectó una inversión del ratio Bacteroidetes/Firmicutes, se evidenció un mayor incremento en la abundancia relativa de bacterias con un efecto beneficioso y una importante disminución de aquellas con efectos negativos en la salud o una potencial actividad patógena, así como un aumento en la producción de AGCC y una baja producción de amonio. Respecto a la cerveza Brown ale la evolución de la microbiota fue la menos favorable, principalmente debido al incremento considerable de los niveles de

---

*Escherichia/Shigella*, una menor formación de AGCC y también produjo la inversión del ratio B/F. Si bien este trabajo no permite establecer una asociación causal entre la intervención con la fermentación colónica en presencia de los IDB y los efectos a nivel del microbioma intestinal, los resultados apoyan una más que probable relación entre los IDB con los posibles efectos beneficiosos en el microbioma intestinal, al mejorar la estructura de las comunidades microbianas y la actividad metabólica.

A pesar de lo mencionado anteriormente, y del aparente efecto beneficioso observado en la función intestinal en presencia de los digeridos de las cervezas IPA especialmente y Doble malta, debe tenerse en cuenta que en el contexto de la salud, el consumo crónico de alcohol puede conducir a una disbiosis en el intestino humano, asociándose, entre otros, con una menor biodiversidad, una disminución de Bacteroidetes y un aumento de Proteobacteria y Fusobacteria, translocación de endotoxinas e inflamación, especialmente en pacientes alcohólicos con enfermedad hepática (Engen et al., 2015). Por tanto, este es un factor por considerar en próximos estudios de simulación, en particular desde el punto de vista de sus efectos directos en el intestino, pero también para dilucidar si los efectos positivos de los otros componentes de la cerveza son independientes de la presencia de etanol.

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio de digestión colónica *in vitro* de la cerveza utilizando un modelo dinámico de las condiciones del tracto gastrointestinal humano. De forma global, los resultados indican que la cerveza puede ser un buen candidato para el desarrollo de productos novedosos con propiedades saludables relacionadas con la microbiota intestinal y destaca la utilidad de los simuladores dinámicos de digestión gastrointestinal como el simgi® en estudio de la relevancia fisiológica del consumo de cerveza (ej. monitorización de la digestión y de los efectos sobre la microbiota, caracterización del metagenoma y del metabolismo intestinal, entre otros). Específicamente, este estudio ha permitido observar diferentes efectos de la cerveza en las comunidades microbianas intestinales en función de las materias primas utilizadas y la forma de elaboración. Esto sugiere que no puede generalizarse a la hora de hablar de los efectos de la cerveza sobre el microbioma intestinal, ya que cada estilo cervecero parece ejercer un impacto diferente. Entre las limitaciones de este trabajo, cabe destacar que no se ha podido llevar a cabo un análisis estadístico que proporcione potencia estadística a los resultados observados debido a la falta de réplicas en las simulaciones, lo que únicamente nos permite hablar de tendencias. Por ello, y aunque los resultados observados son coherentes y concuerdan con lo descrito en la bibliografía, son necesarios nuevos estudios *in vitro* y/o de intervención con diferentes estilos de cerveza

centrados en determinar los efectos de estas en el microbioma intestinal y así corroborar las tendencias observadas en este trabajo.



*Conclusiones*





## 8. CONCLUSIONES

1. En esta Tesis Doctoral se ha realizado un estudio sistemático de caracterización de bacterias lácticas presentes en la microbiota de una cervecería artesanal, incluyendo la monitorización *in situ* de 60 puntos durante todo el proceso de producción de la cerveza, la adaptación de las bacterias aisladas a los factores intrínsecos del producto y la verificación de su potencial para deteriorar la cerveza envasada. Creemos que es la primera vez que se evalúa de forma integral los puntos críticos de una planta cervecera artesanal y posibles riesgos en lo referido a la alteración por bacterias lácticas.
2. Las bacterias lácticas asociadas al proceso de producción artesanal de cerveza pertenecían a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, y la mayoría de ellas se detectaron en la zona de llenado, lo que puede repercutir en contaminaciones secundarias. *Lactobacillus* fue el género más predominante y la especie *L. brevis* la que evidenció la mayor capacidad deteriorante de la cerveza, por su capacidad de crecer en todas las condiciones estudiadas, incluyendo altas concentraciones de etanol y condiciones ácidas e incluso altamente lupuladas. Dos de los aislados de *L. brevis* presentaron, además, genes asociados con la resistencia al lúpulo (*horA*, *horC* e *hitA*) y con la producción de aminas biógenas (*tdc*, *hdc* y *odc*), confirmándose la producción de tiramina y putrescina.
3. El modelo de regresión logística binaria tipo 'Crecimiento/Sin crecimiento (G/NG)' desarrollado, basado en los parámetros fisicoquímicos de la producción de la cerveza artesanal: pH, unidades de amargor y contenido de etanol, predice el crecimiento de microorganismos deteriorantes, por tanto, la monitorización de los parámetros fisicoquímicos incluidos en el modelo permite a los cerveceros artesanales el control de la susceptibilidad al deterioro microbiano.
4. El modelo G/NG clasificó correctamente 276 de los 331 casos analizados, con una buena sensibilidad y bondad de ajuste (87 % y 83,4 %, respectivamente) y en la validación externa, su capacidad de predicción fue del 100 %. Este modelo G/NG puede proporcionar una herramienta de uso práctico para predecir la susceptibilidad al deterioro microbiano de la cerveza artesanal, facilitando la toma de decisiones en momentos críticos en las cervecerías artesanales.
5. De las 141 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* de origen enológico analizadas en esta Tesis para evaluar su potencial como monocultivos fermentativos, se seleccionaron

---

inicialmente cuatro cepas (*T. delbrueckii* CIAL29 y CIAL34, y *L. thermotolerans* CIAL37 y NOO32) con características fermentativas y sensoriales destacadas, incluyendo su aptitud para desarrollar fermentaciones secundarias, usuales en cervecerías artesanales. Estas cepas se caracterizan por su capacidad de producir aromas y sabores afrutados, crecer en presencia de altas concentraciones de iso- $\alpha$ -ácidos, así como producir baja a media graduación alcohólica ya que no fermentan la maltotriosa.

6. El uso de la cepa *L. thermotolerans* CIAL37 seleccionada por sus características biotecnológicas y sensoriales relevantes, produjo cantidades considerables de ácido láctico y cítrico, así como de ésteres y alcoholes, permitiendo la mejora del perfil organoléptico de la cerveza y su complejidad, así como la formación de espuma persistente y contribuyendo a la claridad del líquido. La aplicación de esta cepa a escala de laboratorio muestra aptitudes para el desarrollo de un futuro ensayo de prueba de concepto a escala industrial para elaborar estilos de cerveza con *flavor sour* y con un contenido de etanol relativamente bajo o moderado.
7. Se ha llevado a cabo la primera aplicación de un modelo *in vitro* del tracto gastrointestinal humano a la ingesta de cerveza. La digestión en simgi® de tres cervezas comerciales de diferentes estilos (Doble malta, Brown Ale e Indian Pale Ale), evidenció la disminución de grupos bacterianos relacionados con un efecto negativo en la salud intestinal y/o una actividad patógena, así como un mantenimiento de grupos bacterianos con efectos positivos. El análisis de los distintos niveles taxonómicos de la fermentación colónica en presencia de los distintos IDB reveló diferencias en las abundancias relativas de algunos taxones de interés, a nivel de familia y género, asociados a efectos saludables, como *Bacteriodes*, *Bifidobacterium*, *Mitsuokella* y *Succinilasticum* a nivel de género, y las familias Ruminococcaceae y Prevotellaceae. En relación con la funcionalidad de la microbiota intestinal, la presencia de los tres IDB promovían un efecto beneficioso a través del aumento de la producción de AGCC y disminución del contenido de amonio.
8. Específicamente, este estudio ha permitido observar diferentes efectos de la cerveza en las comunidades microbianas intestinales y la producción de los metabolitos en función de las materias primas utilizadas y la forma de elaboración, si bien en conjunto indican por primera vez el impacto de la cerveza artesanal sobre la microbiota intestinal, como un factor a considerar en la evaluación de sus propiedades para la salud humana.



## *Referencias*



## 7. REFERENCIAS

- Abellán, Á., Domínguez-Perles, R., Giménez, M. J., Zapata, P. J., Valero, D., & García-Viguera, C. (2021). The development of a broccoli supplemented beer allows obtaining a valuable dietary source of sulforaphane. *Food Bioscience*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100814>
- Aljahdali, N., Gadonna-Widehem, P., Anton, P. M., & Carbonero, F. (2020). Gut Microbiota Modulation by Dietary Barley Malt Melanoidins. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010241>
- Almeida, C., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2012). A novel dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, 25(1), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.052>
- Alonso-García, A., Cancho Grande, B., & Simal Gándara, J. (2004). Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.092>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz de Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*, 44(7). <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>
- Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39(2), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>
- Ambra, R., Pastore, G., & Lucchetti, S. (2021). The Role of Bioactive Phenolic Compounds on the Impact of Beer on Health. *Molecules*, 26(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020486>

- 
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., & Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, *67*(4), 188–205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>
- American Society of Brewing Chemists. (2009). ASBC: St. Paul, MN, USA. *Methods of Analysis* (8th ed.).
- Amon, P., & Sanderson, I. (2017). What is the microbiome? *Archives of Disease in Childhood - Education & Practice Edition*, *102*(5). <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311643>
- Annie E. Hill, F. G. P. (2017). Microbiology and Microbiological Control in the Brewery. In CRC Press (Ed.), *Handbook of Brewing* (3rd ed.).
- Antushevich, H. (2020). Fecal microbiota transplantation in disease therapy. *Clinica Chimica Acta*, *503*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.010>
- Arahal, D. R., Sánchez, E., Macián, M. C., & Garay, E. (2008). Value of recN sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family “Leuconostocaceae”. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, *11*(1), 33–39.
- Arevalo-Villena, M., Ubeda Iranzo, J. F., Cordero Otero, R. R., & Briones Perez, A. I. (2005). Optimization of a rapid method for studying the cellular location of beta-glucosidase activity in wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(3), 558–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02627.x>
- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., & Kitagawa, Y. (2007). Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *104*(4), 334–338. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.334>
- Astray, G., Gullón, P., Gullón, B., Munekata, P. E. S., & Lorenzo, J. M. (2020). *Humulus lupulus* L. as a Natural Source of Functional Biomolecules. *Applied Sciences*, *10*(15). <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- Atallah, S. S., Bazzani, C., Ha, K. A., & Nayga, R. M. (2021). Does the origin of inputs and processing matter? Evidence from consumers’ valuation for craft beer. *Food Quality and Preference*, *89*. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104146>
- Back, W. (2003). Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie. *Brauwelt*, *24*, 466–777.
- Back, W. (2005). *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Fachverlag Hans Carl.



- 
- Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Bamforth, C. W. (2003). Wort composition and beer quality. Brewing yeast fermentation performance. In K. Smart (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (pp. 75–85). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470696040>
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Foods*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.3390/foods8010017>
- Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., & Requena, T. (2015). Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.014>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Battey, A. S., Duffy, S., & Schaffner, D. W. (2001). Modelling mould spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. *Food Microbiology*, 18(5), 521–529. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0438>
- Battey, A. S., Duffy, S., & Schaffner, D. W. (2002). Modeling Yeast Spoilage in Cold-Filled Ready-To-Drink Beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1901–1906. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1901-1906.2002>
- Battey, A. S., & Schaffner, D. W. (2001). Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 237–247. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01381.x>
- Bedarf, J. R., Hildebrand, F., Coelho, L. P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., Bork, P., & Wüllner, U. (2017). Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early-stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0428-y>
- Behr, J., & Vogel, R. F. (2010). Mechanisms of Hop Inhibition Include the Transmembrane Redox Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 142–149. <https://doi.org/10.1128/AEM.01693-09>

- 
- Belda, I., Cueva, C., Tamargo, A., Ravarani, C. N., Acedo, A., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2021). A multi-omics approach for understanding the effects of moderate wine consumption on human intestinal health. *Food & Function*, 12(9), 4152–4164. <https://doi.org/10.1039/D0FO02938F>
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., & Santos, A. (2016). Unraveling the Enzymatic Basis of Wine “Flavorome”: A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00012>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry: Alcoholic beverages* (4th edition). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Bellut, K., & Arendt, E. K. (2019). Chance and Challenge: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(2). <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1569452>
- Bellut, K., Krogerus, K., & Arendt, E. K. (2020). *Lachancea fermentati* Strains Isolated from Kombucha: Fundamental Insights, and Practical Application in Low Alcohol Beer Brewing. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00764>
- Bellut, K., Michel, M., Hutzler, M., Zarnkow, M., Jacob, F., de Schutter, D. P., Daenen, L., Lynch, K. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2019). Investigation into the Potential of *Lachancea fermentati* Strain KBI 12.1 for Low Alcohol Beer Brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(3), 157–169. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1629227>
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., Atzler, J. J., Hoehnel, A., Lynch, K. M., & Arendt, E. K. (2019). Screening and Application of *Cyberlindnera* Yeasts to Produce a Fruity, Non-Alcoholic Beer. *Fermentation*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation5040103>
- Bergsveinson, J., Baecker, N., Pittet, V., & Ziola, B. (2015). Role of Plasmids in *Lactobacillus brevis* BSO 464 Hop Tolerance and Beer Spoilage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1234–1241. <https://doi.org/10.1128/AEM.02870-14>
- Bernard-Morell E. (2014). *Bioestadística básica para investigadores con SPSS* (Bubok, Ed.; 1st ed.). Bubok S.L.
- Bernini, L. J., Simão, A. N. C., Alfieri, D. F., Lozovoy, M. A. B., Mari, N. L., de Souza, C. H. B., Dichi, I., & Costa, G. N. (2016). Beneficial effects of *Bifidobacterium lactis* on lipid profile

- and cytokines in patients with metabolic syndrome: A randomized trial. Effects of probiotics on metabolic syndrome. *Nutrition*, 32(6). <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.11.001>
- Bhute, S., Pande, P., Shetty, S. A., Shelar, R., Mane, S., Kumbhare, S. v., Gawali, A., Makhani, H., Navandar, M., Dhotre, D., Lubree, H., Agarwal, D., Patil, R., Ozarkar, S., Ghaskadbi, S., Yajnik, C., Juvekar, S., Makharia, G. K., & Shouche, Y. S. (2016). Molecular Characterization and Meta-Analysis of Gut Microbial Communities Illustrate Enrichment of *Prevotella* and *Megasphaera* in Indian Subjects. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00660>
- Blatchford, P., Parkar, S., Hopkins, W., Ingram, J., & Sutton, K. (2019). Dose-Dependent Alterations to In Vitro Human Microbiota Composition and Butyrate Inhibition by a Supercritical Carbon Dioxide Hops Extract. *Biomolecules*, 9(9), 390. <https://doi.org/10.3390/biom9090390>
- Bogdan, P., & Kordialik-Bogacka, E. (2017). Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science & Technology*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.001>
- Bokulich, N. A., & Bamforth, W. (2013). *The Microbiology of Malting and Brewing*. 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
- Bokulich, N. A., Bergsveinson, J., Ziola, B., & Mills, D. A. (2015). Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance. *ELife*, 4, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.04634>
- Boletín Oficial del Estado. (2016). Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. BOE núm. 304, de 17/12/2016. Pág. 88520.
- Bonaccio, M., di Castelnuovo, A., de Curtis, A., Costanzo, S., Persichillo, M., Donati, M. B., Cerletti, C., Iacoviello, L., & de Gaetano, G. (2014). Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower platelet and leukocyte counts: results from the Moli-sani study. *Blood*, 123(19). <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-541672>
- Booyesen, C., Dicks, L. M. T., Meijering, I., & Ackermann, A. (2002). Isolation, identification, and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1–2), 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00007-7)

