



CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS VARIEDADES DE LÚPULO MEDIANTE HPLC, CG-FID Y ANÁLISIS SENSORIAL

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2017/18

Alumno: Adriana Segovia Ramón
Tutor Académico: Carlos Blanco Fuentes
Tutor de empresa: Ana Isabel Fernández Calviño

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

Índice

1. Resumen/Abstract.....	1
2. Introducción	2
2.1 Historia del lúpulo en la cerveza	2
2.2 El lúpulo como materia prima	2
2.3 El lúpulo en el proceso de elaboración de la cerveza	4
2.4 Relación sensorial del lúpulo en la cerveza.....	4
3. Objetivos	8
4. Material y Métodos.....	9
4.1 Muestras de lúpulo	9
4.2 Métodos	10
4.2.1 Cromatografía Líquida (HPLC)	10
4.2.2 Cromatografía de Gases (GC-HS-FID)	11
4.2.3 Análisis sensorial	12
5. Resultados.....	13
5.1 Selección del método de extracción	13
5.1.1 Efecto del cloruro sódico	13
5.1.2 Efecto de la temperatura	14
5.1.3 Efecto del tiempo	15
5.1.4 Efecto de solventes orgánicos.....	17
5.2 Análisis de alfa y beta ácidos mediante HPLC.....	18
5.3 Análisis de aceites esenciales mediante CG-FID	19
5.4 Análisis Sensorial.....	21
6. Discusión y Conclusiones.....	26
7. Agradecimientos	27
8. Bibliografía	28
9. ANEXO I: Cuestionario “Evaluación de Variedades de Lúpulo en Infusión”	31

1. Resumen/Abstract

El lúpulo es uno de los principales ingredientes en la cerveza. Equilibra el amargor del producto final, el sabor y el aroma. Los isómeros alfa y beta ácidos otorgan el sabor amargo a la cerveza mientras que los aceites esenciales presentes en las flores del lúpulo aportan olor y aroma característicos. En orden de caracterizar las variedades de lúpulo se ha determinado la relación de amargos mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC), se ha desarrollado un método de extracción en frío de aceites esenciales y análisis mediante cromatografía de gas con detección por ionización en llama (CG-FID) y se han analizado sensorialmente las infusiones mediante el uso de un panel de catadores. Los lúpulos con doble funcionalidad generalmente presentan altas concentraciones de mircenol, linalool, humuleno y geraniol relacionándose con aromas cítricos, picantes y florales. Los lúpulos aromáticos están equilibrados en mircenol, linalool y geraniol con bajas cantidades de humuleno y cariofileno. Estas características los definen como picantes, resinosos y cítricos. Las variedades de amargor presentan diferencias antagónicas en función de la variedad tanto de mircenol como de linalool. Esto permite definir el perfil como muy herbales, resinosos y cítricos. El perfil sensorial de cada lúpulo es único y característico de la variedad. Aunque estas complejas relaciones deben ser estudiadas en mayor profundidad, el objetivo de este trabajo es definir las bases para caracterizar las variedades de lúpulo, las cuales tienen un impacto significativo en el carácter y atributos sensoriales de las cervezas.

Hops are one of the main ingredients in beer. It balances the final product bitterness, taste and aroma. The alpha and beta acid isomers give the bitter taste to the beer while the essential oils present in the hop flowers provide a characteristic smell and aroma. In order to characterize the hops varieties, the bitterness ratio has been determined by high pressure liquid chromatography (HPLC), a method of cold extraction of essential oils has been developed and analyzed by gas chromatography (CG-FID). The infusions have been sensorial analyzed through the use of a panel of tasters. Hops with double function, usually have high concentrations of mircene, linalool, humulene and geraniol, relating to citrus, spicy and floral aromas. Aromatic hops are balanced in mircene, linalool and geraniol with low amounts of humulene and caryophyllene. These characteristics define them as spicy, resinous and citrus. The varieties of bitterness present antagonistic differences of both myrcene and linalool. This allows defining them as very herbal, resinous and citrus. The sensory profile of each hop is unique and characteristic of the variety. Although these multiple relationships must be studied in greater depth, the objective of this work is to define the bases to characterize hop varieties, which have a significant impact on the sensory and sensory character of beers.

2. Introducción

2.1 Historia del lúpulo en la cerveza

Los primeros registros de cerveza datan de las civilizaciones Mesopotámicas y el antiguo Egipto. Aunque los romanos eran conocedores de las técnicas de fabricación, no fue hasta la Edad Media cuando se introdujo en el proceso de elaboración una mezcla de hierbas. Esta mezcla, denominada *gruit* o *grutum*, aromatizaba y balanceaba la cerveza (Barrado, 2014). En el siglo XI se comenzó a utilizar el lúpulo como conservante debido a su acción antimicrobiana conjuntamente con el almacenamiento en frío (*lagering*). En la Edad Moderna (siglo XVI) se extendió el uso del lúpulo por toda Europa favorecido por el aumento del comercio y la Ley de pureza de 1516 (*Reinheitsgebot* en alemán) promulgada en Bavaria (Hijos de Rivera, 2017). La elaboración de la cerveza no ha variado excesivamente en su fórmula, si bien es cierto que se han ido cultivando y desarrollando diferentes especies de lúpulo que aportan matices y caracteres únicos a cada estilo de cerveza. Según datos de FAO, la producción mundial de lúpulo en el periodo 2009-2013 (último dato disponible) se aproximó a las 125 mil toneladas, de las cuales más de la mitad se producen en Alemania (primer productor) y EEUU, seguidos, a mayor distancia, de China y República Checa (MAPAMA, 2018).

2.2 El lúpulo como materia prima

Según el Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, el término cerveza describe a aquel alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales. Estas materias primas son mayoritariamente cuatro: agua, malta de cebada, levadura y lúpulo.

El lúpulo (*Humulus lupulus* L.) es una planta trepadora de la familia de las *Cannabiaceas* que brota anualmente a partir de una cepa enterrada y cuya vida media útil es de 12 a 15 años. En la elaboración de cerveza únicamente se utilizan pies de plantas femeninos, de los cuales nacen las flores (llamadas conos) que contienen las glándulas de lupulina (Roberts, 2016). Estas glándulas contienen las resinas responsables del amargor de la cerveza y los aceites esenciales que participan en sus propiedades aromáticas (Fig. 1).

Las características organolépticas aportadas por el lúpulo, dependientes de la concentración de las resinas y aceites, están influenciadas por la variedad de lúpulo, la edad de la planta y las condiciones de cultivo. Entre las propiedades que el lúpulo aporta a la cerveza destacan:

1. **Amargor:** las resinas contenidas en los conos contienen alfa y beta ácidos que durante la fase de ebullición dan lugar a isómeros, responsables del carácter amargo de las cervezas.
2. **Aroma:** debido principalmente a los aceites esenciales.
3. **Estabilidad:** el lúpulo tiene actividad antiséptica que aporta estabilidad microbiológica a la cerveza, una cualidad altamente apreciada para aumentar la conservación de la cerveza.

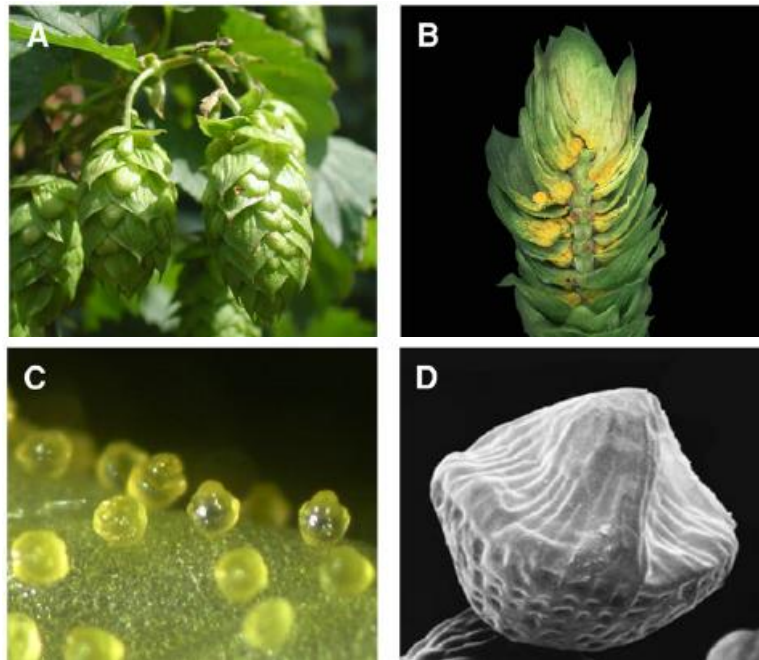


Figura 1. A. Morfología de los conos del lúpulo. B. Corte transversal de un cono. C. Glándulas de lupulina. D. Micrografía electrónica de una glándula de lupulina (Cerdán, 2015).

Existen diferentes tipos de lúpulo en función de su uso cervecero. En este aspecto diferenciamos tres tipos:

- a. **Lúpulos amargos:** son aquellas variedades que se valoran por su concentración de alfa y beta ácidos, que aportan amargor a la cerveza. El contenido promedio de alfa ácidos en estos lúpulos es de 10-18%.
- b. **Lúpulos aromáticos:** son aquellas variedades que se valoran por su concentración de aceites esenciales, aportando aroma a la cerveza. El contenido promedio de alfa ácidos en estos lúpulos es de 2,5-5%.
- c. **Lúpulos mixtos o de doble finalidad,** que pueden ser empleados tanto como amargos como aromáticos.

Las propiedades aportadas por los lúpulos están ligadas al estilo y las características de la cerveza que se quiere elaborar. Esto hace que la evolución de los estilos vaya pareja a la aparición de nuevas variedades de lúpulo. Tras ser cosechado, el lúpulo

debe ser secado hasta alcanzar un contenido en agua del 8-12% y comprimido a fin de evitar pérdidas de calidad en el valor del amargor como resultado de la acción del oxígeno, humedad y calentamiento.

2.3 El lúpulo en el proceso de elaboración de la cerveza

Independientemente de la tipología de la cerveza a elaborar existen una serie de etapas comunes. La adición del lúpulo se produce durante la ebullición, al final de la fase de cocción y busca generar el amargor característico, aportar aromas y proteger de la actividad microbiana a la cerveza.

Para generar el amargor, los α -ácidos y las resinas del lúpulo son térmicamente isomerizadas aportando el característico sabor y aroma durante el proceso de elaboración de la cerveza (De Keukeleire, 2000). El proceso de ebullición permite la conversión de los α -ácidos, primeramente insolubles, en iso- α -ácidos solubles. Estos últimos, salvo precipitaciones durante el enfriamiento, van a parar al producto final dando sabor amargo a la cerveza. Los compuestos amargos son muy tensoactivos y mejoran la estabilidad de la espuma de la cerveza. Por ello se puede esperar que las cervezas más amargas tengan una mejor estabilidad en la espuma (Kunze, 2006).

Los aceites son solubles en el mosto caliente y son muy volátiles, por lo tanto se eliminan rápidamente junto con el vapor de agua durante la cocción. Debido a ello, muchos cerveceros hacen una adición lo más tarde posible del lúpulo tratando de minimizar la pérdida del aroma (Gigliarelli, 2009).

2.4 Relación sensorial del lúpulo en la cerveza

La composición del lúpulo tiene una gran influencia sobre la calidad de la cerveza fabricada a partir de éste (Kunze, 2006). En su materia seca, el lúpulo se compone mayoritariamente de compuestos amargos y proteínas (Tabla 1). El resto de componentes son celulosa y otras sustancias que no son de interés para la fabricación de cerveza.

Tabla 1. Composición general del lúpulo.

Compuestos amargos	18,5%
Aceite de lúpulo	0,5%
Taninos	3,5%
Proteína	20,0%
Sustancias minerales	8,0%

Fuente: Roberts, 2016.

Las resinas del lúpulo y los aceites esenciales, localizados en las glándulas de lupina de los conos femeninos, son la fuente de los caracteres amargos y los aromas de la cerveza, respectivamente (De Keukeleire, 2000; Van Opstaele *et al.*, 2012).

2.4.1 Compuestos amargos

La contribución más importante del lúpulo al característico sabor amargo de la cerveza se debe principalmente a los alfa ácidos, también conocidos como Humulonas, presentes en las resinas. Existen tres homólogos principales de los alfa ácidos: Humulona, Cohumulona y Adhumulona (Fig. 2) que aportan mayor o menor amargor en función de la concentración y variedad de lúpulo. Los alfa ácidos no son amargos en sí mismos, únicamente cuando se someten al proceso de ebullición se convierten en isómeros y comienzan a tener sabor amargo. La solubilidad es diferente en cada uno de los iso-alfa ácidos, siendo la iso-cohumulona la más soluble y químicamente activa. Sin embargo, muestra ser menos amarga que los otros homólogos (Hughes y Simpson, 1996).

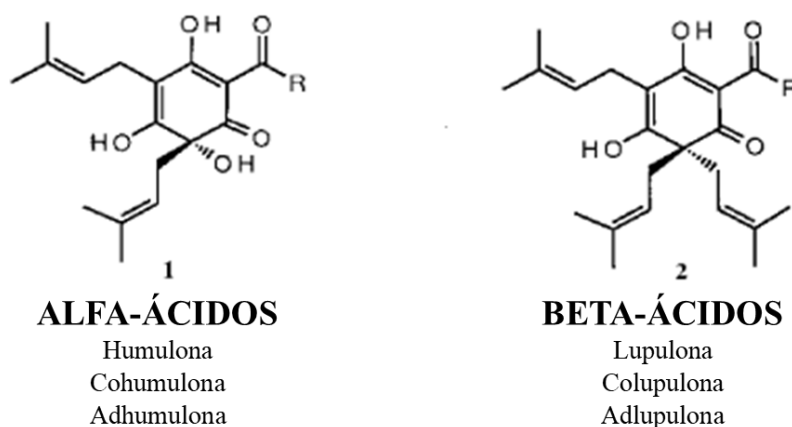


Figura 2. Estructura de α -ácidos (humulonas) y β -ácidos (lupulonas).

Otra parte importante de las resinas es la fracción de los β -ácidos. La cantidad de beta ácidos es generalmente menor a la de alfa ácidos, siendo el ratio alfa-beta muy dependiente de la variedad y de las condiciones climáticas. Los beta ácidos, también conocidos como Lupulonas, existen en forma de tres homólogos: Lupulona, Colupulona y Adlupulona. Son muy insolubles y generalmente se desestabilizan durante la ebullición. Sin embargo, durante la maduración una pequeña cantidad de beta ácidos es oxidada a humulonas lo que aumenta la solubilidad y por tanto su presencia en la cerveza como producto final. Estas humulonas son más amargas al gusto y aportan en menor proporción amargor a la cerveza (Hughes y Simpson, 1996).

Las Unidades de Amargor o *Bitterness Units* (BU) se usan comúnmente para estimar de forma analítica la intensidad del amargor de la cerveza. En estas unidades 1mg/L de iso- α -ácidos equivalen a 1 BU (Oliver y Colicchio, 2011). Generalmente, un mayor contenido en iso- α -ácidos se percibe con una mayor intensidad de amargor.

2.4.2 Aceite de lúpulo

El aceite esencial de lúpulo es por definición la fracción de lúpulo que puede ser aislada mediante destilación con vapor. Esta fracción está compuesta principalmente por monoterpenos, sin embargo también hay presentes componentes que contienen oxígeno y azufre (Steenackers *et al.*, 2015).

El lúpulo contiene entre 0,5-1,2% de aceite en el que aproximadamente están presentes más de 300 sustancias etéreas diferentes que son particularmente volátiles durante la cocción (Walsh, 1998) pero se cree que sólo una docena de ellas contribuyen en forma considerable al sabor y aroma. Son secretadas en la lupina por la planta en maduración y dan al lúpulo un aroma característico como resultado de la acción individual o en forma sinérgica (Cerdán, 2015). La diferente composición del aceite de lúpulo es específica para cada variedad.

Los compuestos aromáticos presentes en los aceites esenciales son la fuente del carácter “lupulado”, comúnmente caracterizado de forma sensorial utilizando descriptores como “floral”, “afrutado”, “picante”, “herbal” o “leñoso” en cerveza (Eyres, Marriott, y Dufour, 2007; Eyres, Marriott, Leus, y Lysaght, 2015; Oladokun *et al.*, 2016). Estos aceites son complejos en la naturaleza, con numerosos componentes olorosos activos que contribuyen de forma significativa al perfil aromático aún sin identificar (Eyres, Marriott, y Dufour, 2007). Entre los compuestos presentes en el aceite de lúpulo se han seleccionado para el estudio aquellos que se encuentran en mayor proporción, siendo estos:

Mirceno, Linalool y Geraniol

El mirceno es un monoterpeno hidrocarburo presente en el aceite esencial de numerosas plantas como el laurel, cannabis, tomillo, perejil o lúpulo entre otras (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016). En muchas variedades es el componente más importante de los aceites esenciales, puede variar entre el 20-65%. El típico aroma de este compuesto es caracterizado como pungente o picante y no muy placentero. En las variedades nobles y en otras aromáticas el porcentaje tiende a

ser menor. Generalmente el contenido es alto en variedades utilizadas para el amargor.

Muchos compuestos originados por degradación y oxidación del mirceno se pueden encontrar en la cerveza terminada, incluyendo el linalool y geraniol. Estos compuestos derivados contribuyen a un sabor o aroma cítrico o floral. Otros compuestos derivados pueden otorgar aroma cítrico o pino (Roberts, 2016).

El linalool es un terpeno con un grupo alcohol cuya forma natural es común en muchas flores y plantas aromáticas. Su olor cítrico con un toque mentolado le confiere valor como compuesto aromatizante. El geraniol es un monoterpeno con un grupo alcohol. Tiene un característico olor floral, rosáceo, fácilmente identificable con el olor a geranio (Goldstein *et al.*, 1999; Bonnländer *et al.*, 2006).

Humuleno

El humuleno, también conocido como α -humuleno o α -cariofileno es un anillo monocíclico sesquiterpénico que se deriva del difosfato de farnesilo (FPP). Se encontró por primera vez en los aceites esenciales de *Humulus lupulus*, del cual deriva su nombre (Tinseth, 1993).

La concentración varía entre variedades pudiendo llegar a aportar hasta el 40% del aceite esencial (Katsiotis *et al.*, 1989). Los múltiples epóxidos producidos en el proceso de elaboración de la cerveza y los productos derivados de su hidrólisis son los productores del “aroma a lúpulo” en la cerveza, también relacionado como herbáceo, europeo y especiado (Yange *et al.*, 1993).