- Boronat, A., Soldevila-Domenech, N., Rodríguez-Morató, J., Martínez-Huélamo, M., Lamuela-Raventós, R. M., & de la Torre, R. (2020). Beer Phenolic Composition of Simple Phenols, Prenylated Flavonoids and Alkylresorcinols. *Molecules*, 25(11), 2582. <https://doi.org/10.3390/molecules25112582>
- Bottacini, F., Ventura, M., van Sinderen, D., & O'Connell Motherway, M. (2014). Diversity, ecology, and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(S1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S4>
- Bourbon-Melo, N., Palma, M., Rocha, M. P., Ferreira, A., Bronze, M. R., Elias, H., & Sá-Correia, I. (2021). Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103678>
- Briggs, D. E., Brookes, P. A., Boulton, C. A., & Stevens, R. (2004). *Brewing: science and practice* (Vol. 108). Woodhead Publishing.
- Buiatti, S., Guglielmotti, M., & Passaghe, P. (2021). Industrial beer versus craft beer: definitions and nuances. In *Case Studies in the Beer Sector*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817734-1.00001-X>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Cabras, I., & Bamforth, C. (2016). From reviving tradition to fostering innovation and changing marketing: the evolution of micro-brewing in the UK and US, 1980–2012. *Business History*, 58(5). <https://doi.org/10.1080/00076791.2015.1027692>
- Calderón-Pérez, L., Gosalbes, M. J., Yuste, S., Valls, R. M., Pedret, A., Llauradó, E., Jimenez-Hernandez, N., Artacho, A., Pla-Pagà, L., Companys, J., Ludwig, I., Romero, M. P., Rubió, L., & Solà, R. (2020). Gut metagenomic and short chain fatty acids signature in hypertension: a cross-sectional study. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63475-w>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016). Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2>
- Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, 245(6). <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w>
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, 56, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2017). *Torulasporea delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 259, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.017>
- Canonico, L., Galli, E., Ciani, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2019). Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process. *Microorganisms*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010011>
- Canonico, L., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2021). Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. *LWT*, 145. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111361>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carey, M. A., Medlock, G. L., Alam, M., Kabir, M., Uddin, M. J., Nayak, U., Papin, J., Faruque, A. S. G., Haque, R., Petri, W. A., & Gilchrist, C. A. (2021). *Megasphaera* in the Stool Microbiota Is Negatively Associated with Diarrheal Cryptosporidiosis. *Clinical Infectious Diseases*, 73(6). <https://doi.org/10.1093/cid/ciab207>
- Cattoor, K., Dresel, M., de Bock, L., Boussey, K., van Bocxlaer, J., Remon, J.-P., de Keukeleire, D., Deforce, D., Hofmann, T., & Heyerick, A. (2013). Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(33). <https://doi.org/10.1021/jf300018s>

- Cermak, P., Olsovska, J., Mikyska, A., Dusek, M., Kadleckova, Z., Vanicek, J., Nyc, O., Sigler, K., Bostikova, V., & Bostik, P. (2017). Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. *APMIS*, *125*(11). <https://doi.org/10.1111/apm.12747>
- Cipollaro, M., Fabbrizzi, S., Sottini, V. A., Fabbri, B., & Menghini, S. (2021). Linking Sustainability, Embeddedness and Marketing Strategies: A Study on the Craft Beer Sector in Italy. *Sustainability*, *13*(19). <https://doi.org/10.3390/su131910903>
- Claesson, M. J., van Sinderen, D., & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus*; a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*, *269*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>
- Coelho, E., Azevedo, M., Teixeira, J. A., Tavares, T., Oliveira, J. M., & Domingues, L. (2020). Evaluation of multi-starter *S. cerevisiae*/ *D. bruxellensis* cultures for mimicking and accelerating transformations occurring during barrel ageing of beer. *Food Chemistry*, *323*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126826>
- Coelho, E., Magalhães, J., Pereira, F. B., Macieira, F., Domingues, L., & Oliveira, J. M. (2019). Volatile fingerprinting differentiates diverse-aged craft beers. *LWT*, *108*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.044>
- Colomer, M. S., Chailyan, A., Fennessy, R. T., Olsson, K. F., Johnsen, L., Solodovnikova, N., & Forster, J. (2020). Assessing Population Diversity of *Brettanomyces* Yeast Species and Identification of Strains for Brewing Applications. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00637>
- Consonni, V., Ballabio, D., & Todeschini, R. (2010). Evaluation of model predictive ability by external validation techniques. *Journal of Chemometrics*, *24*(3–4), 194–201. <https://doi.org/10.1002/cem.1290>
- Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Peregrina, D. V., Sagratini, G., Censi, R., & di Martino, P. (2020). Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1612*, 460622. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.460622>
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., & Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in

- 
- wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8), 1078–1085.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012>
- Cousseau, F. E. M., Alves, S. L., Trichez, D., & Stambuk, B. U. (2013). Characterization of maltotriose transporters from the *Saccharomyces eubayanus* subgenome of the hybrid *Saccharomyces pastorianus* lager brewing yeast strain Weihenstephan 34/70. *Letters in Applied Microbiology*, 56(1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/lam.12011>
- Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. (2017). An Integrated View of the Effects of Wine Polyphenols and Their Relevant Metabolites on Gut and Host Health. *Molecules*, 22(1), 99. <https://doi.org/10.3390/molecules22010099>
- Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Muñoz-González, I., Esteban-Fernández, A., Gil-Sánchez, I., Dueñas, M., Martín-Álvarez, P. J., Pozo-Bayón, M. A., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. v. (2015). Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. *Food Research International*, 72, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.003>
- da Costa, N. L., da Costa, M. S., & Barbosa, R. (2021). A Review on the Application of Chemometrics and Machine Learning Algorithms to Evaluate Beer Authentication. *Food Analytical Methods*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01864-7>
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2007). Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 071010063119005-???. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>
- Daghio, M., Ciucci, F., Buccioni, A., Cappucci, A., Casarosa, L., Serra, A., Conte, G., Viti, C., McAmmond, B. M., van Hamme, J. D., & Mele, M. (2021). Correlation of Breed, Growth Performance, and Rumen Microbiota in Two Rustic Cattle Breeds Reared Under Different Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652031>
- Daniels, R. (2000). *Designing great beers: The ultimate guide to brewing classic beer styles* (2nd ed.). Brewers Publications.
- de Francesco, G., Sannino, C., Sileoni, V., Marconi, O., Filippucci, S., Tasselli, G., & Turchetti, B. (2018). *Mrakia gelida* in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. *Food Microbiology*, 76, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.018>

- de Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., & Perretti, G. (2015). Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(1). <https://doi.org/10.1002/jib.185>
- de Gaetano, G., Costanzo, S., di Castelnuovo, A., Badimon, L., Bejko, D., Alkerwi, A., Chiva-Blanch, G., Estruch, R., la Vecchia, C., Panico, S., Pounis, G., Sofi, F., Stranges, S., Trevisan, M., Ursini, F., Cerletti, C., Donati, M. B., & Iacoviello, L. (2016). Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26(6). <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.03.007>
- de Keukeleire, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- Debonne, E., Vermeulen, A., Bouboutiefski, N., Ruysen, T., van Bockstaele, F., Eeckhout, M., & Devlieghere, F. (2020). Modelling and validation of the antifungal activity of DL-3-phenyllactic acid and acetic acid on bread spoilage moulds. *Food Microbiology*, 88, 103407. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103407>
- D'Hautcourt, O., & Smart, K. A. (1999). Measurement of Brewing Yeast Flocculation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(4), 123–128. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0123>
- Ditrych, M., Kordialik-Bogacka, E., & Czyżowska, A. (2016). Antiradical and reducing potential of commercial beers. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(No. 3), 261–266. <https://doi.org/10.17221/658/2014-CJFS>
- Djordjevic, S., Popovic, D., Despotovic, S., Veljovic, M., Atanackovic, M., Cvejic, J., Nedovic, V., & Leskosek-Cukalovic, I. (2016). Extracts of medicinal plants as functional beer additives. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 22(3), 301–308. <https://doi.org/10.2298/CICEQ150501044D>
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 599–604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>
- Drider, D. (2016). *Bacterias ácido lácticas: fundamentos y aplicaciones*. Alfaomega.
- Du, E., Guo, W., Zhao, N., Chen, F., Fan, Q., Zhang, W., Huang, S., Zhou, G., Fu, T., & Wei, J. (2021). Effects of diets with various levels of forage rape (*Brassica napus*) on growth



- performance, carcass traits, meat quality and rumen microbiota of Hu lambs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11466>
- Du, X., Liu, J., Xue, Y., Kong, X., Lv, C., Li, Z., Huang, Y., & Wang, B. (2021). Alteration of gut microbial profile in patients with diabetic nephropathy. *Endocrine*, 73(1). <https://doi.org/10.1007/s12020-021-02721-1>
- Duarte Alonso, A., Kok, S., & O'Shea, M. (2021). Peru's emerging craft-brewing industry and its implications for tourism. *International Journal of Tourism Research*, 23(3). <https://doi.org/10.1002/jtr.2408>
- Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2015). A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/850902>
- Dvořáková, M., Hulín, P., Karabín, M., & Dostálek, P. (2008). Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(No. 4), 182–188. <https://doi.org/10.17221/690-CJFS>
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
- EFSA Panel on BIOHAZ. (2011). Scientific Opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- Einfalt, D. (2021). Barley-sorghum craft beer production with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains. *European Food Research and Technology*, 247(2). <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03632-7>
- Elashoff, J. D., Reedy, T. J., & Meyer, J. H. (1982). Analysis of Gastric Emptying Data. *Gastroenterology*, 83(6), 1306–1312. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(82\)80145-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80145-5)

- Elsanhoty, R. M., & Ramadan, M. F. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.002>
- Elshahed, M. S., Miron, A., Aprotosoia, A. C., & Farag, M. A. (2021). Pectin in diet: Interactions with the human microbiome, role in gut homeostasis, and nutrient-drug interactions. *Carbohydrate Polymers*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117388>
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2015). The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Research: Current Reviews*, 37(2).
- Esmaili, S., Nutrition, N., Sohrabvandi, S., & Mortazavian, A. M. (2015). The common spoilage microorganisms of beer: occurrence, defects, and determination- A review. *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 7(4), 68-73.
- Esslinger, H. M. (2009). *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets* (John Wiley & Sons., Ed.).
- Estruch, R., Urpi-Sarda, M., Chiva, G., Romero, E. S., Covas, M. I., Salas-Salvadó, J., Wärnberg, J., & Lamuela-Raventós, R. M. (2011). Cerveza, Dieta Mediterránea y Enfermedad Cardiovascular. *Centro de Información Cerveza y Salud*, 1–81.
- Eumann, M. (2006). Water in brewing. In *Brewing*. Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845691738.183>
- Fang, J., Nikolić, D., Chen, S., Ramos Alvarenga, R., Pauli, G., & van Breemen, R. (2013). Structure Determination of Isoxanthohumol and 8-Prenylningenin Glucuronides Formed by Human Liver Microsomes. *Planta Medica*, 79(10). <https://doi.org/10.1055/s-0033-1348814>
- Fang, J.-B., Nikolić, D., Lankin, D. C., Simmler, C., Chen, S.-N., Ramos Alvarenga, R. F., Liu, Y., Pauli, G. F., & van Breemen, R. B. (2019). Formation of (2 R)- and (2 S)-8-Prenylningenin Glucuronides by Human UDP-Glucuronosyltransferases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(42). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04657>
- Favaro, L., Jansen, T., & van Zyl, W. H. (2019). Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(6). <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1619157>

- Fernandez, J. L., & Simpson, W. J. (1995). Measurement and prediction of the susceptibility of lager beer to spoilage by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(4), 419–425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03428.x>
- Fernandez-Julia, P. J., Munoz-Munoz, J., & van Sinderen, D. (2021). A comprehensive review on the impact of  $\beta$ -glucan metabolism by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* species as members of the gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.069>
- Feyereisen, M., Mahony, J., O'Sullivan, T., Boer, V., & van Sinderen, D. (2020). A Plasmid-Encoded Putative Glycosyltransferase Is Involved in Hop Tolerance and Beer Spoilage in *Lactobacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02268-19>
- Fite, A. (2004). Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. *Gut*, 53(4). <https://doi.org/10.1136/gut.2003.031245>
- Flint, H. J. (2020a). How Gut Micro-organisms Make Use of Available Carbohydrates. In: Why Gut Microbes Matter. Fascinating Life Sciences. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-43246-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-43246-1_7)
- Flint, H. J. (2020b). Micro-organisms and the Microbiome. In: Why Gut Microbes Matter. Fascinating Life Sciences. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-43246-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-43246-1_1)
- Flint, H. J. (2020c). *Who Inhabits Our Gut? Introducing the Human Gut Microbiota*. In: Why Gut Microbes Matter. Fascinating Life Sciences. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-43246-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-43246-1_5)
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>
- Floridi, S., Montanari, L., Marconi, O., & Fantozzi, P. (2003). Determination of Free Phenolic Acids in Wort and Beer by Coulometric Array Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1548–1554. <https://doi.org/10.1021/jf0260040>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., & Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactive on human health. *Food & Function*, 10(2). <https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>

- Fumi, M. D., Galli, R., Lambri, M., Donadini, G., & de Faveri, D. M. (2011). Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4–5), 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.12.006>
- Gakh, A. A., Anisimova, N. Y., Kiselevsky, M. v., Sadovnikov, S. v., Stankov, I. N., Yudin, M. v., Rufanov, K. A., Krasavin, M. Y., & Sosnov, A. v. (2010). Dihydro-resveratrol—A potent dietary polyphenol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(20). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.002>
- Garai, G., Dueñas, M. T., Irastorza, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 473–478. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02207.x>
- García-García, J. H., Damas-Buenrostro, L. C., Cabada-Amaya, J. C., Elias-Santos, M., & Pereyra-Alfárez, B. (2017). *Pediococcus damnosus* strains isolated from a brewery environment carry the horA gene. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 77–80. <https://doi.org/10.1002/jib.397>
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L., & Clementi, F. (2015). The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. *Journal of Food Science*, 80(12), M2845–M2852. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13112>
- Geissler, A. J., Behr, J., von Kamp, K., & Vogel, R. F. (2016). Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.016>
- Gerhards, S., Talaverano, M. I., Andrés, A. I., Sánchez-Vicente, C., Lozano, J., García-Latorre, C., Petrón, M. J., & Rodrigo, S. (2021). Different dry hopping and fermentation methods: influence on beer nutritional quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7). <https://doi.org/10.1002/jsfa.10912>
- Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1941–1954. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012>
- Giannakou, K., Visinoni, F., Zhang, P., Nathoo, N., Jones, P., Cotterrell, M., Vrhovsek, U., & Delneri, D. (2021). Biotechnological exploitation of *Saccharomyces jurei* and its hybrids in craft beer fermentation uncovers new aroma combinations. *Food Microbiology*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103838>