Cariofileno

El cariofileno es un sesquiterpeno bi-cíclico natural. Es uno de los compuestos químicos que contribuyen al sabor picante de la pimienta negra (Roberts, 2016). La fracción correspondiente al cariofileno constituye un 5–15% de los aceites esenciales. En general, en las variedades aromáticas existe una tendencia a encontrarse en mayores proporciones.

Los sabores y aromas producidos por el cariofileno no se encuentran bien caracterizados. Existen dos productos de oxidación, epóxido de cariofileno, asociado a un carácter herbáceo-especiado, y cariolanol, asociado a un carácter tipo herbáceo (Roberts, 2016).

3. Objetivos

El presente trabajo se engloba en un proyecto de análisis y caracterización de las variedades de lúpulo utilizadas por la empresa Estrella Galicia (Hijos de Rivera S.A.) para sus elaboraciones de cerveza. Dentro de este marco, los objetivos finales se resumen en:

- Analizar y caracterizar las variedades de lúpulo en pellet utilizadas por Estrella Galicia en la elaboración de sus cervezas en cuanto al amargor y contenido de alfa-beta ácidos.
- Analizar y caracterizar las variedades de lúpulo en pellet utilizadas por Estrella Galicia en la elaboración de sus cervezas en cuanto a aceites esenciales.
- Mediante el uso del panel de catadores realizar un análisis sensorial del lúpulo que permita conocer mejor las variedades de lúpulo en el uso de las futuras elaboraciones.

Para poder evaluar mediante cromatografía de gases la presencia de estos aceites esenciales ha sido necesario desarrollar y poner a punto un protocolo de extracción de los aceites de las muestras.

El análisis y comprensión de las variaciones en la concentración de compuestos amargos y aceites esenciales tanto en la materia prima (pellet de lúpulo) como en el producto final (cerveza) abre diferentes caminos y consolida alternativas en el abastecimiento de materias para la industria cervecera. Del mismo modo, asegura la calidad de los productos utilizados y permite generar nuevas herramientas y métodos de análisis de materiales y procesos, así como el uso de lúpulos alternativos.

Por otra parte, permite generar proyectos de investigación y desarrollo como la sustitución de los lúpulos actuales o la generación de redondez de los perfiles sensoriales buscados en la cerveza.

4. Material y Métodos

4.1 Muestras de lúpulo

Las muestras utilizadas pertenecen a la casa comercial Barth-Haas Group, Hopsteiner y a la sociedad Lúpulo Tecnología de Galicia, Sociedad Cooperativa Gallega (LU.TE.GA). Los lúpulos analizados pertenecen a variedades de amargor, variedades aromáticas y variedades que cumplen ambas funciones. Parte de ellas pertenecen a la campaña de 2017 y otras pertenecen a la campaña de 2016, por lo que podrían verse alterados los contenidos en amargos (alfa y beta ácidos) y en aceites esenciales debido al tiempo transcurrido desde su recolección, condiciones de almacenamiento y procesado para el pelletizado. Las variedades utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 2. Características de las variedades de lúpulo utilizadas.

Nombre	Origen	Función	Alfa-ácidos	Aromas
Admiral	Reino Unido	Doble función	13-16%	Cítricos y herbales
Aurora	Eslovenia	Doble función	5-10%	Floral, cítrico-lima, pino, picante medio
Cascade	Estados Unidos	Aromática	4-7,5%	Especias, florales, uva, toques cítricos
Eureka	Estados Unidos	Doble función	11-19%	Cítricos, afrutados (fruta de hueso) y pino.
Herkules	Alemania	Doble función	14-17%	Especias (pimienta negra), florales, resina de pino, cítricos.
Magnum	Alemania	Amargor	12-14%	Frutal
Nugget	Estados Unidos	Amargor	11-13%	Notas aromáticas herbales (pino principalmente) y madera
Perle	Estados Unidos	Doble función	7-9,5%	Herbal, fresco, menta, especiado, frutal y ligeramente floral
Sladek	República Checa	Doble función	5-7%	Herbal, especiado, notas cítricas.

4.2 Métodos

4.2.1 Cromatografía Líquida (HPLC)

A. Extracción y preparación de la muestra

Mediante el uso de un molinillo eléctrico se trituraron las muestras de pellets hasta obtener un fino polvo. De cada muestra se pesaron 10 gramos y se pasaron a una botella de vidrio. Se añadieron 40mL de ácido clorhídrico 0.1mol/L PanReac AppliChem (*serial number* 181023.1211), 100mL de éter dietílico estabilizado con etanol PanReac AppliChem (*serial number* 362551.1611) y 20mL de metanol PanReac AppliChem (*serial number* 361091.1612). Se agitaron durante 40 minutos y tras 10 minutos de reposo se transfirieron 5ml de la fase superior a un matraz de 50mL y se enrasó con metanol. Posteriormente se filtró cada muestra a través de filtros de jeringa de 0,45 μ m y se transfirieron a un vial de HPLC.

B. Materiales y Equipos

Se utilizó el Método 7.8 de la European Brewery Convention (EBC) para la cuantificación de α - y β -ácidos en Lúpulo y Extractos de Lúpulo Isomerizados Mediante HPLC (Fachuerlag, 2010). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Agilent 1220 Infinity LC con detector UV 1220 Infinity DAD LC.

Para llevar a cabo el análisis se utilizó la columna Agilent Poroshell 120 EC-C18:4,6 x 100mm, 2,7 μ m. Se utilizó una fase móvil compuesta por metanol, agua y ácido ortofosfórico en proporción 83:17:0,25 respectivamente. Las condiciones cromatográficas fueron 35°C de temperatura de la columna, flujo de la fase móvil 0,8mL/min con un volumen de inyección de 20 μ L. La solución de calibración estándar utilizada fue DCHA-Iso, ICS-I3, una solución semi-cristalina purificada de iso- α -ácidos de lúpulo en dicitlohexilamina (DCHA) en forma de sal. Los tiempos de retención en minutos establecidos fueron de 7.907 para la cohumulona, 10.069 para la adhumulona, 15.004 para la lupulona, 19.800 para la adlupulona.

La detección se llevó a cabo mediante un detector de luz UV fijado en 314nm. Basados en la resolución de los picos del cromatograma, las áreas correspondientes a los compuestos fueron calculadas a partir de la corriente total de la muestra y se expresaron en unidades arbitrarias de área que fueron cuantificadas mediante calibrado con patrones externos.

C. Análisis estadístico

El análisis de datos se ha realizado mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con cada una de las muestras por triplicado utilizando la función de análisis de datos de Microsoft Excel.

4.2.2 Cromatografía de Gases (GC-HS-FID)

A. Extracción y preparación de la muestra

Debido a la alta volatilidad de los aceites esenciales procedió al desarrollo y realización del método para la extracción por infusión en frío de las muestras. Mediante el uso de un molinillo eléctrico se trituraron las muestras de pellets hasta obtener un fino polvo. De cada muestra se pesaron 2 gramos y se pasaron a una botella de vidrio. Se añadieron 200mL de agua ultrapura a 25°C y se dejó macerar durante 30 minutos. Se filtró y se pasaron 10mL a un vial espacio cabeza con 130µL de 1-pentanol como patrón interno. Las muestras fueron inyectadas tras su preparación.

B. Materiales y Equipos

Los patrones de 1-pentanol (Lot# BCBR6187V), mircenol (Lot# BCBS9813V), linalool (Lot# STBG7505), cariofileno (Lot# MKBX1012V), humuleno (Lot# BCBP7751V) y geraniol (Lot# MKBH3892V) utilizados para la calibración fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) modelo 7697A Headspace Sampler con inyector splitless y el detector mediante ionización con llama modelo 7890B ambos de Agilent Technologies.

Se utilizó el Método 9.39 para el Análisis de Compuestos volátiles con Bajo Punto de Ebullición Mediante Cromatografía de Gases de la European Brewery Convention (EBC) con algunas modificaciones (Analytica-EBC, 2005). El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna de dimensiones (30m x 530µm x 2µm) que puede trabajar en un rango de temperatura entre 50°C-230°C con fase estacionaria DB-WAXETR. La temperatura del inyector se fijó en 150°C, con un flujo de 9mL/min a presión constante (4,2741psi) y un ratio de hendidura (*Split*) 1,5:1. El gas portador utilizado fue helio con un flujo constante de 6mL/min en columna. La temperatura del horno inicial fue de 40°C durante 1 minuto, 5 minutos a 60°C y por último se incrementó a 220°C a 7°C/min manteniéndose 29,857min.

El detector por ionización de llama o FID mide la diferencia de conductividad de los gases ionizados, de forma que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad del compuesto presente. La temperatura de ionización fue 250°C. La mezcla de gases de la llama estaba compuesta de un flujo de hidrógeno de 30mL/min, un flujo de aire a 400mL/min y un flujo de nitrógeno de 35mL/min. El ratio de adquisición de datos fue 10Hz. La cuantificación de los aceites se realizó utilizando la media del set de estándares en concentración creciente 0.025 a 1.000µg/mL (mg/L) en EtOH al 5%. Las fluctuaciones del sistema fueron corregidas con el patrón interno, 1-pentanol a concentración 20mg/mL.

C. Análisis de datos y estadística

El análisis de datos se ha realizado mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con cada una de las muestras por triplicado utilizando la función de análisis de datos de Microsoft Excel.

4.2.3 Análisis sensorial

A. Extracción y preparación de la muestra

Mediante el uso de un molinillo eléctrico se trituraron las muestras de pellets hasta obtener un fino polvo. De cada muestra se pesaron 10 gramos y se pasaron a una botella de vidrio. Se añadieron 200mL de agua ultrapura por cada 2 gramos de muestra, en total 1L de agua ultrapura. Se dejó macerar a 25°C y se filtraron con filtros de papel en matraces de un litro con tapón.

B. Material de las catas

El panel de catadores estaba conformado por mujeres y hombres no especializados en la cata de lúpulo pero sí entrenados en la cata de cerveza. Las catas de lúpulo fueron realizadas en la sala de catas equipada de acuerdo con las especificaciones de la norma UNE-87-004-79 y responden a condiciones de temperatura, humedad y luz reguladas. Se sirvieron aproximadamente 150mL de cada muestra en vasos de plástico transparente a los catadores. En cada cata se sirvieron dos muestras, cada una de ellas etiquetada con un código de tres cifras independiente y sin correlación entre las muestras. Los catadores analizaron las sensaciones de olor, tacto y sabor de las muestras a través del cuestionario "Evaluación de Variedades de Lúpulo en Infusión" (ANEXO I).

C. Análisis de datos y estadística

El análisis de datos se ha realizado correlacionando los resultados obtenidos mediante los cuestionarios de evaluación obtenidos del panel de catadores y una comparación basada en información aportada mediante búsquedas bibliográficas de los aspectos sensoriales de los aceites extraídos mediante CG-FID.

5. Resultados

5.1 Selección del método de extracción

El análisis de los compuestos volátiles de la cerveza requiere del uso de una técnica de extracción previa al análisis instrumental (Charry-Parra, DeJesus-Echevarria, y Perez, 2011).

Se ha desarrollado una técnica para la identificación y cuantificación de 5 compuestos volátiles presentes en el aceite de lúpulo mediante el uso de micro-extracción en fase sólida con inyector de espacio cabeza (*head solid phase micro-extraction* o *HS/SPME*) y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID). Para ello, fue necesario buscar las condiciones óptimas y definir los parámetros relacionados con la extracción. Se ha utilizado la variedad Nugget de origen alemán denominada Nugget 0404 2017. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.1.1 Efecto del cloruro sódico

La sensibilidad de la microextracción en fase sólida con espacio cabeza (SPME) puede ser incrementada gracias al efecto de la adición de cloruro sódico (NaCl). Algunos estudios de compuestos volátiles (Pinho, Ferreira y Santos, 2006; Shutter, 2008) han demostrado la efectividad de la adición de NaCl en muestras de cerveza. Consiguieron un incremento significativo de la sensibilidad en la detección de compuestos volátiles ya que conseguían mejorar la adsorción al adicionar entre 1.5-2gr de NaCl en 5gr de muestra.

Se analizaron 10mL de cada muestra macerados en 200mL de agua ultrapura durante 30 minutos a 25°C. En el vial se añadieron 2,5gr de NaCl y patrón interno 1-pentanol a concentración 20mg/L. Los resultados se muestran en la figura 3.

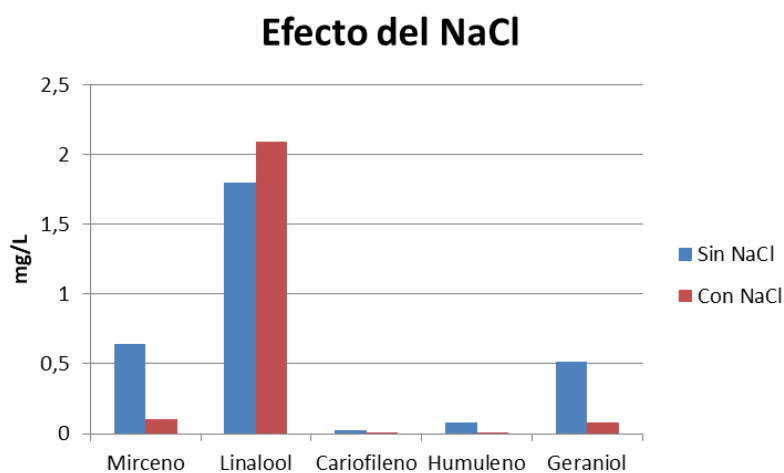


Figura 3. Descenso de la concentración de aceites con NaCl en Nugget 0404.

Las muestras en las cuales se adicionó cloruro sódico muestran menor concentración de aceites excepto para el linalool. Estos resultados son estadísticamente significativos, lo que implica que existen diferencias en las medias de la cantidad extraída de cada aceite.

El mirceno muestra un descenso de la concentración del 84,48% ($F=139,01$) cuando se adiciona cloruro sódico. En el cariofileno la concentración desciende un 87,57% ($F=71,13$) mientras que para el humuleno se reduce un 90,77% ($F=74,90$) y un 84,81% para el geraniol ($F=5,32$). El único caso en el que se demuestra el aumento de la concentración con la adición de NaCl es con el linalool el cual aumenta un 16,23% ($F=11,22$) la detección.

5.1.2 Efecto de la temperatura

La temperatura afecta en gran medida a los compuestos y condiciona la extracción. Debido al uso de temperaturas elevadas los volátiles analizados pueden degradarse o aparecer otros compuestos producto de la descomposición. Aunque no es de aplicación generalizada en los alimentos, existe una extensa bibliografía en el uso de métodos de alta temperatura para la extracción de aceites vegetales, principalmente en estudios de oxidación (Morales y Gutiérrez, 1981).

Los aceites esenciales del lúpulo contienen en su mayoría compuestos de naturaleza volátil. El factor K indica la relación entre la separación de vapor-líquido. En el caso de las sustancias volátiles disueltas en agua el factor K aumenta con el descenso de la temperatura. (Hertel y Dillenburger, 2011). Esto implica que la solubilidad de los compuestos volátiles aumenta a menor temperatura. (Hertel y Dillenburger, 2011).

Se ha experimentado con diferentes temperaturas de extracción para conocer las condiciones en las que se consiguen los mejores rendimientos. Para ello, se utilizaron temperaturas de extracción en frío a 0°C y temperatura ambiente a 25°C durante 30 minutos. Debido a la alta volatilidad de las sustancias se descartó utilizar temperaturas superiores en el ensayo. Los resultados se muestran en la figura 4.

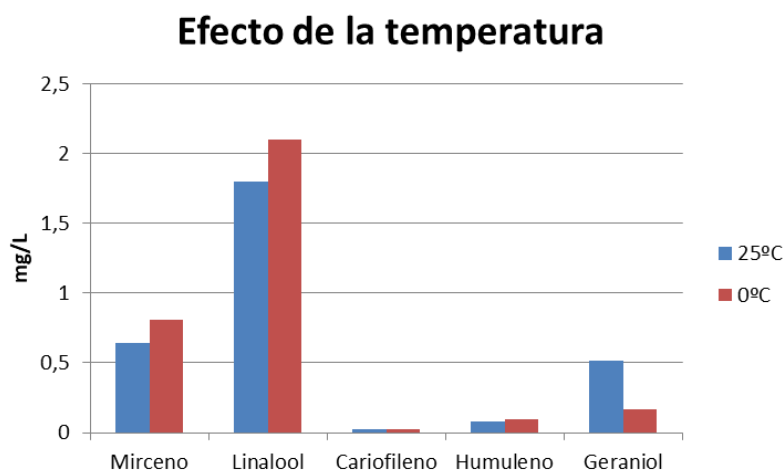


Figura 4. Diferencias de concentración durante la extracción a diferente temperatura en Nugget 0404 2017.

Como podemos observar, las muestras presentan de forma general mayor eficacia de extracción a menor temperatura. Estos resultados son estadísticamente significativos, lo que implica que existen diferencias en las medias de la cantidad extraída de cada aceite.

En el caso del mirceno se muestra un ascenso moderado del 25,18% ($F=17,78$) en la eficacia de extracción. Así mismo, el linalool, cariofileno y humuleno muestran un aumento de la eficacia del 16,62% ($F=128,11$), 10,95% ($F=1,01$) y 15,84% ($F=2,22$) respectivamente. El geraniol es el único caso de los aceites que no parece responder a un aumento de la extracción ante las bajas temperaturas. Este compuesto presenta una disminución de la eficacia del 68,42% cuando la extracción se realiza a 0°C frente a 25°C.

Debido al moderado aumento de eficacia de los aceites en general y a la alta pérdida de eficacia del proceso de extracción cuando se realiza a 0°C respecto al geraniol, se decidió seleccionar el método de temperatura a 25°C para minimizar la pérdida de eficacia de la extracción global.

5.1.3 Efecto del tiempo

Otro de los factores a estudiar es el tiempo de contacto entre el disolvente y la materia orgánica. Cuanto mayor sea el tiempo de exposición, mayor será la superficie que

entra en contacto entre agua-lúpulo (Guadayol Cunill, 1994). Se experimentó con diferentes tiempos de maceración para conocer si existen evidencias significativas en el aumento de la extracción en función del tiempo empleado. Los tiempos empleados se fijaron en 30 minutos y 24 horas mientras que la temperatura se mantuvo constante a 25°C. Los resultados se muestran en la figura 5.