- Gong, L., Wang, H., Wang, T., Liu, Y., Wang, J., & Sun, B. (2019). Feruloylated oligosaccharides modulate the gut microbiota in vitro via the combined actions of oligosaccharides and ferulic acid. *Journal of Functional Foods*, *60*, 103453. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103453>
- Goñi, I., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2009). Dietary Fiber in Beer: Content, Composition, Colonic Fermentability, and Contribution to the Diet. In *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00028-6>
- Gonzalez Viejo, C., Fuentes, S., Godbole, A., Widdicombe, B., & Unnithan, R. R. (2020). Development of a low-cost e-nose to assess aroma profiles: An artificial intelligence application to assess beer quality. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *308*. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127688>
- González-Zancada, N., Redondo-Useros, N., Díaz, L. E., Gómez-Martínez, S., Marcos, A., & Nova, E. (2020). Association of Moderate Beer Consumption with the Gut Microbiota and SCFA of Healthy Adults. *Molecules*, *25*(20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204772>
- Gorham, J. B., Kang, S., Williams, B. A., Grant, L. J., McSweeney, C. S., Gidley, M. J., & Mikkelsen, D. (2017). Addition of arabinoxylan and mixed linkage glucans in porcine diets affects the large intestinal bacterial populations. *European Journal of Nutrition*, *56*(6). <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1263-4>
- Gorjanović, S. Z., Novaković, M. M., Potkonjak, N. I., Leskošek-Čukalović, I., & Sužnjević, D. Z. (2010). Application of a Novel Antioxidative Assay in Beer Analysis and Brewing Process Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(2), 744–751. <https://doi.org/10.1021/jf903091n>
- Granato, D., Branco, G. F., Faria, J. de A. F., & Cruz, A. G. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(3), 563–571. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4222>
- Gray, S. R., Rawsthorne, H., Dirks, B., & Phister, T. G. (2011). Detection and enumeration of *Dekkera anomala* in beer, cola, and cider using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, *52*(4), 352–359. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03008.x>
- Grigor'eva, I. N. (2020). Gallstone Disease, Obesity, and the Firmicutes/Bacteroidetes Ratio as a Possible Biomarker of Gut Dysbiosis. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/jpm11010013>

- Groeger, D., O'Mahony, L., Murphy, E. F., Bourke, J. F., Dinan, T. G., Kiely, B., Shanahan, F., & Quigley, E. M. M. (2013). *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes*, 4(4). <https://doi.org/10.4161/gmic.25487>
- Guarner, F. (2020). Symbiosis in the human gastrointestinal tract. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.20960/nh.03354>
- Guo, J., Nikolic, D., Chadwick, L. R., Pauli, G. F., & van Breemen, R. B. (2006). Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.). *Drug Metabolism and Disposition*, 34(7). <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008250>
- Gutiérrez, A., Boekhout, T., Gojkovic, Z., & Katz, M. (2018). Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer, and cider for the development of new beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 389–402. <https://doi.org/10.1002/jib.512>
- Gyseman, K. P. M., Bernaerts, K., Vermeulen, A., Geeraerd, A. H., Debevere, J., Devlieghere, F., & Van Impe, J. F. (2007). Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.026>
- Haakensen, M., Butt, L., Chaban, B., Deneer, H., Ziola, B., & Dowgiert, T. (2007). horA -Specific Real-Time PCR for Detection of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(3), 157–165. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0611-01>
- Haakensen, M., Dobson, C. M., Deneer, H., & Ziola, B. (2008). Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.002>
- Haakensen, M., Schubert, A., & Ziola, B. (2008). Multiplex PCR for Putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* Beer-Spoilage Genes and Ability of Gene Presence to Predict Growth in Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66(2), 63–70. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2008-0314-01>
- Han, Y., Gong, Z., Sun, G., Xu, J., Qi, C., Sun, W., Jiang, H., Cao, P., & Ju, H. (2021). Dysbiosis of Gut Microbiota in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.680101>

- Hanske, L., Loh, G., Sczesny, S., Blaut, M., & Braune, A. (2010). Recovery and metabolism of xanthohumol in germ-free and human microbiota-associated rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(10). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900517>
- Hartemink, R., Domenech, V. R., & Rombouts, F. M. (1997). LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29(2). [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00025-0)
- Haslbeck, K., Bub, S., von Kamp, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., & Coelhan, M. (2018). The influence of brewing yeast strains on monoterpene alcohols and esters contributing to the citrus flavour of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4). <https://doi.org/10.1002/jib.523>
- He, X., Zhao, S., & Li, Y. (2021). *Faecalibacterium prausnitzii*: A Next-Generation Probiotic in Gut Disease Improvement. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6666114>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jib.145>
- Helou, C., Anton, P. M., Niquet-Léridon, C., Spatz, M., Tessier, F. J., & Gadonna-Widehem, P. (2017). Fecal excretion of Maillard reaction products and the gut microbiota composition of rats fed with bread crust or bread crumb. *Food & Function*, 8(8). <https://doi.org/10.1039/C7FO00430C>
- Helou, C., Denis, S., Spatz, M., Marier, D., Rame, V., Alric, M., Tessier, F. J., & Gadonna-Widehem, P. (2015). Insights into bread melanoidins: fate in the upper digestive tract and impact on the gut microbiota using in vitro systems. *Food & Function*, 6(12). <https://doi.org/10.1039/C5FO00836K>
- Hernandes, K. C., Souza-Silva, É. A., Assumpção, C. F., Zini, C. A., & Welke, J. E. (2020). Carbonyl compounds and furan derivatives with toxic potential evaluated in the brewing stages of craft beer. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(1). <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1675911>
- Hernández-Quiroz, F., Nirmalkar, K., Villalobos-Flores, L. E., Murugesan, S., Cruz-Narváez, Y., Rico-Arzate, E., Hoyo-Vadillo, C., Chavez-Carbajal, A., Pizano-Zárate, M. L., & García-Mena, J. (2020). Influence of moderate beer consumption on human gut microbiota and

- its impact on fasting glucose and  $\beta$ -cell function. *Alcohol*, *85*, 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.05.006>
- Hidalgo, M., Oruna-Concha, M. J., Kolida, S., Walton, G. E., Kallithraka, S., Spencer, J. P. E., Gibson, G. R., & de Pascual-Teresa, S. (2012). Metabolism of Anthocyanins by Human Gut Microflora and Their Influence on Gut Bacterial Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(15). <https://doi.org/10.1021/jf3002153>
- Hilbe, J. M. (2009). *Logistic Regression Models*. Chapman & Hall/CRC Press.
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, *72*, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Hughes, P. (2017). The Stability and Stabilization of Beer. In *Post-Fermentation and -Distillation Technology* (1st ed.). CRC Press.
- Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M. da C., & Padilha, F. F. (2019). Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties: A Review. *Molecules*, *24*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules24081568>
- Hutzler, M., Koob, J., Riedl, R., Schneiderbanger, H., Mueller-Auffermann, K., & Jacob, F. (2015). Yeast identification and characterization. In *Brewing Microbiology* (pp. 65–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00005-8>
- Iattici, F., Catallo, M., & Solieri, L. (2020). Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. *Beverages*, *6*(1). <https://doi.org/10.3390/beverages6010003>
- Iijima, K., Suzuki, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., & Brew, J. I. (2007). Isolation and Identification of Potential Beer-Spoilage *Pediococcus inopinatus* and Beer-Spoilage *Lactobacillus backi* Strains Carrying the *horA* and *horC* Gene Clusters. *Journal of the Institute of Brewing*, *113*(1), 96–101.
- Iriondo-DeHond, A., Elizondo, A. S., Iriondo-DeHond, M., Ríos, M. B., Mufari, R., Mendiola, J. A., Ibañez, E., & del Castillo, M. D. (2020). Assessment of Healthy and Harmful Maillard Reaction Products in a Novel Coffee Cascara Beverage: Melanoidins and Acrylamide. *Foods*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050620>
- Jacobs, D. M., Fuhrmann, J. C., van Dorsten, F. A., Rein, D., Peters, S., van Velzen, E. J. J., Hollebrands, B., Draijer, R., van Duynhoven, J., & Garczarek, U. (2012). Impact of Short-



- 
- Term Intake of Red Wine and Grape Polyphenol Extract on the Human Metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12). <https://doi.org/10.1021/jf2044247>
- Jiang, C.-H., Sun, T.-L., Xiang, D.-X., Wei, S.-S., & Li, W.-Q. (2018). Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid from Hops (*Humulus lupulus* L.). *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00530>
- Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>
- Jones, D. (2010). Neoplastic hematopathology: Contemporary hematology. experimental and clinical approaches (1st ed.). Humana Press.
- Justé, A., Malfliet, S., Waud, M., Crauwels, S., De Cooman, L., Aerts, G., Marsh, T. L., Ruyters, S., Willems, K., Busschaert, P., & Lievens, B. (2014). Bacterial community dynamics during industrial malting, with an emphasis on lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 39, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.010>
- Juvonen, R. (2015). Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. In *Brewing Microbiology* (pp. 195–218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00009-5>
- Juvonen, R., Virkajärvi, V., Priha, O., & Laitila, A. (2011). *Microbiologic spoilage and safety risks in non-beer beverages*.
- Kalač, P., Šavel, J., Křížek, M., Pelikánová, T., & Prokopová, M. (2002). Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*, 79(4), 431–434. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00193-0)
- Kanauchi, M., & Bamforth, C. W. (2012).  $\beta$ -Glucoside Hydrolyzing Enzymes from Ale and Lager Strains of Brewing Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(4), 303–307. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2012-1012-02>
- Karabín, M., Jelínek, L., Kinčl, T., Hudcová, T., Kotlíková, B., & Dostálek, P. (2013). New approach to the production of xanthohumol-enriched beers. *Journal of the Institute of Brewing*. <https://doi.org/10.1002/jib.71>
- Karovičová, J., & K. Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59(1), 70–79.
- Kellner, V., Jurková, M., Čulík, J., Horák, T., & Čejka, P. (2007). Some phenolic compounds in czech hops and beer of pilsner type. *Brewing Science*, 60, 31–37.

- Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C., & Vaughan, E. E. (2010). Novel approaches for analyzing gut microbes and dietary polyphenols: Challenges and opportunities. In *Microbiology* (Vol. 156, Issue 11, 3224–3231). <https://doi.org/10.1099/mic.0.042127-0>
- Kishimoto, T., Teramoto, S., Fujita, A., & Yamada, O. (2021). Evaluation of Components Contributing to the International Bitterness Unit of Wort and Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1878684>
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Kozłowski, R., Dziedziński, M., Stachowiak, B., & Kobus-Cisowska, J. (2021). Non- and low-alcoholic beer – popularity and manufacturing techniques [pdf]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 20(3). <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2021.0961>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Aspinall, S. M., Runswick, S. A., Mulligan, A. A., & Bingham, S. A. (2008). Phytoestrogen Content of Beverages, Nuts, Seeds, and Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7311–7315. <https://doi.org/10.1021/jf801534g>
- Larroque, M. N., Carrau, F., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., & Medina, K. (2021). Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953>
- Lasanta, C., Durán-Guerrero, E., Díaz, A. B., & Castro, R. (2021). Influence of fermentation temperature and yeast type on the chemical and sensory profile of handcrafted beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(3). <https://doi.org/10.1002/jsfa.10729>
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005>
- Lechner, S., Lewis, K., & Bertram, R. (2012). *Staphylococcus aureus* Persists Tolerant to Bactericidal Antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 235–244. <https://doi.org/10.1159/000342449>

- Lemeshow, S., & Hosmer, D. (1982). A review of goodness of fit statistics for use in the development of logistic regression models. *American Journal of Epidemiology*, 115(1), 92–106. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113284>
- Lentz, M. (2018). The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020>
- Lewis, M. J., & Bamforth, C. W. (2006). *Essays in Brewing Science*. Springer Science & Business Media.
- Li, H., Zhao, M., Cui, C., Sun, W., & Zhao, H. (2016). Antioxidant activity and typical ageing compounds: their evolutions and relationships during the storage of lager beers. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(9), 2026–2033. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13173>
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valerio, E., Goncalves, C., Dover, J., Johnston, M., Goncalves, P., & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
- Lim, S. C., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2020). *Clostridium difficile* and One Health. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- Linares, D. M., del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>
- Linderholm, A. L., Findleton, C. L., Kumar, G., Hong, Y., & Bisson, L. F. (2008). Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1418–1427. <https://doi.org/10.1128/AEM.01758-07>
- Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D., & Ma, X. (2018). Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Advances in Nutrition*, 9(1). <https://doi.org/10.1093/advances/nmx009>
- Liu, L., Wang, J., Rosenberg, D., Zhao, H., Lengyel, G., & Nadel, D. (2018). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 21, 783–793. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.08.008>

- Liu, Z., Ma, A., Mathé, E., Merling, M., Ma, Q., & Liu, B. (2020). Network analyses in microbiome based on high-throughput multi-omics data. *Briefings in Bioinformatics*, 2020(00), 1–17. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa005>
- Loret, S., Deloyer, P., & Dandrifosse, G. (2005). Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*, 89(4), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.010>
- Loviso, C. L., & 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). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Loviso, C. L., & 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). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Lucas, P. M., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2008). High Frequency of Histamine-Producing Bacteria in the Enological Environment and Instability of the Histidine Decarboxylase Production Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 811–817. <https://doi.org/10.1128/AEM.01496-07>
- Lugasi, A. (2003). Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Alimentaria*, 32(2), 181–192. <https://doi.org/10.1556/AAlim.32.2003.2.7>
- Luo, Y., Zhang, L., Li, H., Smidt, H., Wright, A.-D. G., Zhang, K., Ding, X., Zeng, Q., Bai, S., Wang, J., Li, J., Zheng, P., Tian, G., Cai, J., & Chen, D. (2017). Different Types of Dietary Fibers Trigger Specific Alterations in Composition and Predicted Functions of Colonic Bacterial Communities in BALB/c Mice. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00966>
- Machado, J. C., Faria, M. A., Melo, A., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2017). Antiproliferative effect of beer and hop compounds against human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.006>
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Poeso, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/nu12051474>
- Maia, P. D. D. S., Baião, D. dos S., da Silva, V. P. F., Lemos Miguel, M. A., Quirino Lacerda, E. C., Calado, V. M. de A., Carneiro, C. da S., Finotelli, P. v., & Pierucci, A. P. T. R. (2020).

- Microencapsulation of a craft beer, nutritional composition, antioxidant stability, and drink acceptance. *LWT*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110104>
- Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Buiatti, S., Picon, S., & Marino, M. (2015). Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. *Food Control*, 50, 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.032>
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- Manzano, M., Iacumin, L., Vendramas, M., Cecchini, F., Comi, G., & Buiatti, S. (2011). Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 343–351. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00478.x>
- Marcos, A., López Díaz-Ufano, M., & Pascual Fuster, V. (2015). ¿El consumo moderado de cerveza podría incluirse dentro de una alimentación saludable? *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 41. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(15\)30006-X](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(15)30006-X)
- Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*, 2015, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/905215>
- Marova, I., Parilova, K., Friedl, Z., Obruca, S., & Duronova, K. (2011). Analysis of Phenolic Compounds in Lager Beers of Different Origin: A Contribution to Potential Determination of the Authenticity of Czech Beer. *Chromatographia*, 73(S1), 83–95. <https://doi.org/10.1007/s10337-011-1916-7>
- Martínez A. (2015). Análisis Comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial. *Universitat de Lleida. Facultat de Medicina*. <http://hdl.handle.net/10459.1/48689>
- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400. <https://doi.org/10.3390/biom10030400>
- Marvig, C. L., Kristiansen, R. M., & Nielsen, D. S. (2015). Growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* associated with acidic, sweet intermediate moisture food products. *International Journal of Food Microbiology*, 192, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.021>

- Marzorati, M., Verhelst, A., Luta, G., Sinnott, R., Verstraete, W., de Wiele, T. van, & Possemiers, S. (2010). In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.030>
- Mastanjević, K., Lukinac, J., Jukić, M., Šarkanj, B., Krstanović, V., & Mastanjević, K. (2019). Multi-(myco)toxins in Malting and Brewing By-Products. *Toxins*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010030>
- Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/nu12061679>
- Matoulková, D., & Kubizniaková, P. (2014). Microbiology of brewing - Strictly anaerobic bacteria *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Zymophilus* and *Selenomonas* and methods for their detection. *Kvasny Prumysl*, 60(11), 285–294. <https://doi.org/10.18832/kp2014028>
- Matraxia, M., Alfonzo, A., Prestianni, R., Francesca, N., Gaglio, R., Todaro, A., Alfeo, V., Perretti, G., Columba, P., Settanni, L., & Moschetti, G. (2021). Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. *Food Microbiology*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103806>
- Meier-Dörnberg, T., Hutzler, M., Michel, M., Methner, F.-J., & Jacob, F. (2017). The Importance of a Comparative Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* Strains for Brewing. *Fermentation*, 3(3), 41. <https://doi.org/10.3390/fermentation3030041>
- Mellor, D. D., Hanna-Khalil, B., & Carson, R. (2020). A Review of the Potential Health Benefits of Low Alcohol and Alcohol-Free Beer: Effects of Ingredients and Craft Brewing Processes on Potentially Bioactive Metabolites. *Beverages*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/beverages6020025>
- Menz, G., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2009). Pathogens in Beer. In *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 403–413). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00039-0>
- Menz, G., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2011). Growth and Survival of Foodborne Pathogens in Beer. *Journal of Food Protection*, 74(10), 1670–1675. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-546>
- Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2010). Isolation, Identification, and Characterization of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria from

- Microbrewed Beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 14–22. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00393.x>
- Mertens, S., Steensels, J., Gallone, B., Souffriau, B., Malcorps, P., & Verstrepen, K. J. (2017). Rapid Screening Method for Phenolic Off-Flavor (POF) Production in Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(4), 318–323. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-4142-01>
- Methner, Y., Hutzler, M., Matoulková, D., Jacob, F., & Michel, M. (2019). Screening for the Brewing Ability of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Fermentation*, 5(4), 101. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040101>
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast*, 33(4), 129–144. <https://doi.org/10.1002/yea.3146>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Michiu, D., Delvigne, F., Mabon, N., Jimborean, M., Fogarasi, M., Mihai, M., Tofana, M., & Thonart, P. (2019). Inhibitory Effects of Iso- $\alpha$  and  $\beta$  Hop Acids Against *Pediococcus pentosaceus*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(4). <https://doi.org/10.15835/nbha47411687>
- Midi, H., Sarkar, S. K., & Rana, S. (2010). Collinearity diagnostics of binary logistic regression model. *Journal of Interdisciplinary Mathematics*, 13(3), 253–267. <https://doi.org/10.1080/09720502.2010.10700699>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6). <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mizutani, T., Aboagye, S. Y., Ishizaka, A., Afum, T., Mensah, G. I., Asante-Poku, A., Asandem, D. A., Parbie, P. K., Abana, C. Z.-Y., Kushitor, D., Bonney, E. Y., Adachi, M., Hori, H., Ishikawa, K., Matano, T., Taniguchi, K., Opore, D., Arhin, D., Asiedu-Bekoe, F., ... Kiyono, H. (2021).