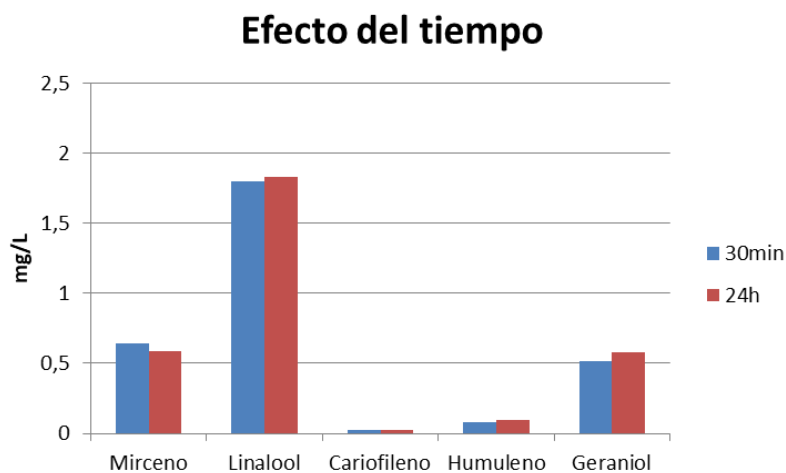


Figura 5. Efecto en la eficacia de extracción en función del tiempo de maceración en la variedad Nugget 0404 2017-

En la figura 5 podemos observar que los aceites, a excepción del mirceno, presentan mayor eficacia de extracción con 24 horas de maceración frente a 30 minutos. Estos resultados son estadísticamente significativos, lo que implica que existen diferencias en las medias de la cantidad extraída de cada aceite.

En el caso del mirceno, el tratamiento con maceraciones más largas reduce la eficacia de la extracción de aceites esenciales un 8,68% ($F=1,81$). En el caso del aceite linalool el ascenso fue del 1,69% ($F=0,05$), mientras que para el cariofileno fue del 5,77% ($F=0,26$). El humuleno, que presenta el mayor porcentaje de aumento, se sitúa en el 13,78% ($F=1,51$) de mejora. El geraniol, al igual que la mayoría de los aceites extraídos, presenta un aumento de la eficacia del 11,64% ($F= 1,16$).

Debido al bajo aumento de la concentración de los aceites en general y a la pérdida de eficacia del proceso de extracción respecto al mirceno cuando se realiza una maceración de 24 horas, se decidió seleccionar un tiempo de maceración de 30 minutos. De este modo, aunque en general se mejora la extracción con 24 horas estimamos que un tiempo de 30 minutos es suficiente para conseguir la extracción de los compuestos. Así mismo, el menor tiempo de exposición de los lúpulos disminuye las alteraciones en las extracciones por la oxidación de los aceites en contacto con el aire o la luz.

5.1.4 Efecto de solventes orgánicos

La extracción de compuestos volátiles mediante inyector de espacio cabeza es preferida a la inyección directa debido a la alta volatilidad de los compuestos de la muestra, algunos de los cuales no son fácilmente detectables en muestras líquidas (Charry-Parra, DeJesus-Echevarria, y Perez, 2011; Snow y Slack, 2002).

En base a estudios de compuestos volátiles presentes en la cerveza a través de HS-SPME acoplado a GC-FID (Charry-Parra, DeJesus-Echevarria, y Perez, 2011; Pinho, Ferreira y Santos, 2006; Dupire, 1999; Schutter *et al.*, 2008), estudios con compuestos presentes en el lúpulo como terpenos en plantas de la familia del lúpulo (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016) y la información de la solubilidad de los aceites esenciales del lúpulo (PubChem, 2018) se han propuesto tres escenarios con distintos solventes orgánicos a diferente concentración para el estudio de la extracción de los aceites esenciales del lúpulo. Los disolventes elegidos han sido etanol, metanol y agua. La temperatura y el tiempo se mantuvieron constantes durante la extracción (30 minutos a 25°C). Los resultados se muestran en la figura 6.

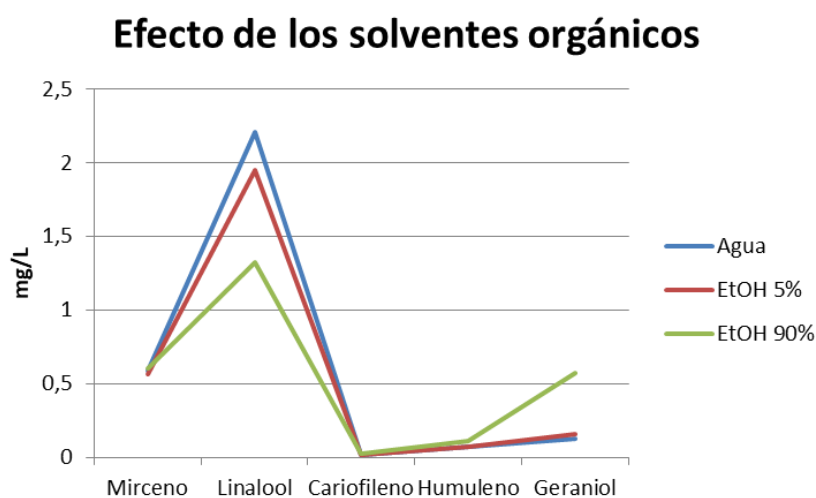


Figura 6. Diferencias de concentración con el uso de diferentes solventes en Nugget 0404.

En la figura 6 podemos observar que los aceites, a excepción del geraniol, presentan mayor eficacia de extracción con agua y muy similar con etanol al 5% frente a la extracción mediante el uso de etanol al 90%. Estos resultados son estadísticamente significativos, lo que implica que existen diferencias en las medias de la cantidad extraída de cada aceite en función del disolvente empleado.

La mayor eficacia en la extracción se consigue mediante el uso de agua como disolvente para los aceites mirceno (0,60mg/L; F=1,59) y especialmente linalool (2,20mg/L; F=12,51). El uso de etanol al 5% tiene una eficacia muy similar al agua

para el mirceno (0,56mg/L) destacando el linalool como el aceite que diferencia la extracción entre ambos disolventes obteniendo una menor eficacia con el etanol al 5% (1,90mg/L). Por otra parte, la extracción con etanol al 90% conlleva una notoria disminución en el caso del linalool (1,32mg/L) sin diferenciarse en la eficacia en el caso del mirceno (0,60mg/L). Sin embargo y por el contrario, el etanol al 90% en el caso del geraniol mejora la extracción (0,57mg/L; $F= 2,04$) frente al uso de agua (0,12mg/L) y de etanol al 5% (0,15mg/L). Para los aceites cariofileno y humuleno las extracciones aportan datos muy similares entre los tres disolventes siendo el uso del etanol al 90% el método que mayor cantidad extrae respectivamente (cariofileno 0,02mg/L; $F=3,88$ y humuleno 0,10mg/L; $F=4,15$).

Con el objetivo de obtener condiciones estandarizadas se estimó que las extracciones se realizarían con agua. Si bien el rendimiento de extracción del geraniol mejora con el uso de alcohol al 90% frente al agua, la diferencia entre ambos disolventes comparando el resto de aceites, especialmente el linalool, nos hace elegir el agua como mejor disolvente para realizar los análisis. Del mismo modo, el uso de agua como disolvente nos permite reproducir las mismas condiciones de extracción tanto para la cromatografía de gases como para las pruebas con el panel de análisis sensorial permitiendo relacionar la cantidad de aceites extraídos con la capacidad de detección de los mismos por el panel.

5.2 Análisis de alfa y beta ácidos mediante HPLC

El amargor es uno de los atributos clave de la cerveza y deriva predominantemente de la adición de lúpulo. Este atributo se consigue como resultado de la isomerización de los alfa ácidos por acción del calor en el proceso de ebullición del mosto. La precisión de la medida de estos ácidos es esencial para producir una cerveza con el amargor consistente deseado.

En orden caracterizar las diferentes variedades de lúpulo, se han analizado mediante HPLC la cantidad de alfa y beta ácidos presentes en los pellets de lúpulo que potencialmente configuraran el carácter amargo de la cerveza tras el proceso de ebullición. Aunque el carácter amargo es fundamentalmente dependiente de los alfa ácidos, se han tenido en cuenta ambos compuestos debido al significativo aporte sensorial de los beta ácidos. Los resultados se muestran en la figura 7.

Se pueden clasificar las diferentes variedades de lúpulo en base a la funcionalidad con las que se utiliza en la elaboración de la cerveza. Es de esperar que las variedades

clasificadas como de amargor sean las que tengan una mayor cantidad de alfa y beta ácidos (Fig. 7).

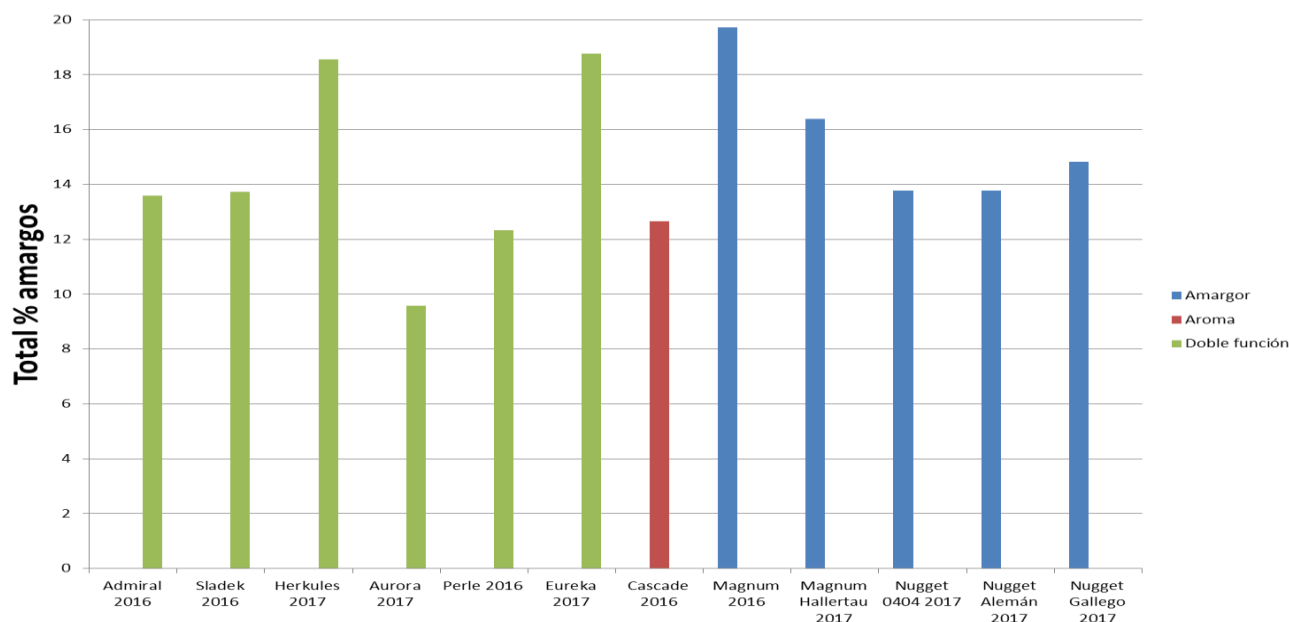


Figura 7. Porcentaje total de α y β -ácidos en las distintas variedades de lúpulo.

Mediante un análisis de la varianza con la herramienta estadística ANOVA se ha determinado que la cantidad media de alfa y beta ácidos contenidos en los lúpulos es estadísticamente significativa entre los tres grupos ($F=0,76$). El amargor medio de las variedades de amargor, aroma y de doble función es diferente en función del grupo. Las variedades de amargor presentan un contenido medio de alfa y beta ácidos del 15,69% mientras que las variedades de doble función presentan un 14,42% y las variedades de aroma un 12,66%. Estos resultados van en concordancia con el objetivo de cada variedad, siendo las de mayor contenido medio en alfa ácidos las que aportan principalmente amargor. Las variedades de aroma y doble función aunque aportan amargor, sus características funcionales posiblemente dependerán de la presencia de otros compuestos.

5.3 Análisis de aceites esenciales mediante CG-FID

Una vez se han definido los aspectos físicos más relevantes que afectan a la extracción de aceites, se han analizado las diferencias entre las variedades de lúpulo. La concentración de aceites esenciales presentes en el lúpulo oscila en función de las variedades, aportando características únicas en relación al aroma y flavor (Oladokun *et al.*, 2017). Para el análisis de aceites, se realizó una extracción de 2gr de pellet de lúpulo en polvo en 200mL de agua ultrapura a 25°C durante 30 minutos. Se transfirieron 10ml de la muestra previamente filtrada a viales espacio cabeza y se

utilizó como patrón interno 1-pentanol. Las muestras se analizaron en el cromatógrafo de gases con detección de llama. Los resultados se muestran en la figura 8.

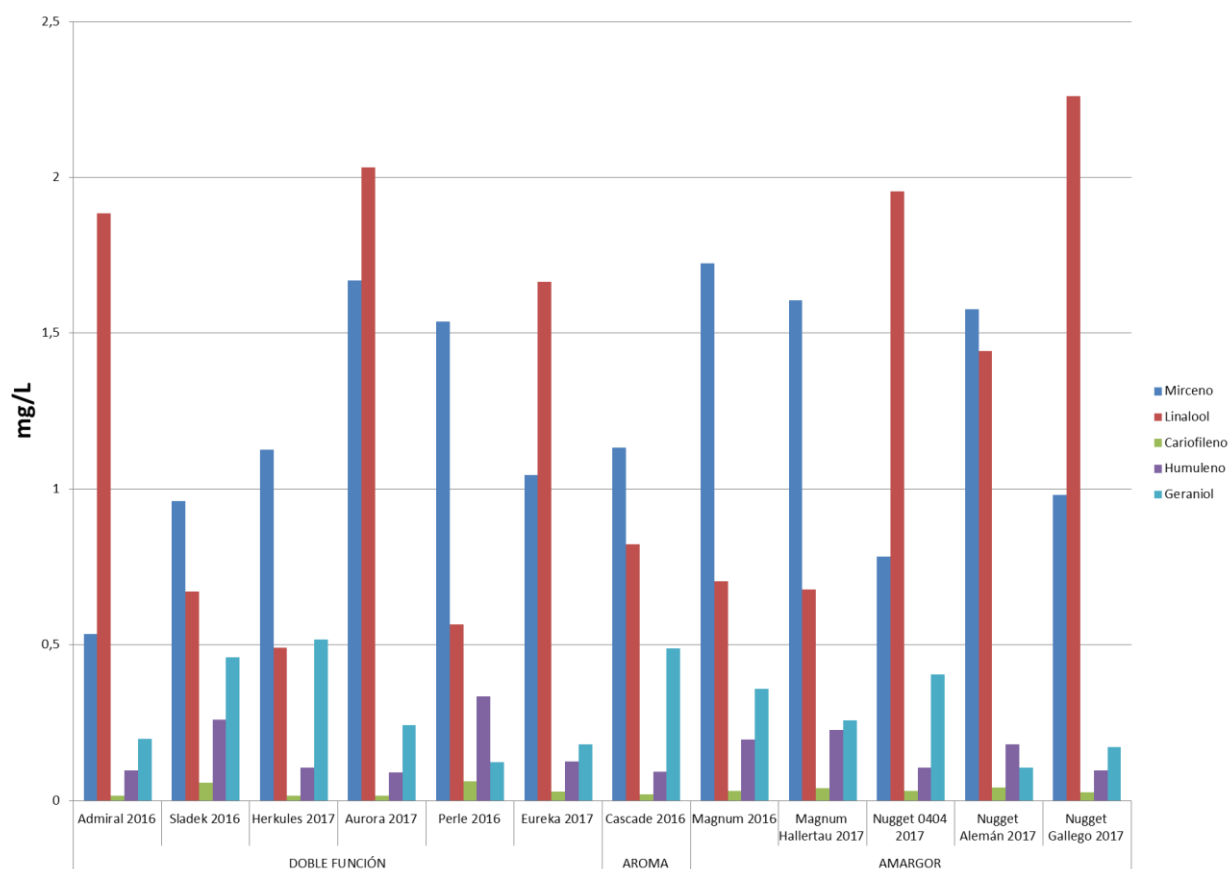


Figura 8. Aceites esenciales presentes en las distintas variedades de lúpulo (mg/L).

Los aceites con los que se ha conseguido una mayor extracción son el mirceno y el linalool, mientras que el cariofileno y humuleno presentan los niveles más bajos de extracción.

Existen diferencias significativas en la concentración de aceites presentes en las variedades de lúpulo. En la extracción por tipo de aceite, el mirceno es mayoritario en la variedad Magnum y Aurora (1,72g/L y 1,66mg/L respectivamente). El linalool se encuentra en altas cantidades en el Nugget Gallego (2,26mg/L), Aurora (2,03mg/L) Nugget 0404 (1,95mg/L) y Admiral (1,88mg/L). El cariofileno se ha extraído en muy baja proporción siendo las dos variedades que mayor concentración presentan Perle (0,06mg/L) y Sladek (0,05mg/L). Perle es la variedad con mayor concentración de humuleno extraído (0,33mg/L). El geraniol destaca en las variedades Herkules (0,51mg/L), Cascade (0,48 mg/L), Sladek (0,45 mg/L) y Nugget 0404 (0,40 mg/L).

5.4 Análisis Sensorial

Los aceites esenciales de lúpulo contienen gran cantidad de compuestos aromáticos volátiles normalmente descritos con términos sensoriales tales como “floral”, “afrutado”, “cítrico” “picante”, “herbal” o “resinoso” cuando se describen en cerveza. Con el objetivo de caracterizar los aceites en lúpulo y correlacionarlos con los descriptores sensoriales característicos de la cerveza se ha realizado el análisis sensorial de 9 variedades de lúpulo presentes en el mercado. Mediante una infusión en frío, el panel de catadores experto ha descrito cada variedad de lúpulo utilizando para ello el cuestionario “Evaluación de Variedades de Lúpulo en Infusión” (ANEXO I).

En base a la información contenida en la ficha técnica de análisis sensorial facilitada por el proveedor Barth-Haas Group se estableció el protocolo de infusión en frío para la cata de muestras de lúpulo. Para realizar la infusión fue necesario adicionar 2gr de lúpulo molido por cada 200ml de agua ultrapura, dejando macerar a 25°C durante 30 minutos. Tras la maceración las muestras fueron filtradas y se sirvieron entorno a 150ml de cada muestra por cada catador. Los resultados del espectro sensorial de cada lúpulo se muestran en las figuras 9 a 20.

Se han relacionado mediante bibliografía y los datos aportados por el panel de catadores los resultados del análisis sensorial y la extracción mediante CG-FID de los aceites de lúpulo. Se han estimado las conexiones entre los descriptores sensoriales utilizados y el aceite al que correspondería el aroma y flavor (Tabla 3).

Tabla 3. Relación aceites-descriptores sensoriales

Mirceno	Picante, Especia, Frutal, Herbal, Dulce
Humuleno	Espicias, Mezcla
Geraniol	Floral, Frutal
Linalool	Cítrico
Cariofileno	Picante, Resinoso, Dulce

La variedad Admiral (Fig. 9) se ha caracterizado por el panel principalmente como cítrico, floral y resinoso. Estos atributos están relacionados con los aceites linalool, geraniol, cariofileno y mirceno.