- 
- Gut microbiota signature of pathogen-dependent dysbiosis in viral gastroenteritis. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93345-y>
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andres-Lacueva, C., & Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1(3). <https://doi.org/10.1039/c0fo00132e>
- Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B., Peñalvo, J. L., Pérez-Matute, P., & Motilva, M. J. (2020). Relationship between Wine Consumption, Diet and Microbiome Modulation in Alzheimer's Disease. *Nutrients*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/nu12103082>
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., & Muñoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00391-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00391-4)
- Moreno-Arribas, M. V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2000). Isolation, properties, and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 584–593. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00997.x>
- Moura-Nunes, N., Brito, T. C., Fonseca, N. D. da, de Aguiar, P. F., Monteiro, M., Perrone, D., & Torres, A. G. (2016). Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 199, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.133>
- Munford, A. R. G., Chaves, R. D., Granato, D., & Sant'Ana, A. S. (2020). Modeling the inactivation of *Lactobacillus brevis* DSM 6235 and retaining the viability of brewing pitching yeast submitted to acid and chlorine washing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 4071–4080. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10534-x>
- Nagelkerke, N. J. D. (1991). A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika*, 78, 691–692.
- Nair, A. T., Ramachandran, V., Joghee, N. M., Antony, S., & Ramalingam, G. (2018). Gut Microbiota Dysfunction as Reliable Non-invasive Early Diagnostic Biomarkers in the Pathophysiology of Parkinson's Disease: A Critical Review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 24(1). <https://doi.org/10.5056/jnm17105>



- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., & Lucas, P. M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 594–599. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02472.x>
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2020). Characterization of bioactive compounds and antioxidant activity of fruit beers. *Food Chemistry*, 305, 125437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125437>
- Nardini, M., & Guiselli, A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84(1), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00257-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00257-7)
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., & Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 476–495. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x>
- Nikolic, D., Li, Y., Chadwick, L. R., Pauli, G. F., & van Breemen, R. B. (2005). Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(3). <https://doi.org/10.1002/jms.753>
- Niu, C., Han, Y., Wang, J., Zheng, F., Liu, C., Li, Y., & Li, Q. (2018). Malt derived proteins: Effect of protein Z on beer foam stability. *Food Bioscience*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.07.003>
- Nogay, N. H., & Nahikian-Nelms, M. (2021). Can we reduce autism-related gastrointestinal and behavior problems by gut microbiota based dietary modulation? A review. *Nutritional Neuroscience*, 24(5). <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1630894>
- Nunes Filho, R. C., Galvan, D., Effting, L., Terhaag, M. M., Yamashita, F., Benassi, M. de T., & Spinoso, W. A. (2021). Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: A simplex-centroid mixture design approach. *Food Chemistry*, 365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130478>
- Oishi, K., Yamamoto, S., Itoh, N., Nakao, R., Yasumoto, Y., Tanaka, K., Kikuchi, Y., Fukudome, S., Okita, K., & Takano-Ishikawa, Y. (2015). Wheat Alkylresorcinols Suppress High-Fat, High-Sucrose Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance by Increasing Insulin Sensitivity and Cholesterol Excretion in Male Mice. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 199–206. <https://doi.org/10.3945/jn.114.202754>

- Olstorpe, M., Schnürer, J., & Passoth, V. (2010). Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under Swedish farm conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 156(1–2), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.12.007>
- O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G. C., Kiely, B., Collins, J. K., Shanahan, F., & Quigley, E. M. M. (2005). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 128(3). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.050>
- Oroian, M., Damian, C., Leahu, A., & Gherasim, O. (2013). Polyphenol content and antioxidant activity of commercial beers from the Romanian market. *Journal of Faculty of Food Engineering*, XII (4), 328–331.
- O'Rourke, T. (2002). The role of oxygen in brewing. *The Brewer International*, 2(3), 45–47.
- Osburn, K., Amaral, J., Metcalf, S. R., Nickens, D. M., Rogers, C. M., Sausen, C., Caputo, R., Miller, J., Li, H., Tennessen, J. M., & Bochman, M. L. (2018). Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiology*, 70, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.007>
- Osorio-Paz, I., Brunauer, R., & Alavez, S. (2019). Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1696278>
- Ou, J., Huang, J., Song, Y., Yao, S., Peng, X., Wang, M., & Ou, S. (2016). Feruloylated Oligosaccharides from Maize Bran Modulated the Gut Microbiota in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(2), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0547-4>
- Pai, T. v., Sawant, S. Y., Ghatak, A. A., Chaturvedi, P. A., Gupte, A. M., & Desai, N. S. (2015). Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1414–1423. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1152-2>
- Palmioli, A., Alberici, D., Ciaramelli, C., & Aioldi, C. (2020). Metabolomic profiling of beers: Combining 1H NMR spectroscopy and chemometric approaches to discriminate craft and industrial products. *Food Chemistry*, 327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127025>
- Paradh, A. D. (2015). Gram-negative spoilage bacteria in brewing. In *Brewing Microbiology* (pp. 175–194). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00008-3>

- Paradh, A. D., Mitchell, W. J., & Hill, A. E. (2011). Occurrence of *Pectinatus* and *Megasphaera* in the Major UK Breweries. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4), 498–506. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00497.x>
- Paraiso, I. L., Plagmann, L. S., Yang, L., Zielke, R., Gombart, A. F., Maier, C. S., Sikora, A. E., Blakemore, P. R., & Stevens, J. F. (2019). Reductive Metabolism of Xanthohumol and 8-Prenylnaringenin by the Intestinal Bacterium *Eubacterium ramulus*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(2), 1800923. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800923>
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria with Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
- Parr, H., Bolat, I., & Cook, D. (2021). Modelling flavour formation in roasted malt substrates under controlled conditions of time and temperature. *Food Chemistry*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127641>
- Paulo, E. M., Boffo, E. F., Branco, A., Valente, Â. M. M. P., Melo, I. S., Ferreira, A. G., Roque, M. R. A., & Assis, S. A. de. (2012). Production, extraction, and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 84(2), 495–508. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000200018>
- Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. de J., Nascimento, R., Melo, I. S., Roque, M. R., & Assis, S. A. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, 32(4), 710–714. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000094>
- Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, Á. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. Á. (2021). An *in vitro* batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality. *Nature Protocols*, 16(7). <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00537-x>
- Pérez-Burillo, S., Rajakaruna, S., Pastoriza, S., Paliy, O., & Ángel Rufián-Henares, J. (2020). Bioactivity of food melanoidins is mediated by gut microbiota. *Food Chemistry*, 316, 126309. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126309>

- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, *64*(S3). <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>
- Peters, J., van Dam, R., van Doorn, R., Katerere, D., Berthiller, F., Haasnoot, W., & Nielen, M. W. F. (2017). Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLOS ONE*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185887>
- Petrón, M. J., Andrés, A. I., Esteban, G., & Timón, M. L. (2021). Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. *Journal of Cereal Science*, *98*. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103162>
- Piazzon, A., Forte, M., & Nardini, M. (2010). Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(19), 10677–10683. <https://doi.org/10.1021/jf101975q>
- Pieczonka, S. A., Lucio, M., Rychlik, M., & Schmitt-Kopplin, P. (2020). Decomposing the molecular complexity of brewing. *Npj Science of Food*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-020-00070-3>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (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. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Piva, R. C., Verdán, M. H., Mascarenhas Santos, M. do S., Batistote, M., & Cardoso, C. A. L. (2021). Manufacturing and characterization of craft beers with leaves from *Ocimum selloi* Benth. *Journal of Food Science and Technology*, *58*(11). <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04925-1>
- Possemiers, S., Heyerick, A., Robbens, V., de Keukeleire, D., & Verstraete, W. (2005). Activation of Proestrogens from Hops (*Humulus lupulus* L.) by Intestinal Microbiota; Conversion of Isoxanthohumol into 8-Prenylnaringenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(16), 6281–6288. <https://doi.org/10.1021/jf0509714>
- Possemiers, S., Rabot, S., Espín, J. C., Bruneau, A., Philippe, C., González-Sarrías, A., Heyerick, A., Tomás-Barberán, F. A., de Keukeleire, D., & Verstraete, W. (2008). *Eubacterium limosum* Activates Isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin *In Vitro* and in Rat Intestine. *The Journal of Nutrition*, *138*(7), 1310–1316. <https://doi.org/10.1093/jn/138.7.1310>

- 
- Pounis, G., Bonaccio, M., Castelnovo, A. di, Costanzo, S., Curtis, A. de, Persichillo, M., Sieri, S., Donati, M. B., Cerletti, C., Gaetano, G. de, & Iacoviello, L. (2016). Polyphenol intake is associated with low-grade inflammation, using a novel data analysis from the Moli-sani study. *Thrombosis and Haemostasis*, *115*(02). <https://doi.org/10.1160/th15-06-0487>
- Poveda, J. M. (2019). Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. *Food Control*, *96*, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.012>
- Poveda, J. M., Ruiz, P., Seseña, S., & Palop, M. L. (2017). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT - Food Science and Technology*, *85*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.003>
- Prenafeta-Boldú, F. X., Roca, N., Villatoro, C., Vera, L., & de Hoog, G. S. (2019). Prospective application of melanized fungi for the biofiltration of indoor air in closed bioregenerative systems. *Journal of Hazardous Materials*, *361*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.059>
- Priha, O., Raulio, M., Cooke, K., Fisher, L., Hill, C., Hylkinen, S., Kelly, P., Navabpour, P., Ostovarpour, S., Tapani, K., Tattershall, C., Vehviläinen, A.-K., Verran, J., & Storgårds, E. (2015). Microbial populations on brewery filling hall surfaces – Progress towards functional coatings. *Food Control*, *55*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.022>
- Qian, Y., Yang, X., Xu, S., Wu, C., Song, Y., Qin, N., Chen, S.-D., & Xiao, Q. (2018). Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, *70*, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.016>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285). <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D590. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

- Quesada-Molina, M., Muñoz-Garach, A., Tinahones, F. J., & Moreno-Indias, I. (2019). A New Perspective on the Health Benefits of Moderate Beer Consumption: Involvement of the Gut Microbiota. *Metabolites*, *9*(11), 272. <https://doi.org/10.3390/metabo9110272>
- Rasigade, J.-P., & Vandenesch, F. (2014). *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*, *21*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.018>
- Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (1995). Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Letters in Applied Microbiology*, *20*(1), 29–33. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00400.x>
- Ravasio, D., Carlin, S., Boekhout, T., Groenewald, M., Vrhovsek, U., Walther, A., & Wendland, J. (2018). Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. *Fermentation*, *4*(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>
- Riedl, R., Goderbauer, P., Brandl, A., Jacob, F., & Hutzler, M. (2017). Bavarian Wheat Beer, an Example of a Special Microbe Habitat – Cultivation, Detection, Biofilm Formation, Characterization of Selected Lactic Acid Bacteria Hygiene Indicators and Spoilers. *Brewing Science*, *70*(February), 39–50.
- Riedl, R., Koob, J., & Hutzler, M. (2013). Microbiologically sensitive beverage - a risk assessment system. *Brauwelt International*, *IV*, 225–231.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Migliano, G., Gasbarrini, A., & Mele, M. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, *7*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Rivaroli, S., Calvo-Porrá, C., & Spadoni, R. (2022). Using food choice questionnaire to explain Millennials' attitudes towards craft beer. *Food Quality and Preference*, *96*. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104408>
- Rivero, D., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. L., Valls-Belles, V., Codoñer, P., & Muñoz, P. (2005). Inhibition of Induced DNA Oxidative Damage by Beers: Correlation with the

- 
- Content of Polyphenols and Melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9). <https://doi.org/10.1021/jf048146v>
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & de Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2019). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 462–473. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>
- Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., Beltran, G., Torija, M.-J., & Moreno-Arribas, M. V. (2021). *Pectinatus* spp. – Unpleasant and recurrent brewing spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 336, 108900. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108900>
- Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. V. (2020). Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. *Food Research International*, 138, 109762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>
- Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., & Moreno-Arribas M.V. (2019). Innovaciones en el flavor, análisis de calidad y de los efectos en la salud de la cerveza artesanal. *Tecnifood*, 124, 82–83.
- Rodríguez-Saavedra, M., Pérez-Revelo, K., Valero, A., Moreno-Arribas, M. V., & González de Llano, D. (2021). A Binary Logistic Regression Model as a Tool to Predict Craft Beer Susceptibility to Microbial Spoilage. *Foods*, 10(8), 1926. <https://doi.org/10.3390/foods10081926>
- Romero, R., Bagur, M. G., Sánchez-Viñas, M., & Gázquez, D. (2003). The influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(2), 162–167. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1885-2>
- Rosales, A., Talaverano, M. I., Lozano, J., Sánchez-Vicente, C., Santamaría, Ó., García-Latorre, C., & Rodrigo, S. (2021). Craft beer vs industrial beer: chemical and sensory differences. *British Food Journal*, ahead-of-print(ahead-of-print). <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2021-0074>