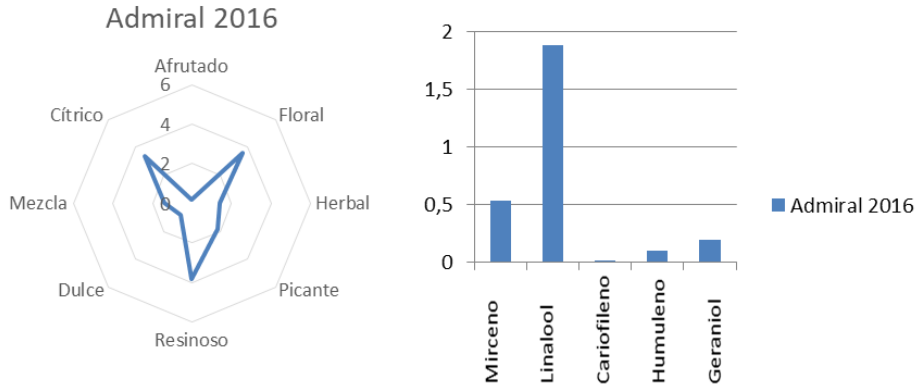


Figura 9. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Admiral 2016.

La variedad Sladek (Fig. 10) destaca como picante, herbal y un poco cítrica. Estas características se relacionan con los cariofileno, mirceno y linalool, mayoritarios en esta variedad.

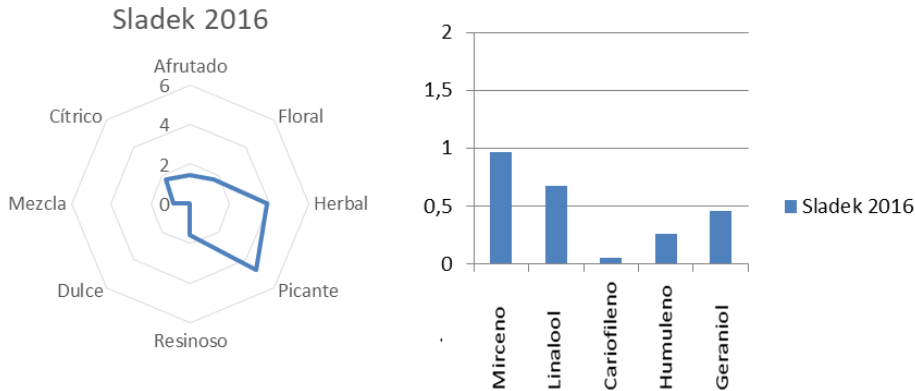


Figura 10. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Sladek 2016.

La variedad Herkules (Fig. 11) destaca como picante, herbal y resinosa. Estos se relacionan con los aceites mirceno y cariofileno.

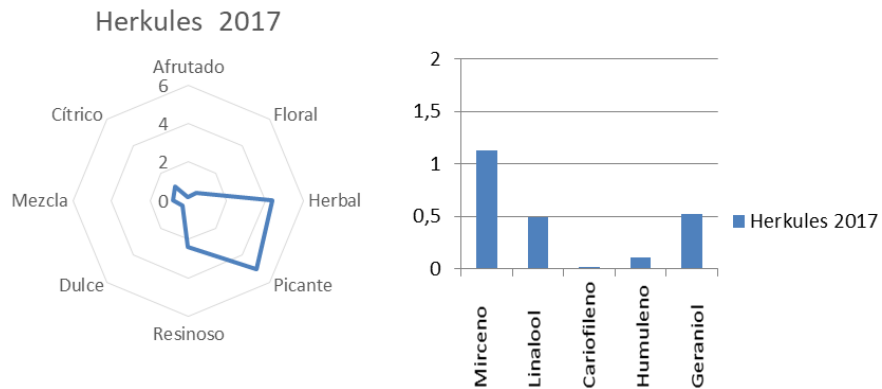


Figura 11. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Herkules 2017.

La variedad Aurora (Fig. 12) es muy floral, herbal, resinosa y cítrica. Estas características se deben a la presencia de los aceites linalool, geraniol, mirceno y cariofileno.

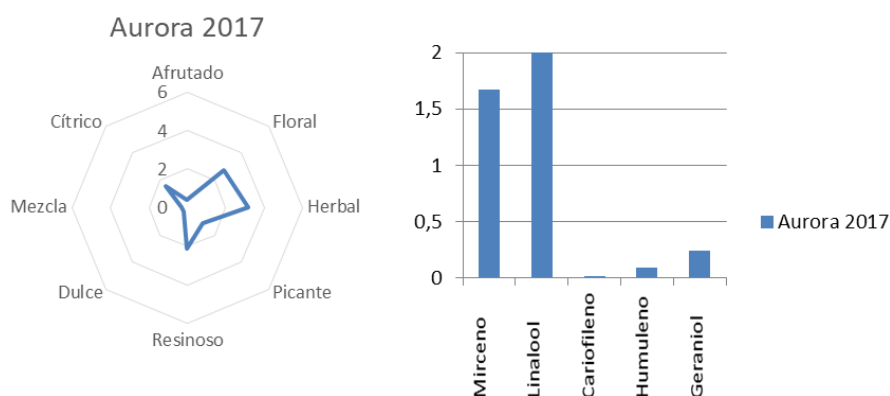


Figura 12. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Aurora 2017.

La variedad Perle (Fig. 13) se caracteriza por ser muy cítrica, algo herbal y resinosa. Relacionado con los aceites linalool, mirceno y cariofileno.

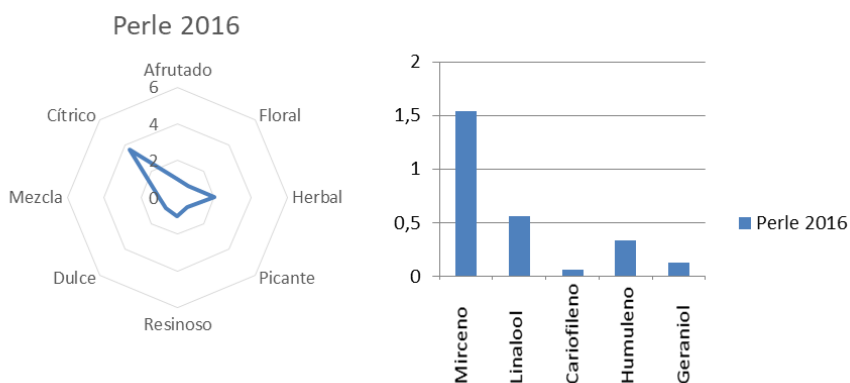


Figura 13. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Perle.

Eureka (Fig. 14) es una variedad herbal, picante, resinosa y un poco cítrica. Se relaciona con los aceites mirceno, cariofileno y linalool.

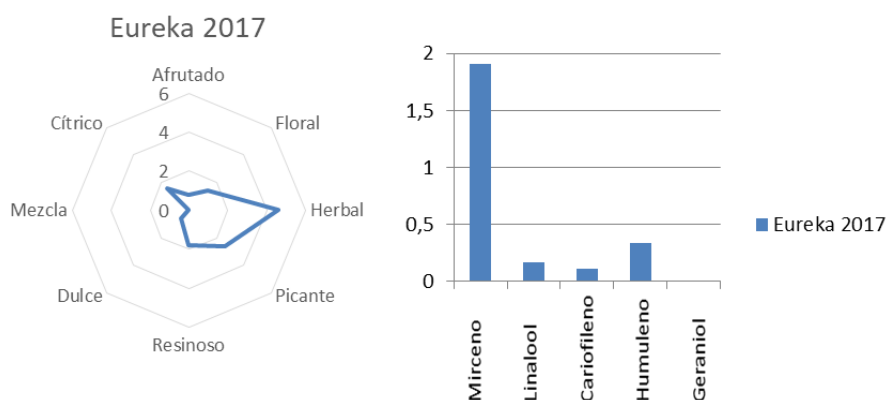


Figura 14. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Eureka 2017.

La variedad Cascade (Fig. 15) es resinosa, picante, cítrica y algo floral. Relacionado con los aceites mirceno, geraniol y linalool.

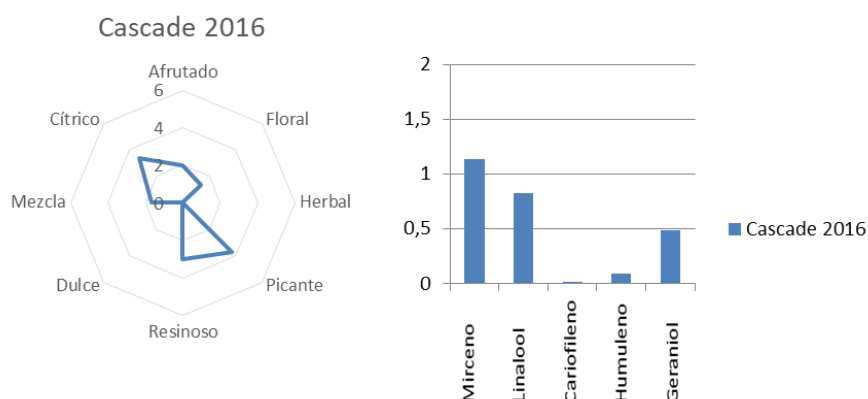


Figura 15. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Cascade 2016.