- Ruas-Madiedo, P., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, *88*(3), 843–856. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72750-8)
- Ruiz, P., Celada, L., Seseña, S., & Palop, M. L. (2018). *Leuconostoc mesenteroides* in the brewing process: A controversial role. *Food Control*, *90*, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.019>
- Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Monitoring the influence of high gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(6), 1039–1051. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1645-5>
- Saerens, S., & Swiegers, J. (2014). *Enhancement of beer flavor by a combination of Pichia yeast and different hop varieties* (Patent No. Patent US20140234480 A1). Patent US20140234480 A1.
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, *89*(2–3), 105–124. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)
- Salanță, L. C., Coldea, T. E., Ignat, M. V., Pop, C. R., Tofană, M., Mudura, E., Borșa, A., Pasqualone, A., Anjos, O., & Zhao, H. (2020). Functionality of Special Beer Processes and Potential Health Benefits. *Processes*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/pr8121613>
- Salanță, L. C., Coldea, T. E., Ignat, M. V., Pop, C. R., Tofană, M., Mudura, E., Borșa, A., Pasqualone, A., & Zhao, H. (2020). Non-Alcoholic and Craft Beer Production and Challenges. *Processes*, *8*(11). <https://doi.org/10.3390/pr8111382>
- Sánchez-Muniz, F. J., Macho-González, A., Garcimartín, A., Santos-López, J. A., Benedí, J., Bastida, S., & González-Muñoz, M. J. (2019). The Nutritional Components of Beer and Its Relationship with Neurodegeneration and Alzheimer’s Disease. *Nutrients*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071558>
- Sanna, V., & Pretti, L. (2015). Effect of wine barrel ageing or sapa addition on total polyphenol content and antioxidant activities of some Italian craft beers. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(3), 700–707. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12666>



- Santos, M. A. da S., Ribeiro, P. V. L., Andrade, C. P., Machado, A. R. G., Souza, P. G. de, & Kirsch, L. de S. (2021). Physicochemical and sensory analysis of craft beer made with soursop (*Annona muricata* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 20(1). <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2021.0845>
- Saura, F. D., Goñi, I., Martín, C., & Pulido, R. (2003). Fibra dietética en cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional. *Cerveza y Malta*, 158, 51–60.
- Schabo, D. C., Martins, L. M., Maciel, J. F., Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Schaffner, D. W., & Magnani, M. (2020). Production of aflatoxin B1 and B2 by *Aspergillus flavus* in inoculated wheat using typical craft beer malting conditions. *Food Microbiology*, 89. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103456>
- Schneiderbanger, J., Grammer, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2018). Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 173–181. <https://doi.org/10.1002/jib.486>
- Scopus. (2021, October 2). *Recuperado de* <https://www.elsevier.com/solutions/scopus>. <https://www.elsevier.com/solutions/scopus>
- Sedighi, R., & Alipour, D. (2019). Assessment of probiotic effects of isolated *Megasphaera elsdenii* strains in Mehraban sheep and Holstein lactating cows. *Animal Feed Science and Technology*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.007>
- Shaheen, S., Shorbaji, M., Lorenzo, J. M., & Farag, M. A. (2021). Dissecting dietary melanoidins: formation mechanisms, gut interactions, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1937509>
- Sharp, D. C., Vollmer, D. M., Qian, Y., & Shellhammer, T. H. (2017). Examination of Glycoside Hydrolysis Methods for the Determination of Terpenyl Glycoside Contents of Different Hop Cultivars. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(2). <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-2071-01>
- Shen, T., Yue, Y., He, T., Huang, C., Qu, B., Lv, W., & Lai, H.-Y. (2021). The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson's Disease, a Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.636545>
- Shetty, S. A., Marathe, N. P., Lanjekar, V., Ranade, D., & Shouche, Y. S. (2013). Comparative Genome Analysis of *Megasphaera* sp. Reveals Niche Specialization and Its Potential Role in the Human Gut. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079353>

- Shivaji, S. (2021). A systematic review of gut microbiome and ocular inflammatory diseases: Are they associated? *Indian Journal of Ophthalmology*, 69(3). [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_1362\\_20](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1362_20)
- Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., & Kutralam-Muniasamy, G. (2021). Toward a unified framework for investigating micro(nano)plastics in packaged beverages intended for human consumption. *Environmental Pollution*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115811>
- Siebert, K. J. (1999). Modeling the flavor thresholds of organic acids in beer as a function of their molecular properties. *Food Quality and Preference*, 10(2). [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(98\)00059-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(98)00059-7)
- Silva, P. H. A. da, & Faria, F. C. de. (2008). Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(4). <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400021>
- Simpson, W. J., & Hammond, J. R. M. (1991). Antibacterial action of hop resin materials. In I. Press (Ed.), *Proc. Eur. Brew. Conv. Lisbon* (pp. 185–193).
- Simpson, W. J., & Smith, A. R. W. (1992). Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(4), 327–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01843.x>
- Song, Y., Wu, M., Tao, G., Lu, M., Lin, J., & Huang, J. (2020). Feruloylated oligosaccharides and ferulic acid alter gut microbiome to alleviate diabetic syndrome. *Food Research International*, 137, 109410. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109410>
- Spaggiari, G., Cignarelli, A., Sansone, A., Baldi, M., & Santi, D. (2020). To beer or not to beer: A meta-analysis of the effects of beer consumption on cardiovascular health. *PLOS ONE*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233619>
- Spedding, G., & Aiken, T. (2015). Sensory analysis as a tool for beer quality assessment with an emphasis on its use for microbial control in the brewery. In *Brewing Microbiology* (pp. 375–404). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00018-6>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>

- 
- Steensels, J., & Verstrepen K. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 61–80.
- Sterckx, F. L., Missiaen, J., Saison, D., & Delvaux, F. R. (2011). Contribution of monophenols to beer flavour based on flavour thresholds, interactions, and recombination experiments. *Food Chemistry*, 126(4), 1679–1685. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.055>
- Stewart, G. G. (2006). Studies on the uptake and metabolism of wort sugars during brewing fermentations. *Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly*, 43, 265–269.
- Stewart, G. G., Russell, I., & Anstruther, A. (Eds.). (2017). *Handbook of Brewing*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351228336>
- Storgårds, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R., & Suihko, M. (2006). Microbial Attachment and Biofilm Formation in Brewery Bottling Plants. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64(1), 8–15. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>
- Strong, G., & England, K. (2015). *Beer judge certification program 2015 style guidelines*. <http://www.bjcp.org/stylecenter.php>
- Suzuki, K. (2011). 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(2), 131–155. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>
- Suzuki, K. (2015). 7 - Gram-positive spoilage bacteria in brewing. In *Brewing Microbiology* (Issue 1892). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00007-1>
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., & Kitamoto, K. (2008). Sake and Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 209–223. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00331.x>
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., & Yamashita, H. (2006). A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 173–191. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x>
- Suzuki, K., Koyanagi, M., & Yamashita, H. (2004). Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45C. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02244.x>

- Takasaki, Y., Kitajima, M., Tsuruta, T., Nonoguchi, M., Hayashi, S., & Imada, K. (1991). Maltotriose-producing Amylase from *Microbacterium imperial*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(3). <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870677>
- Tamargo, A., Cueva, C., Álvarez, M. D., Herranz, B., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., & Laguna, L. (2018). Influence of viscosity on the growth of human gut microbiota. *Food Hydrocolloids*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.031>
- Tamargo, A., Cueva, C., Taladrid, D., Khoo, C., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B., & González de Llano, D. (2022). Simulated gastrointestinal digestion of cranberry polyphenols under dynamic conditions. Impact on antiadhesive activity against uropathogenic bacteria. *Food Chemistry*, 368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130871>
- Tamargo García, A., Gil Sánchez, I., Miralles Buraglia, B., Martín García, D., Rodríguez García Risco, M., Fornari Reale, T., Bartolomé Sualdea, B., Moreno Arribas, M. V., & Cueva Sánchez, C. (2017). Simulador gastrointestinal dinámico (simgi®): una herramienta potencialmente útil en nutrición clínica. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.20960/nh.1207>
- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., & Nerancis, E. (2013). Use of non-*Saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 124, 415–426. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1324415T>
- Teixeira, C., Prykhodko, O., Alminger, M., Fåk Hållenius, F., & Nyman, M. (2018). Barley Products of Different Fiber Composition Selectively Change Microbiota Composition in Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(19), 1701023. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701023>
- The Brewers of Europe. (2020). *European Beer Trends - Statistic Report 2020 Edition*. <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2020/european-beer-trends-2020.pdf>
- Thompson Witrick, K., Duncan, S., Hurley, K., & O’Keefe, S. (2017). Acid and Volatiles of Commercially Available Lambic Beers. *Beverages*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/beverages3040051>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11). <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>

- Tipler, A., Reuter, W., & Chadwick, L. (2015). *The analysis of lactic and acetic acids in sour beers by HPLC with PDA detection*. <https://doi.org/https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP-analysis-of-lactic-and-acetic-acids-in-sour-beers-by-HPLC.pdf>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 2049–2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>
- Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. v., & Espín, J. C. (2016). Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 19(6). <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000314>
- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., & Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033>
- Trius-Soler, M., Marhuenda-Muñoz, M., Laveriano-Santos, E. P., Martínez-Huélamo, M., Sasot, G., Storniolo, C. E., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R. M., & Tresserra-Rimbau, A. (2021). Moderate Consumption of Beer (with and without Ethanol) and Menopausal Symptoms: Results from a Parallel Clinical Trial in Postmenopausal Women. *Nutrients*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/nu13072278>
- Uljas, H. E., Schaffner, D. W., Duffy, S., Zhao, L., & Ingham, S. C. (2001). Modeling of Combined Processing Steps for Reducing *Escherichia coli* O157:H7 Populations in Apple Cider. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 133–141. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.133-141.2001>
- Ulloa, P. A., Vidal, J., Ávila, M. I., Labbe, M., Cohen, S., & Salazar, F. N. (2017). Effect of the Addition of Propolis Extract on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Craft Beer. *Journal of Chemistry*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/6716053>
- Unger, M. M., Spiegel, J., Dillmann, K.-U., Grundmann, D., Philippeit, H., Bürmann, J., Faßbender, K., Schwiertz, A., & Schäfer, K.-H. (2016). Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism & Related Disorders*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019>
- Valero, A., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2006). Growth/no growth model of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH,

- 
- citric acid, and ascorbic acid. *European Food Research and Technology*, 224(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0293-1>
- van Breemen, R. B., Yuan, Y., Banuvar, S., Shulman, L. P., Qiu, X., Alvarenga, R. F. R., Chen, S.-N., Dietz, B. M., Bolton, J. L., Pauli, G. F., Krause, E., Viana, M., & Nikolic, D. (2014). Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(10). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400245>
- van Rijswijck, I. M. H., van Mastrigt, O., Pijffers, G., Wolkers – Rooijackers, J. C. M., Abee, T., Zwietering, M. H., & Smid, E. J. (2019). Dynamic modelling of brewers' yeast and *Cyberlindnera fabianii* co-culture behaviour for steering fermentation performance. *Food Microbiology*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.010>
- Vanbeneden, N., van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chemistry*, 111(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.029>
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., & Verachtert, H. (2003). Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2–3). <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1340-5>
- Vasas, M., Tang, F., & Hatzakis, E. (2021). Application of NMR and Chemometrics for the Profiling and Classification of Ale and Lager American Craft Beer. *Foods*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040807>
- Vaughan, A., Eijsink, V. G. H., O'Sullivan, T. F., O'Hanlon, K., & van Sinderen, D. (2001). An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 131–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01365.x>
- Vaughan, A., O'Sullivan, T., & van Sinderen, D. (2005). Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), 355–371. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>
- Verbeke, K. A., Boobis, A. R., Chiodini, A., Edwards, C. A., Franck, A., Kleerebezem, M., Nauta, A., Raes, J., van Tol, E. A. F., & Tuohy, K. M. (2015). Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 28(1), 42–66. <https://doi.org/10.1017/S0954422415000037>

- Vermeulen, A., Devlieghere, F., Bernaerts, K., van Impe, J., & Debevere, J. (2007). Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sauces. *International Journal of Food Microbiology*, *119*(3), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.003>
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *96*(2). [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
- Vidgren, V., & Londesborough, J. (2011). 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*(4), 475–487. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00495.x>
- Vinson, J. A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J. R., & Bose, P. (2003). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Beers and the Effect of Two Types of Beer on an Animal Model of Atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5528–5533. <https://doi.org/10.1021/jf034189k>
- Walters, W. A., Xu, Z., & Knight, R. (2014). Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Letters*, *588*(22). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.039>
- Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2013). Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-42>
- Wang, Y., Ames, N., Tun, H., Tosh, S., Jones, P., & Khafipour, E. (2016). High Molecular Weight Barley  $\beta$ -Glucan Alters Gut Microbiota Toward Reduced Cardiovascular Disease Risk. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00129>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>
- Wei, J., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, W., Doherty, M., Yang, T., Zhai, G., Obotiba, A. D., Lyu, H., Zeng, C., & Lei, G. (2021). Association Between Gut Microbiota and Symptomatic Hand Osteoarthritis: Data from the Xiangya Osteoarthritis Study. *Arthritis & Rheumatology*, *73*(9). <https://doi.org/10.1002/art.41729>

- Wexler, A. G., & Goodman, A. L. (2017). An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nature Microbiology*, 2(5). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>
- WHO. (2018). Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Willaert, Ronnie. (2007). The beer brewing process: Wort production and beer. In *Handbook of Food Products Manufacturing* (Vol. 2, pp. 443–490).
- Zdaniewicz, M., Satora, P., Pater, A., & Bogacz, S. (2020). Low Lactic Acid-Producing Strain of *Lachancea thermotolerans* as a New Starter for Beer Production. *Biomolecules*, 10(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom10020256>
- Zhang, Y., Lu, S., Yang, Y., Wang, Z., Wang, B., Zhang, B., Yu, J., Lu, W., Pan, M., Zhao, J., Guo, S., Cheng, J., Chen, X., Hong, K., Li, G., & Yu, Z. (2021). The diversity of gut microbiota in type 2 diabetes with or without cognitive impairment. *Aging Clinical and Experimental Research*, 33(3). <https://doi.org/10.1007/s40520-020-01553-9>
- Zhao, H. (2015). Effects of Processing Stages on the Profile of Phenolic Compounds in Beer. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 533–539). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00064-0>
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119(3), 1150–1158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.028>
- Zhao, H., Li, H., Sun, G., Yang, B., & Zhao, M. (2013). Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4). <https://doi.org/10.1002/jsfa.5824>
- Zhao, Y., Knøchel, S., & Siegumfeldt, H. (2017). Heterogeneity between and within Strains of *Lactobacillus brevis* Exposed to Beer Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 08. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00239>
- Zheng, F., Niu, C., Tang, D., Liu, C., Li, Y., Wang, J., & Li, Q. (2018). Monitoring the Microbial Conditions in Breweries in Yangtze River Delta Region, China. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 76(2), 125–129. <https://doi.org/10.1080/03610470.2017.1398509>
- Zhong, Y., Marungruang, N., Fåk, F., & Nyman, M. (2015). Effects of two whole-grain barley varieties on caecal SCFA, gut microbiota and plasma inflammatory markers in rats



consuming low- and high-fat diets. *British Journal of Nutrition*, 113(10).  
<https://doi.org/10.1017/S0007114515000793>

Zhong, Y., Nyman, M., & Fåk, F. (2015). Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(10). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500187>



*Anexo I*



**Datos para el desarrollo del modelo de regresión logística binaria**

<b>Nº Ensayo</b>	<b>Réplica</b>	<b>Factor</b>	<b>% ABV</b>	<b>IBU</b>	<b>pH</b>	<b>% YFE</b>	<b>Cepa</b>	<b>G/NG</b>
1	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	B1	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	B1	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	B1	1
2	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B1	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B1	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B1	1
3	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	B1	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	B1	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	B1	1
4	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B1	0
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B1	0
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B1	0
5	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	B1	0
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	B1	0
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	B1	0
6	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	B1	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	B1	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	B1	0
7	1	% ABV	0	11	4,2	2,37	B2	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	B2	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	B2	1
8	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B2	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B2	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B2	1
9	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	B2	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	B2	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	B2	1
10	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B2	0
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B2	0
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B2	0
11	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	B2	0
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	B2	0
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	B2	0
12	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	B2	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	B2	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	B2	0
13	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	F2	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	F2	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	F2	1
14	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	F2	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	F2	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	F2	1
15	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	F2	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	F2	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	F2	0
16	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	F2	0
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	F2	0
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	F2	0
17	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	F2	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	F2	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	F2	0
18	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	F1	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	F1	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	F1	1
19	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	F1	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	F1	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	F1	1
20	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	F1	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	F1	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	F1	1
21	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	F1	0
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	F1	0
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	F1	0
22	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	F1	0
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	F1	0

	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	F1	0
23	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	F1	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	F2	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	F2	0
24	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	B6	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	B6	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	B6	1
25	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B6	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B6	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	B6	1
26	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	B6	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	B6	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	B6	1
27	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B6	0
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B6	0
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	B6	0
28	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	B6	0
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	B6	0
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	B6	0
29	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	B6	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	B6	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	B6	0
30	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	216	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	216	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	216	1
31	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	216	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	216	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	216	1
32	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	216	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	216	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	216	1
33	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	216	1
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	216	1
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	216	1
34	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	216	1
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	216	1
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	216	1
35	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	216	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	216	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	216	0
36	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	D1	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	D1	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	D1	1
37	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	D1	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	D1	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	D1	1
38	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	D1	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	D1	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	D1	1
39	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	D1	1
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	D1	1
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	D1	1
40	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	D1	1
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	D1	1
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	D1	1
41	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	D1	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	D1	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	D1	0
42	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	L1	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	L1	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	L1	1
43	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	L1	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	L1	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	L1	1
44	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	L1	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	L1	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	L1	1

45	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	L1	1
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	L1	1
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	L1	1
46	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	L1	1
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	L1	1
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	L1	1
47	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	L1	0
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	L1	0
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	L1	0
48	1	%ABV	0	11	4,2	2,37	H2	1
	2	%ABV	0	11	4,2	2,37	H2	1
	3	%ABV	0	11	4,2	2,37	H2	1
49	1	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	H2	1
	2	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	H2	1
	3	%ABV	2,5	11	4,2	2,37	H2	1
50	1	%ABV	5	11	4,2	2,37	H2	1
	2	%ABV	5	11	4,2	2,37	H2	1
	3	%ABV	5	11	4,2	2,37	H2	1
51	1	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	H2	1
	2	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	H2	1
	3	%ABV	7,5	11	4,2	2,37	H2	1
52	1	%ABV	10	11	4,2	2,37	H2	1
	2	%ABV	10	11	4,2	2,37	H2	1
	3	%ABV	10	11	4,2	2,37	H2	1
53	1	%ABV	12	11	4,2	2,37	H2	1
	2	%ABV	12	11	4,2	2,37	H2	1
	3	%ABV	12	11	4,2	2,37	H2	1
54	1	IBU	0,1	10	4,2	2	B1	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	B1	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	B1	1
55	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B1	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B1	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B1	1
56	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B1	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B1	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B1	1
57	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B1	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B1	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B1	1
58	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B1	0
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B1	0
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B1	0
59	1	IBU	0,1	50	4,6	3	B1	0
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	B1	0
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	B1	0
60	1	IBU	0,1	10	4,2	2	B2	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	B2	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	B2	1
61	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B2	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B2	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B2	1
62	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B2	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B2	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B2	1
63	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B2	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B2	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B2	1
64	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B2	0
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B2	0
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B2	0
65	1	IBU	0,1	50	4,6	3	B2	0
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	B2	0
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	B2	0
66	1	IBU	0,1	10	4,2	2	F2	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	F2	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	F2	1
67	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	F2	1

	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	F2	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	F2	1
68	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	F2	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	F2	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	F2	1
69	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	F2	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	F2	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	F2	1
70	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	F2	1
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	F2	1
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	F2	1
71	1	IBU	0,1	50	4,6	3	F2	1
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	F2	1
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	F2	1
72	1	IBU	0,1	10	4,2	2	F1	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	F1	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	F1	1
73	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	F1	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	F1	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	F1	1
74	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	F1	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	F1	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	F1	1
75	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	F1	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	F1	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	F1	1
76	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	F1	0
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	F1	0
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	F1	0
77	1	IBU	0,1	50	4,6	3	F1	0
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	F1	0
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	F1	0
78	1	IBU	0,1	10	4,2	2	B6	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	B6	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	B6	1
79	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B6	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B6	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	B6	1
80	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B6	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B6	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	B6	1
81	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B6	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B6	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	B6	1
82	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B6	1
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B6	1
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	B6	1
83	1	IBU	0,1	50	4,6	3	B6	1
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	B6	1
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	B6	0
84	1	IBU	0,1	10	4,2	2	216	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	216	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	216	1
85	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	216	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	216	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	216	1
86	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	216	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	216	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	216	1
87	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	216	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	216	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	216	1
88	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	216	1
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	216	1
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	216	1
89	1	IBU	0,1	50	4,6	3	216	1
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	216	1



	3	IBU	0,1	50	4,6	3	216	1
90	1	IBU	0,1	10	4,2	2	D1	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	D1	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	D1	1
91	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	D1	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	D1	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	D1	1
92	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	D1	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	D1	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	D1	1
93	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	D1	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	D1	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	D1	1
94	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	D1	1
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	D1	1
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	D1	1
95	1	IBU	0,1	50	4,6	3	D1	1
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	D1	1
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	D1	1
96	1	IBU	0,1	10	4,2	2	L1	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	L1	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	L1	1
97	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	L1	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	L1	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	L1	1
98	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	L1	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	L1	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	L1	1
99	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	L1	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	L1	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	L1	1
100	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	L1	1
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	L1	1
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	L1	1
101	1	IBU	0,1	50	4,6	3	L1	1
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	L1	1
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	L1	1
102	1	IBU	0,1	10	4,2	2	H2	1
	2	IBU	0,1	10	4,2	2	H2	1
	3	IBU	0,1	10	4,2	2	H2	1
103	1	IBU	0,1	15	4,3	2,2	H2	1
	2	IBU	0,1	15	4,3	2,2	H2	1
	3	IBU	0,1	15	4,3	2,2	H2	1
104	1	IBU	0,1	20	4,4	2,4	H2	1
	2	IBU	0,1	20	4,4	2,4	H2	1
	3	IBU	0,1	20	4,4	2,4	H2	1
105	1	IBU	0,1	30	4,5	2,6	H2	1
	2	IBU	0,1	30	4,5	2,6	H2	1
	3	IBU	0,1	30	4,5	2,6	H2	1
106	1	IBU	0,1	40	4,55	2,8	H2	1
	2	IBU	0,1	40	4,55	2,8	H2	1
	3	IBU	0,1	40	4,55	2,8	H2	1
107	1	IBU	0,1	50	4,6	3	H2	1
	2	IBU	0,1	50	4,6	3	H2	1
	3	IBU	0,1	50	4,6	3	H2	1
108	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	B1	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	B1	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	B1	0
109	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	B1	0
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	B1	0
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	B1	0
110	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	B1	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	B1	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	B1	0
111	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	B1	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	B1	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	B1	1

112	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	B1	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	B1	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	B1	1
113	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	B1	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	B1	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	B1	1
114	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	B2	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	B2	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	B2	0
115	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	B2	1
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	B2	1
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	B2	0
116	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	B2	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	B2	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	B2	1
117	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	B2	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	B2	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	B2	1
118	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	B2	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	B2	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	B2	1
119	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	B2	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	B2	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	B2	1
120	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	F2	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	F2	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	F2	0
121	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	F2	1
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	F2	1
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	F2	0
122	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	F2	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	F2	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	F2	1
123	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	F2	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	F2	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	F2	1
124	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	F2	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	F2	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	F2	1
125	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	F2	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	F2	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	F2	1
126	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	F1	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	F1	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	F1	0
127	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	F1	1
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	F1	1
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	F1	0
128	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	F1	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	F1	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	F1	1
129	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	F1	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	F1	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	F1	1
130	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	F1	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	F1	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	F1	1
131	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	F1	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	F1	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	F1	1
132	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	B6	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	B6	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	B6	0
133	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	B6	0
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	B6	0
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	B6	0
134	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	B6	0

	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	B6	0
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	B6	0
135	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	B6	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	B6	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	B6	1
136	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	B6	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	B6	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	B6	1
137	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	B6	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	B6	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	B6	1
138	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	216	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	216	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	216	0
139	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	216	1
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	216	1
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	216	0
140	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	216	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	216	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	216	1
141	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	216	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	216	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	216	1
142	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	216	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	216	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	216	1
143	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	216	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	216	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	216	1
144	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	D1	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	D1	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	D1	0
145	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	D1	1
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	D1	1
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	D1	0
146	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	D1	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	D1	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	D1	1
147	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	D1	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	D1	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	D1	1
148	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	D1	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	D1	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	D1	1
149	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	D1	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	D1	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	D1	1
150	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	L1	0
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	L1	0
	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	L1	0
151	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	L1	0
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	L1	0
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	L1	0
152	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	L1	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	L1	0
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	L1	1
153	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	L1	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	L1	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	L1	1
154	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	L1	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	L1	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	L1	1
155	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	L1	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	L1	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	L1	1
156	1	pH	0,5	11	3,2	1,45	H2	1
	2	pH	0,5	11	3,2	1,45	H2	1

	3	pH	0,5	11	3,2	1,45	H2	0
157	1	pH	0,5	11	3,5	1,45	H2	1
	2	pH	0,5	11	3,5	1,45	H2	1
	3	pH	0,5	11	3,5	1,45	H2	1
158	1	pH	0,5	11	3,8	1,45	H2	1
	2	pH	0,5	11	3,8	1,45	H2	1
	3	pH	0,5	11	3,8	1,45	H2	1
159	1	pH	0,5	11	4,1	1,45	H2	1
	2	pH	0,5	11	4,1	1,45	H2	1
	3	pH	0,5	11	4,1	1,45	H2	1
160	1	pH	0,5	11	4,4	1,45	H2	1
	2	pH	0,5	11	4,4	1,45	H2	1
	3	pH	0,5	11	4,4	1,45	H2	1
161	1	pH	0,5	11	4,7	1,45	H2	1
	2	pH	0,5	11	4,7	1,45	H2	1
	3	pH	0,5	11	4,7	1,45	H2	1
162	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B1	1
163	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B1	1
164	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B1	1
165	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B1	1
166	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B2	1
167	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B2	1
168	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B2	1
169	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B2	1
170	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	F2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	F2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	F2	1
171	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	F2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	F2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	F2	1
172	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	F2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	F2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	F2	1
173	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	F2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	F2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	F2	1
174	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	F1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	F1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	F1	1
175	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	F1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	F1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	F1	1
176	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	F1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	F1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	F1	1
177	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	F1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	F1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	F1	1
178	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B6	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B6	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	B6	1

179	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B6	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B6	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	B6	1
180	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B6	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B6	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	B6	1
177	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B6	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B6	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	B6	1
182	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	216	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	216	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	216	1
183	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	216	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	216	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	216	1
184	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	216	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	216	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	216	1
185	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	216	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	216	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	216	1
186	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	D1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	D1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	D1	1
187	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	D1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	D1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	D1	1
188	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	D1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	D1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	D1	1
189	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	D1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	D1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	D1	1
190	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	L1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	L1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	L1	1
191	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	L1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	L1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	L1	1
192	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	L1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	L1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	L1	1
193	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	L1	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	L1	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	L1	1
194	1	YFE	0,1	10	4,2	0,76	H2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	0,76	H2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	0,76	H2	1
195	1	YFE	0,1	10	4,2	1,16	H2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,16	H2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,16	H2	1
196	1	YFE	0,1	10	4,2	1,96	H2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	1,96	H2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	1,96	H2	1
197	1	YFE	0,1	10	4,2	2,36	H2	1
	2	YFE	0,1	10	4,2	2,36	H2	1
	3	YFE	0,1	10	4,2	2,36	H2	1
198	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	H2	1
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	H2	1
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	H2	1
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	H2	1
199	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	B1	0
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	B1	1
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	B1	0
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	B1	0
200	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	B2	0
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	B2	1

	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	B2	0
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	B2	0
201	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	B6	1
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	B6	1
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	B6	1
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	B6	1
202	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	F2	0
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	F2	0
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	F2	1
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	F2	0
203	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	216	1
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	216	1
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	216	1
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	216	1
204	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	L1	1
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	L1	1
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	L1	1
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	L1	1
205	1	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	D1	1
	2	Stout A Botella 1	4,2	31	4,27	1,37	D1	1
	3	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	D1	1
	4	Stout A Botella 2	4,2	31	4,27	1,37	D1	1
206	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	H2	1
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	H2	1
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	H2	1
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	H2	1
207	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	B1	0
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	B1	0
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	B1	0
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	B1	0
208	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	B2	0
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	B2	0
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	B2	0
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	B2	0
209	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	B6	0
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	B6	0
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	B6	0
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	B6	0
210	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	F2	0
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	F2	0
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	F2	1
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	F2	0
211	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	216	1
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	216	1
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	216	1
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	216	1
212	1	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	L1	1
	2	Stout B Botella 1	9	44	4,37	1,26	L1	1
	3	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	L1	1
	4	Stout B Botella 2	9	44	4,37	1,26	L1	1
213	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	H2	1
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	H2	1
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	H2	1
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	H2	1
214	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	B1	0
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	B1	0
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	B1	0
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	B1	0
215	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	B2	1
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	B2	1
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	B2	0
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	B2	1
216	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	B6	1
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	B6	0
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	B6	1
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	B6	1
217	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	F2	1

	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	F2	0
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	F2	1
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	F2	1
218	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	216	1
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	216	1
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	216	1
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	216	1
219	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	L1	1
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	L1	1
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	L1	1
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	L1	1
220	1	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	D1	1
	2	Porter A Botella 1	5,9	22	4,08	1,31	D1	1
	3	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	D1	1
	4	Porter A Botella 2	5,9	22	4,08	1,31	D1	1
221	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	H2	1
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	H2	1
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	H2	1
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	H2	1
222	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	B1	0
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	B1	0
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	B1	0
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	B1	0
223	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	B2	1
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	B2	1
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	B2	0
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	B2	1
224	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	B6	1
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	B6	1
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	B6	0
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	B6	1
225	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	F2	0
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	F2	0
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	F2	0
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	F2	0
226	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	216	1
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	216	1
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	216	1
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	216	1
227	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	L1	1
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	L1	1
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	L1	1
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	L1	1
228	1	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	D1	1
	2	Porter B Botella 1	5	29	4,14	0,18	D1	1
	3	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	D1	1
	4	Porter B Botella 2	5	29	4,14	0,18	D1	1
229	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	H2	1
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	H2	1
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	H2	1
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	H2	1
230	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	B1	0
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	B1	1
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	B1	0
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	B1	0
231	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	B2	0
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	B2	1
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	B2	0
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	B2	0
232	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	B6	0
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	B6	0
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	B6	0
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	B6	0
233	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	F2	0
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	F2	0
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	F2	0
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	F2	0

234	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	216	1
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	216	1
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	216	1
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	216	1
235	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	L1	1
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	L1	1
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	L1	1
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	L1	1
236	1	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	D1	1
	2	Brown Ale A Bot1	4,3	21	4,17	0,74	D1	1
	3	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	D1	1
	4	Brown Ale A Bot2	4,3	21	4,17	0,74	D1	1
237	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	H2	1
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	H2	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	H2	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	H2	1
238	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	B1	0
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	B1	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	B1	0
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	B1	0
239	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	B2	1
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	B2	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	B2	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	B2	1
240	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	B6	1
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	B6	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	B6	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	B6	1
241	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	F2	0
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	F2	0
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	F2	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	F2	0
242	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	216	1
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	216	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	216	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	216	1
243	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	L1	1
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	L1	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	L1	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	L1	1
244	1	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	D1	1
	2	Brown Ale B Bot 1	5,2	44	4,46	1,45	D1	1
	3	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	D1	1
	4	Brown Ale B Bot 2	5,2	44	4,46	1,45	D1	1
245	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	H2	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	H2	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	H2	1
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	H2	1
246	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	B1	0
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	B1	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	B1	0
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	B1	0
247	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	B2	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	B2	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	B2	1
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	B2	1
248	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	B6	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	B6	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	B6	1
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	B6	1
249	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	F2	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	F2	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	F2	1
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	F2	1
250	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	216	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	216	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	216	1



	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	216	1
251	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	L1	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	L1	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	L1	1
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	L1	1
252	1	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	D1	1
	2	Amber Ale A Bot 1	5,5	24	4,25	0,55	D1	1
	3	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	D1	1
	4	Amber Ale A Bot 2	5,5	24	4,25	0,55	D1	1
253	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	H2	1
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	H2	1
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	H2	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	H2	1
254	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	B1	0
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	B1	0
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	B1	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	B1	0
255	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	B2	1
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	B2	1
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	B2	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	B2	1
256	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	B6	1
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	B6	1
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	B6	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	B6	1
257	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	F2	0
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	F2	0
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	F2	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	F2	0
258	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	216	1
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	216	1
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	216	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	216	1
259	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	L1	1
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	L1	1
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	L1	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	L1	1
260	1	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	D1	1
	2	Amber Ale B Bot 1	5,8	31	4,26	0,71	D1	1
	3	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	D1	1
	4	Amber Ale B Bot 2	5,8	31	4,26	0,71	D1	1
261	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	H2	1
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	H2	1
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	H2	1
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	H2	1
262	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	B1	0
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	B1	0
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	B1	0
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	B1	0
263	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	B2	0
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	B2	0
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	B2	0
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	B2	0
264	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	B6	0
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	B6	0
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	B6	0
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	B6	0
265	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	F2	0
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	F2	0
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	F2	0
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	F2	0
266	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	216	1
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	216	1
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	216	1
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	216	1
267	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	L1	1
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	L1	1

	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	L1	1
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	L1	1
267	1	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	D1	0
	2	IPA A Botella 1	7,2	74	4,32	1,73	D1	1
	3	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	D1	0
	4	IPA A Botella 2	7,2	74	4,32	1,73	D1	0
269	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	H2	1
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	H2	1
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	H2	1
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	H2	1
270	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	B1	0
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	B1	0
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	B1	0
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	B1	0
271	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	B2	0
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	B2	0
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	B2	0
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	B2	0
272	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	B6	0
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	B6	0
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	B6	0
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	B6	0
273	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	F2	0
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	F2	0
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	F2	0
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	F2	0
274	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	216	1
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	216	1
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	216	1
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	216	1
275	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	L1	1
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	L1	1
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	L1	1
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	L1	1
276	1	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	D1	0
	2	IPA B Botella 1	8,5	75	4,7	0,92	D1	0
	3	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	D1	0
	4	IPA B Botella 2	8,5	75	4,7	0,92	D1	1
277	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	H2	1
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	H2	1
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	H2	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	H2	1
278	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	B1	0
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	B1	0
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	B1	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	B1	0
279	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	B2	1
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	B2	1
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	B2	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	B2	1
280	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	B6	1
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	B6	1
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	B6	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	B6	1
281	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	F2	0
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	F2	0
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	F2	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	F2	0
282	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	216	1
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	216	1
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	216	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	216	1
283	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	L1	1
	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	L1	1
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	L1	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	L1	1
284	1	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	D1	1

	2	Strong Ale A Bot 1	6,5	16	4,2	2,65	D1	1
	3	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	D1	1
	4	Strong Ale A Bot 2	6,5	16	4,2	2,65	D1	1
285	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	H2	1
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	H2	1
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	H2	1
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	H2	1
286	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	B1	0
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	B1	0
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	B1	0
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	B1	0
287	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	B2	0
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	B2	0
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	B2	0
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	B2	0
288	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	F2	0
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	F2	0
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	F2	1
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	F2	0
289	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	216	1
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	216	1
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	216	1
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	216	1
290	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	L1	1
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	L1	1
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	L1	1
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	L1	1
291	1	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	D1	1
	2	Strong Ale B Bot 1	10	25	4,44	1,73	D1	1
	3	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	D1	1
	4	Strong Ale B Bot 2	10	25	4,44	1,73	D1	1
292	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	H2	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	H2	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	H2	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	H2	1
293	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B1	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B1	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B1	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B1	1
294	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B2	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B2	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B2	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B2	1
295	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B6	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B6	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B6	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	B6	1
296	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	F2	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	F2	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	F2	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	F2	1
297	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	216	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	216	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	216	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	216	1
298	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	L1	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	L1	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	L1	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	L1	1
299	1	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	D1	1
	2	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	D1	1
	3	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	D1	1
	4	Non alcoholic A	0,25	11	4,2	2,37	D1	1
300	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	H2	1
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	H2	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	H2	1
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	H2	1

301	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	B1	0
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	B1	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	B1	0
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	B1	0
302	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	B2	1
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	B2	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	B2	1
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	B2	1
303	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	B6	0
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	B6	0
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	B6	0
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	B6	1
304	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	F2	0
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	F2	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	F2	0
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	F2	0
305	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	216	1
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	216	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	216	1
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	216	1
306	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	L1	1
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	L1	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	L1	1
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	L1	1
307	1	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	D1	1
	2	Wheat A Botella 1	5,5	15	4,29	1	D1	1
	3	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	D1	1
	4	Wheat A Botella 2	5,5	15	4,29	1	D1	1
308	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	H2	1
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	H2	1
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	H2	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	H2	1
309	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	B1	0
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	B1	0
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	B1	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	B1	0
310	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	B2	0
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	B2	0
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	B2	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	B2	0
311	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	B6	1
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	B6	1
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	B6	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	B6	1
312	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	F2	0
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	F2	0
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	F2	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	F2	0
313	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	216	0
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	216	0
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	216	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	216	0
314	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	L1	0
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	L1	0
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	L1	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	L1	0
315	1	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	D1	0
	2	Wheat B Bot 1	3,8	12	3,14	2,37	D1	0
	3	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	D1	0
	4	Wheat B Bot 2	3,8	12	3,14	2,37	D1	0
316	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	H2	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	H2	1
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	H2	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	H2	0
317	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	B1	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	B1	0
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	B1	0

	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	B1	0
318	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	B2	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	B2	0
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	B2	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	B2	0
319	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	B6	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	B6	0
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	B6	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	B6	0
320	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	F2	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	F2	0
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	F2	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	F2	0
321	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	216	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	216	0
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	216	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	216	0
322	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	L1	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	L1	1
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	L1	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	L1	0
323	1	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	D1	0
	2	Bock A Botella 1	12	25	4,66	1,68	D1	0
	3	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	D1	0
	4	Bock A Botella 2	12	25	4,66	1,68	D1	0
324	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	H2	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	H2	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	H2	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	H2	1
325	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	B1	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	B1	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	B1	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	B1	1
326	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	B2	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	B2	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	B2	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	B2	1
327	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	B6	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	B6	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	B6	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	B6	1
328	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	F2	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	F2	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	F2	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	F2	1
329	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	216	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	216	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	216	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	216	1
330	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	L1	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	L1	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	L1	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	L1	1
331	1	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	D1	1
	2	Bock B Botella 1	7	10	4,23	0,76	D1	1
	3	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	D1	1
	4	Bock B Botella 2	7	10	4,23	0,76	D1	1

(Bot), botella.



*Anexo II*





*Datos para la Validación externa del modelo y probabilidad observada y predicha*

Nº ensayo	Muestra	Estilo de cerveza	% ABV	IBU	pH	% YFE	Cepa	Resultados G/NG	Probabilidad observada	Probabilidad predicha		
1	Cerveza 1	Blond Ale	4.5	33	4.68	0.67	L1	1	66.66%	*Muy susceptible	90.4%	*Muy susceptible
2			4.5	33	4.68	0.67	D1	1				
3			4.5	33	4.68	0.67	216	1				
4			4.5	33	4.68	0.67	B1	0				
5			4.5	33	4.68	0.67	B2	1				
6			4.5	33	4.68	0.67	B6	0				
7			4.5	33	4.68	0.67	F2	1				
8			4.5	33	4.68	0.67	F1	0				
9			4.5	33	4.68	0.67	H2	1				
10	Cerveza 2	Sin alcohol	0.04	30	4.15	2.76	L1	1	100%	*Muy susceptible	90.35%	*Muy susceptible
11			0.04	30	4.15	2.76	D1	1				
12			0.04	30	4.15	2.76	216	1				
13			0.04	30	4.15	2.76	B1	1				
14			0.04	30	4.15	2.76	B2	1				
15			0.04	30	4.15	2.76	B6	1				
16			0.04	30	4.15	2.76	F2	1				
17			0.04	30	4.15	2.76	F1	1				
18			0.04	30	4.15	2.76	H2	1				
19	Cerveza 3	Brown Ale	4.7	18	4.5	0.91	L1	1	100%	*Muy susceptible	90.33%	*Muy susceptible
20			4.7	18	4.5	0.91	D1	1				
21			4.7	18	4.5	0.91	216	1				
22			4.7	18	4.5	0.91	B1	1				
23			4.7	18	4.5	0.91	B2	1				
24			4.7	18	4.5	0.91	B6	1				
25			4.7	18	4.5	0.91	F2	1				
26			4.7	18	4.5	0.91	F1	1				
27			4.7	18	4.5	0.91	H2	1				
28	Cerveza 4	Lager Helles	4.5	30	4.63	0.24	L1	1	55.55%	*Muy susceptible	90.12%	*Muy susceptible
29			4.5	30	4.63	0.24	D1	1				
30			4.5	30	4.63	0.24	216	1				
31			4.5	32	4.63	0.24	B1	0				
32			4.5	32	4.63	0.24	B2	0				
33			4.5	32	4.63	0.24	B6	0				
34			4.5	32	4.63	0.24	F2	1				
35			4.5	32	4.63	0.24	F1	0				
36			4.5	32	4.63	0.24	H2	1				
37	Cerveza 5	IPA	6	30	4.61	0.21	L1	1	55.55%	*Muy susceptible	83.59%	*Muy susceptible
38			6	30	4.61	0.21	D1	1				
39			6	30	4.61	0.21	216	1				
40			6	30	4.61	0.21	B1	0				
41			6	30	4.61	0.21	B2	0				
42			6	30	4.61	0.21	B6	0				
43			6	30	4.61	0.21	F2	1				
44			6	30	4.61	0.21	F1	0				
45			6	30	4.61	0.21	H2	1				
46	Cerveza 6	Porter	4.9	33	4.49	0.72	L1	1	88.88%	*Muy susceptible	81.81%	*Muy susceptible
47			4.9	33	4.49	0.72	D1	1				
48			4.9	33	4.49	0.72	216	1				
49			4.9	33	4.49	0.72	B1	0				
50			4.9	33	4.49	0.72	B2	1				
51			4.9	33	4.49	0.72	B6	1				
52			4.9	33	4.49	0.72	F2	1				
53			4.9	33	4.49	0.72	F1	1				
54			4.9	33	4.49	0.72	H2	1				

55	Cerveza 7	Pale Ale	5.2	30	4.32	0.88	L1	1	100%	*Muy susceptible	72.88%	*Muy susceptible
56			5.2	30	4.32	0.88	D1	1				
57			5.2	30	4.32	0.88	216	1				
58			5.2	30	4.32	0.88	B1	1				
59			5.2	30	4.32	0.88	B2	1				
60			5.2	30	4.32	0.88	B6	1				
61			5.2	30	4.32	0.88	F2	1				
62			5.2	30	4.32	0.88	F1	1				
63			5.2	30	4.32	0.88	H2	1				
64			Cerveza 8	Stout	7	26	4.46	1.65				
65	7	26			4.46	1.65	D1	1				
66	7	26			4.46	1.65	216	1				
67	7	26			4.46	1.65	B1	0				
68	7	26			4.46	1.65	B2	1				
69	7	26			4.46	1.65	B6	0				
70	7	26			4.46	1.65	F2	1				
71	7	26			4.46	1.65	F1	1				
72	7	26			4.46	1.65	H2	1				
73	Cerveza 9	English IPA	5.1	44	4.44	1.63	L1	1	55.55%	*Muy susceptible	69.3%	*Muy susceptible
74			5.1	44	4.44	1.63	D1	1				
75			5.1	44	4.44	1.63	216	1				
76			5.1	44	4.44	1.63	B1	0				
77			5.1	44	4.44	1.63	B2	0				
78			5.1	44	4.44	1.63	B6	0				
79			5.1	44	4.44	1.63	F2	1				
80			5.1	44	4.44	1.63	F1	0				
81			5.1	44	4.44	1.63	H2	1				
82	Cerveza 10	Barley Wine	6.5	10	3.47	0.96	L1	0	0%	^Poco susceptible	21.28%	^Poco susceptible
83			6.5	10	3.47	0.96	D1	0				
84			6.5	10	3.47	0.96	216	0				
85			6.5	10	3.47	0.96	B1	0				
86			6.5	10	3.47	0.96	B2	0				
87			6.5	10	3.47	0.96	B6	0				
88			6.5	10	3.47	0.96	F2	0				
89			6.5	10	3.47	0.96	F1	0				
90			6.5	10	3.47	0.96	H2	0				
*Muy susceptible: La probabilidad predicha es > al valor de corte; ^Poco susceptible: La probabilidad predicha es < al valor de corte.									% predicho correctamente	100%		



*Anexo III*





## Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety

Magaly Rodríguez-Saavedra, Dolores González de Llano, M. Victoria Moreno-Arribas\*

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, c/Nicolás Cabrera, 9. Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Craft beer microbiota  
Contamination  
Lactic acid bacteria  
Biofilm  
Hop resistance  
Biogenic amine

### ABSTRACT

Craft beer is more susceptible to microbial spoilage because it does not have a pasteurization or filtration process, with lactic acid bacteria (LAB) being the most common beer spoilage microorganism. The aim of this study was to isolate LAB in a craft brewery and their characterization from a food safety and microbiological quality perspective, with a special focus on their abilities to produce biogenic amines (BA) and spoil the beer. The results of 60 monitored points inside the craft brewery showed that LAB associated with the craft brewing processes belonged to *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* genera, and most of them were detected in the filling area, which can lead to secondary contamination. Two isolates of *L. brevis* showed the most significant beer spoilage ability because they could grow in more acidic conditions, at a higher hop and alcohol content, and they displayed *horA*, *horC*, and *hitA* genes, which spoiled the vast majority of the tested beers. In addition, the aforementioned *L. brevis* isolates showed the highest BA production.

### 1. Introduction

Over the last few years craft beer consumption has grown in popularity in parallel with low-alcohol and alcohol-free beers, all of which are potentially prone to microbial spoilage. Craft beer, unlike large-scale breweries beer, is more susceptible to spoilage because it is typically not pasteurized or sterile filtered. The microbiota associated with the organic raw materials and unconventional starch-rich ingredients added to get a unique beer aroma and taste such as fruits, herbs, honey, spices, and vegetables, increase the risk of spoilage. Furthermore, craft brewers often lack the benefits of a well-resourced microbiological laboratory, and cold storage is not guaranteed throughout their distribution and retail chains either, whereas large-scale breweries rely on very stringent practices to limit spoilage risk.

Contamination by lactic acid bacteria (LAB) is insidious, and is still an unresolved issue, especially in craft beer production since it may linger on brewing surfaces due to the ability of some LAB to form biofilms (Garofalo et al., 2015), and also as many craft breweries currently have not properly implemented microbiological plans that include reliable and standardized methods for the early detection of beer spoilage bacteria. *Lactobacillus brevis*, *L. paracasei*, *L. backii* and

*Pediococcus damnosus* are the most common LAB which have caused the greatest number of incidences of beer spoilage (Schneiderbanger et al., 2018). LAB detection rates in beer samples have been reported of around 15% in American craft beer (White, 2008), 27.5% in Australian microbrewed beer (Menz et al., 2010), and 81% in Korean microbrewed beer (Jeon et al., 2015), while others have reported the spoilage of canned beers due to gas production by unidentified microbes (Rodhouse and Carbonero, 2019).

Not enough information is available about the microbiota diversity in craft breweries, the possible sources or routes of entrance, and their relevant characteristics, which could help understand the associated microbiological quality and food safety risks. For example, exopolysaccharide (EPS) production (a widespread ability among LAB) is relevant in brewing because it makes them potential biofilm initiators and can also increase beer viscosity, cause slim texture, turbidity and ropiness (Fraunhofer et al., 2018).

Recently brewers have adopted some methods to identify the spoilage ability of bacteria but those methods based on species identification are limited by the fact that not all strains of the same species are beer spoilers, and occasionally new beer spoilage/toxic bacteria are reported, such as *Staphylococcus xylosum* (Yu et al., 2019) and *Bacillus*

**Abbreviations:** ABV, Alcohol by volume; BA, biogenic amines; BLR, binary logistic regression; BVG, beverage; CCV, cylinder-conical vessel; EPS, exopolysaccharides; IBU, International Bitterness Units; LAB, Lactic acid bacteria; NAMB, non-alcoholic malt-based beverage; YFE, yeast fermentable extract.

\* Corresponding author.

E-mail address: [victoria.moreno@csic.es](mailto:victoria.moreno@csic.es) (M.V. Moreno-Arribas).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>

Received 2 May 2020; Received in revised form 27 September 2020; Accepted 28 September 2020

Available online 6 October 2020

0963-9969/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.



## Review

***Pectinatus* spp. – Unpleasant and recurrent brewing spoilage bacteria**

Magaly Rodríguez-Saavedra<sup>a</sup>, Dolores González de Llano<sup>a</sup>, Gemma Beltran<sup>b</sup>, María-Jesús Torija<sup>b</sup>,  
M. Victoria Moreno-Arribas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, c/ Nicolás Cabrera, 29049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo, 1, 43007 Tarragona, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Brewing  
Beer spoilage  
Anaerobic bacteria  
*Pectinatus*  
Biofilm

## ABSTRACT

Traditionally, beer has been recognised as a beverage with high microbiological stability because of the hostile growth environment posed by beer and increasing attention being paid to brewery hygiene. However, the microbiological risk has increased in recent years because of technological advances toward reducing oxygen in beers, besides the increase in novel beer styles production, such as non-pasteurised, flash pasteurised, cold sterilised, mid-strength, and alcoholic-free beer, that are more prone to spoilage bacteria. Moreover, using innovative beer ingredients like fruits and vegetables is an added cause of microbial spoilage. To maintain quality and good brand image, beer spoilage microorganisms are a critical concern for breweries worldwide. *Pectinatus* and *Megasphaera* are Gram-negative bacteria mostly found in improper brewing environments, leading to consumer complaints and financial losses. Because of the lack of compiled scientific knowledge on *Pectinatus* spoilage ability, this review provides a comprehensive overview of the occurrence, survival mechanisms, and the factors affecting beer spoilage *Pectinatus* species in the brewing process.

**1. Introduction**

Beer is one of the most consumed beverages worldwide. In recent years, an increasing interest in craft beer by consumers has observed unpasteurised, unfiltered beers, and low- or free-alcohol beers gaining a larger market share.

Beer has been recognised as a beverage with high microbiological stability because of its hostile environment for most microorganisms. The intrinsic factors that aid with antimicrobial effects are ethanol content, hop bittering compounds, low pH, elevated carbon dioxide, low oxygen concentration, and the lack of nutritive substances; making beer microbiologically stable and resulting in few cases of microbiological incidents in breweries with high standard of hygiene (Sakamoto and Konings, 2003). Extrinsic factors, like acidification of malt, mashing, wort boiling, pasteurisation, filtration, and cold storage, are stages of the brewing process that reduce potential contaminations and proliferation of microorganisms (Vriesekoop et al., 2012), although not all apply to all beer style processing (Turvey et al., 2017). However, some microbial species can still spoil beer (Suzuki et al., 2006); moreover, there are large variations among different beers styles regarding their microbiological susceptibility, being beers of low acidity, bitterness, alcohol, and with added sugar the most prone to spoilage (Vaughan et al., 2005).

In brewing, specific spoilage organisms have been defined as any organism which is not deliberately introduced and can survive and proliferate in a brewery environment, wort, fermenting wort, filtered beer, and in packaged beer (Jespersen and Jakobsen, 1996).

Gram-positive bacteria have been considered the most hazardous beer spoilage microorganism in breweries, especially some lactic acid bacteria (LAB), like species belonging to *Lactobacillus* and *Pediococcus* (Back, 2005). However, the reduction of oxygen levels during the brewing and packaging has resulted in a higher frequency of spoilage by anaerobic bacteria, particularly Gram-negative strictly anaerobic bacteria like species of *Pectinatus* (P.) and *Megasphaera* (Vaughan et al., 2005). Specifically, *Pectinatus* is a harmful bacterium for beer because of the production of noxious off-flavours that cause serious commercial damage to breweries. Moreover, using vegetables as new beer ingredients can introduce new *Pectinatus* species into the brewery environment and create new spoilage risks (Juvonen, 2015).

Control of *Pectinatus* is a recurrent topic in beer research, although there is little scientific information concerning its occurrence and the factors affecting its presence and survival mechanisms in the brewing process. In this review, we provide a comprehensive overview of the information on beer spoilage *Pectinatus* species.

\* Corresponding author.

E-mail address: [victoria.moreno@csic.es](mailto:victoria.moreno@csic.es) (M.V. Moreno-Arribas).

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108900>

Received 18 November 2019; Received in revised form 19 September 2020; Accepted 2 October 2020

Available online 16 October 2020

0168-1605/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article

# A Binary Logistic Regression Model as a Tool to Predict Craft Beer Susceptibility to Microbial Spoilage

Magaly Rodríguez-Saavedra <sup>1</sup>, Karla Pérez-Revelo <sup>1</sup>, Antonio Valero <sup>2</sup>, M. Victoria Moreno-Arribas <sup>1</sup> and Dolores González de Llano <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Science Research, CIAL (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain; 40204047@pronabec.edu.pe (M.R.-S.); karlaperez9310@gmail.com (K.P.-R.); victoria.moreno@csic.es (M.V.M.-A.)

<sup>2</sup> Department of Food Science and Technology, Campus de Rabanales, University of Cordoba, Edificio Darwin, 14014 Córdoba, Spain; bt2vadia@uco.es

\* Correspondence: d.g.dellano@csic.es

**Abstract:** Beer spoilage caused by microorganisms, which is a major concern for brewers, produces undesirable aromas and flavors in the final product and substantial financial losses. To address this problem, brewers need easy-to-apply tools that inform them of beer susceptibility to the microbial spoilage. In this study, a growth/no growth (G/NG) binary logistic regression model to predict this susceptibility was developed. Values of beer physicochemical parameters such as pH, alcohol content (% ABV), bitterness units (IBU), and yeast-fermentable extract (% YFE) obtained from the analysis of twenty commercially available craft beers were used to prepare 22 adjusted beers at different levels of each parameter studied. These preparations were assigned as a first group of samples, while 17 commercially available beers samples as a second group. The results of G/NG from both groups, after artificially inoculating with one wild yeast and different lactic acid bacteria (LAB) previously adapted to grow in a beer-type beverage, were used to design the model. The developed G/NG model correctly classified 276 of 331 analyzed cases and its predictive ability was 100% in external validation. This G/NG model has good sensitivity and goodness of fit (87% and 83.4%, respectively) and provides the potential to predict craft beer susceptibility to microbial spoilage.

**Keywords:** spoilage microorganisms; susceptibility prediction; antimicrobial hurdles; beer intrinsic factors; growth/no growth; model development

**Citation:** Rodríguez-Saavedra, M.; Pérez-Revelo, K.; Valero, A.; Moreno-Arribas, M.V.; González de Llano, D. A Binary Logistic Regression Model as a Tool to Predict Craft Beer Susceptibility to Microbial Spoilage. *Foods* **2021**, *10*, 1926. <https://doi.org/10.3390/foods10081926>

Academic Editors: Andrea Serraino, Alessandra De Cesare and Federica Giacometti

Received: 15 July 2021

Accepted: 17 August 2021

Published: 19 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Craft beer is a beverage made from water, yeast, malt, and hops, in most cases without filtration or pasteurization, with an original flavor and final notes making each craft beer unique. Currently, the most popular beer styles are India Pale Ale (IPA), Brown Ale, Pale Ale, Pale Lager, Pilsner, Amber Ale, Amber Lager, Dark Lager, Porter, Stout, Bock, Strong Ale, and Wheat beer according to the Guidelines of the Beer Judge Certification Program [1].

Beer has generally been considered as a microbiologically safe beverage due to its low pH, oxygen concentration and available nutrients, plus the presence of alcohol (up to 14% ABV) and hop-derived compounds [2,3]. Ethanol and hops interfere with essential cell membrane functions of microorganisms, the low pH hinders enzyme activity, the lack of nutrients and oxygen starves many potential pathogens, while elevated dissolved carbon dioxide lowers the pH, inhibits enzymes, affects cell membranes, and creates an anaerobic environment [4]. Despite the intrinsic antimicrobial hurdles of beer, certain microorganisms can proliferate in this environment and cause beer spoilage, reducing the shelf-life of the beer. Haze production, sedimentation, acidification, turbidity, ropiness, and off-flavors [5], or biogenic amines generation [6] are the most common defects.



# Innovaciones en el *flavor*, análisis de calidad y de los efectos en la salud de la cerveza artesana

Mar Magaly Rodríguez-Saavedra, Dolores González de Llano, M. Victoria Moreno-Arribas.  
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM.



**Lograr una cerveza de calidad durante todo el tiempo de vida, con un aroma y sabor especialmente agradables y a la vez garantizando un producto seguro y beneficioso para el consumidor, son retos que centran muchas de las investigaciones en cerveza. En este artículo se muestran algunos ejemplos de los avances alcanzados, investigaciones en proceso y perspectivas en cuanto a aroma y *flavor*, calidad de la cerveza artesana y posibles efectos en la salud**

Con los avances en la producción de cerveza en todo el mundo y sus consumidores cada vez más exigentes, surgen más desafíos en la búsqueda de nuevas técnicas, enfoques e innovaciones en el sector, por ello las cerveceras artesanales van de la mano de las nuevas tendencias en el desarrollo de las cervezas; y siempre asegurando la calidad microbiológica y seguridad alimentaria de cara al consumidor. Las nuevas tendencias en el uso de levaduras de especies diferentes a *Saccharomyces* comprenden la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol, cervezas funcionales y enfoques de *bioflavoring*. Este es un campo poco explora-

do en la práctica de la elaboración de cerveza, que aún requiere de un impulso en el sector basado en una investigación extensa con aplicación práctica que incluya el escalado.

## Uso de nuevas levaduras

La producción de la mayoría de los compuestos del aroma con un papel significativo en las características sensoriales de la cerveza depende estrictamente de la cepa de levadura elegida para la fermentación. Esto hace que la selección de la cepa sea una tarea muy importante. En la actualidad para la gran mayoría de las cervezas de todo el mundo, la levadura del género *Saccharomyces* es el único inóculo microbiano. Los intentos por obtener productos con características sensoriales más complejas han llevado a los investigadores y cerveceros a buscar levaduras no convencionales, es decir, *no-Saccharomyces* que están aún por explorarse en este sector.

Por ello, para evaluar la capacidad de estas levaduras *no-Saccharomyces* se ha desarrollado un sistema de cribado/*screening* que permita encontrar nuevas levaduras que aporten interesantes y agradables aromas, y/o con las que se pueda elaborar cervezas con bajo contenido de alcohol, esta última cada vez más demandada en el mercado. En esta evaluación se incluyen diversas actividades enzimáticas, metabolismo de los azúcares del mosto, capacidad de floculación, productos principales de la fermentación, las resistencias a la presión, temperatura, alcohol y al lúpulo, entre

otros estudios. Así, en los últimos años se ha demostrado a través de diversos tipos de fermentaciones a escala de laboratorio (Figura 1) e incluso en las fermentaciones en botella, que una levadura *no-Saccharomyces* bien seleccionada, puede ejercer influencias positivas en el aroma y *flavor* de la cerveza a través de la síntesis de metabolitos secundarios y enzimas responsables de la bioconversión de precursores a compuestos aromáticos deseables.

A modo de ejemplo, con las cepas seleccionadas de *Torulaspora delbrueckii* se logran cervezas con pronunciada complejidad sensorial destacándose los aromas frutales y florales, siendo altamente positivo en las fermentaciones previas de las cervezas de trigo por su aroma a plátano, chicle y clavo de olor. Asimismo, algunas cepas de *Lancea thermotolerans* son aptas para la producción de cervezas ácidas sin la participación de bacteria lácticas y en una única etapa de fermentación<sup>[1]</sup>. En la tabla 1 se resume las principales aplicaciones de estas levaduras *no-Saccharomyces* en cervecería.

## Compuestos aromáticos y análisis sensorial

Una vez seleccionada la levadura y determinada su posible aplicación, es posible modular el *flavor* de la cerveza mediante un método biológico natural, trabajando en la optimización de diversos factores del proceso fermentativo como la temperatura, aireación, duración, cantidad de inóculo y características nutricionales del mosto. Los resultados

**FIGURA 1**

**Evaluación a escala de laboratorio, de la capacidad fermentativa de *Lancea thermotolerans* (levadura *no-saccharomyces*) en la elaboración de cerveza. Los ensayos de las diversas fermentaciones se realizan con *L. thermotolerans* como única levadura y también en fermentaciones mixtas y secuenciales con la levadura *Saccharomyces cerevisiae***



1     **Screening and application of non-*Saccharomyces* yeasts as pure beer culture fermentative**  
2                   **strains. Focus on *Lachancea thermotolerans* for craft beer production**

3     Magaly Rodríguez-Saavedra, Dolores González de Llano, M. Victoria Moreno-Arribas\*

4     *Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Science Research, CIAL*  
5     *(CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain.*

6     \*Corresponding author: [victoria.moreno@csic.es](mailto:victoria.moreno@csic.es)

7     **Keywords:** Craft beer, Yeasts, Non-conventional yeasts, Bioflavoring, Innovative beer, Sour beer

8     **Abstract**

9     In response to new consumption patterns and market niches that demand a greater range and  
10    flavor of craft beers, research for non-*Saccharomyces* yeast represents a challenge for the  
11    brewing industry. In this study, a screening system for potential brewing non-*Saccharomyces*  
12    strains, for use as monoculture fermentative yeasts was established. The study included 141  
13    non-*Saccharomyces* strains of oenological origin belonging to 11 different yeast genera.  
14    Characterization tests such as the ability to metabolize the major sugars in the wort, off-flavor  
15    production, enzymatic activities, growth in presence of hop and ethanol, flocculation,  
16    fermentation rate and attenuation, organic acids and volatile compounds production, and  
17    sensorial analysis of a small batch of brewed beer were conducted. Four strains were initially  
18    selected (*Torulaspora delbrueckii* CIAL29 and CIAL34, and *Lachancea thermotolerans* CIAL37 and  
19    NOO32) with outstanding fermentative and sensory characteristics, including their ability to  
20    develop secondary fermentations, usually performed in craft breweries. Using the selected  
21    strain *L. thermotolerans* CIAL37 on laboratory scale brewing led to lactic and citric acids, isobutyl  
22    and isoamyl alcohol, isovaleraldehyde, ethyl isobutanoate, ethyl butanoate, and ethyl  
23    hexanoate production, which were above the threshold of perception, and were responsible for  
24    the pleasing and complex fruity/citric and sour sensory profile of the beer. In addition, this yeast  
25    strain contributed to the beer clarity and allowed the formation of a persistent foam. The refore,  
26    *L. thermotolerans* CIAL37 is a promising monoculture fermentation yeast able to produce novel  
27    sour craft beers, with a relatively low or moderate ethanol content.