Dentro de las variedades de amargor, el lúpulo Magnum 2016 herbal, picante, resinoso, mezcla y un poco cítrico. Ésta se encuentra relacionada con los aceites mirceno, humuleno, cariofileno y linalool.

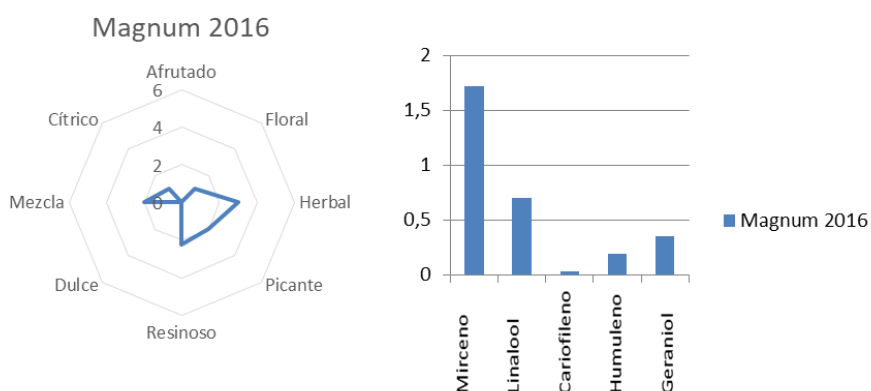


Figura 16. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Magnum 2016.

Al igual que la variedad Magnum 2016 (Fig.16), el Magnum Hallertau de 2017 (Fig.17) es cítrico, picante y resinoso. Sin embargo, presenta características florales lo que está relacionado con el geraniol además de linalool, cariofileno y mirceno.

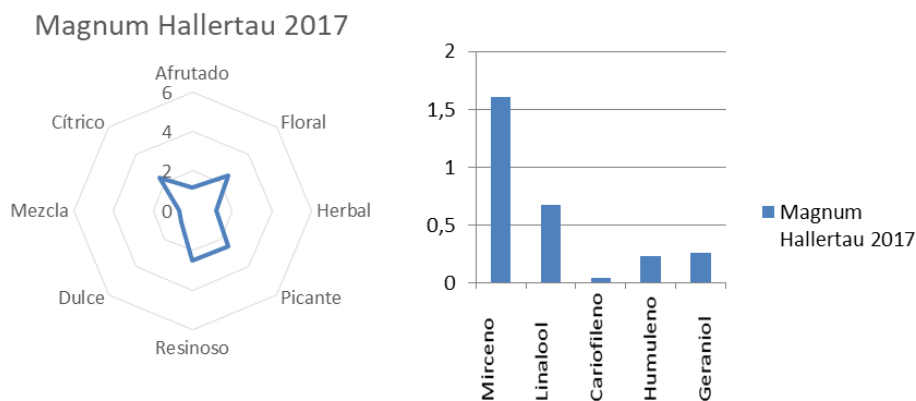


Figura 17. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Magnum Hallertau 2017.

El Nugget 0404 (Fig.18) presenta características florales, herbal, picante, resinoso y cítrico. Relacionado con aceites mirceno, humuleno, cariofileno y linalool. El Nugget Alemán (Fig.19) es floral, herbal, resinoso, y en menor medida que el Nugget 0404 cítrico. Relacionado con aceites geraniol, mirceno, cariofileno y linalool.

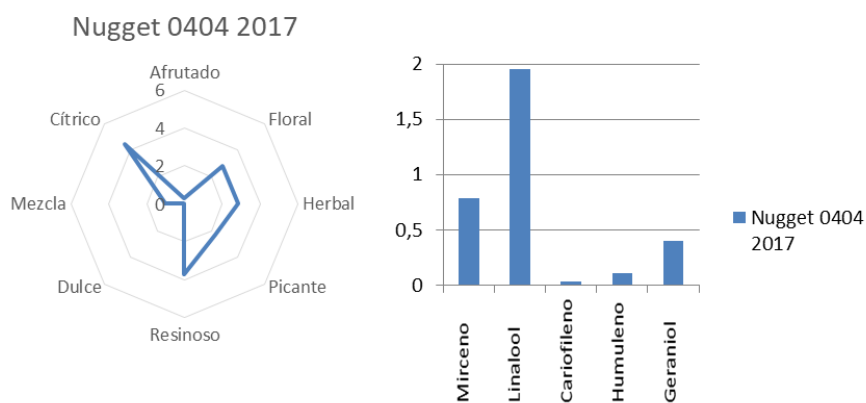


Figura 18. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Nugget 0404 2017.

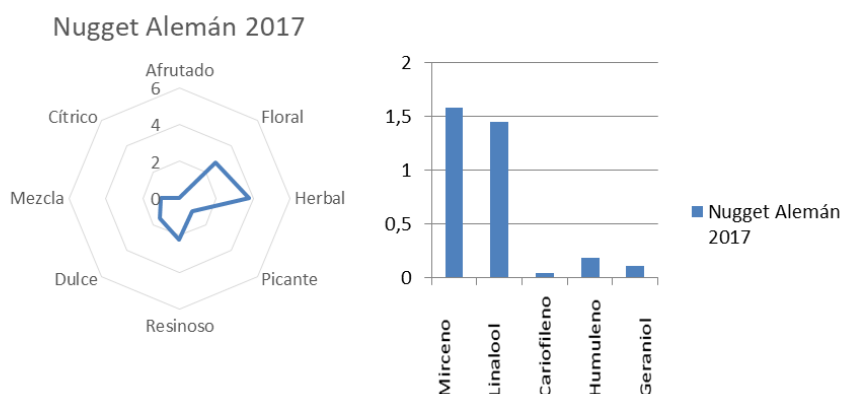


Figura 19. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Nugget Alemán 2017.

El Nugget Gallego (Fig. 20) presenta las características herbal, floral, picante, mezcla y en menor medida que el Nugget 0404 resinoso. Está relacionado con los aceites geraniol, mirceno, cariofileno y humuleno destacando en linalool entre los tres nuggets.

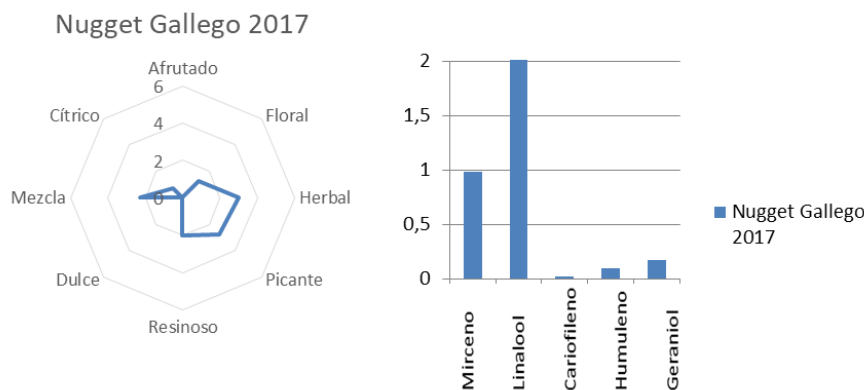


Figura 20. Perfil sensorial y aceites esenciales de la variedad Nugget Gallego 2017.

6. Discusión y Conclusiones

El método de extracción definido en este trabajo utiliza el agua como disolvente, una temperatura de 25°C durante 30 minutos y elimina el uso de sal en los viales. A pesar de que el rendimiento sea bajo, este medio presenta la ventaja de simular la matriz de la cerveza como componente mayoritario. Al contrario que otras técnicas, no presenta serias desventajas como el requerimiento de equipamiento costoso, cantidades significativas de solventes contaminantes y tóxicos para el medio ambiente, métodos con multitud de pasos que disminuyen la eficacia y la necesidad de concentrar los analitos hasta alcanzar niveles detectables.

El análisis de los compuestos amargos mediante HPLC ha permitido trabajar con una clasificación bien diferenciada dentro de las variedades de lúpulo: de doble función, aromáticas y amargas. Además, esta cantidad aporta una idea del potencial amargor que presentará cada variedad. Sin embargo, esta clasificación no es válida en el análisis de aceites ya que no existe diferencia en las concentraciones obtenidas entre variedades que nos permita realizar una agrupación de las mismas.

Al realizar la extracción con agua bajo condiciones estandarizadas, podemos relacionar con el panel de análisis sensorial la detección de aroma y flavor característico con los aceites esenciales más destacados de cada lúpulo. Siendo así, se ha deducido que los lúpulos con doble funcionalidad presentan mayoritariamente altas concentraciones de mirceno, linalool (especialmente destacan las variedades Aurora y Admiral), humuleno y geraniol (a excepción de Eureka). En general responden a un espectro sensorial relacionado con aromas cítricos, picantes y florales. Los lúpulos clasificados como aromáticos como el Cascade tienen cantidades muy balanceadas de mirceno, linalool y geraniol mientras que presentan bajas cantidades de humuleno y cariofileno. Estas características hacen que el panel de catadores los

haya definido como picantes, resinosos y cítricos. Por otro lado, las variedades definidas como de amargor presentan en el caso del Magnum altas cantidades de mirceno y bajas de linalool mientras que en el caso del Nugget ocurre al contrario, presentan bajo mirceno y alto linalool además de menos geraniol que el Magnum. Esto permite definir el perfil como muy herbales, resinosos y cítricos.

El perfil sensorial de cada lúpulo es único y característico de la variedad. Este perfil no viene definido únicamente por la presencia de un aceite, sino que responde a la actividad sinérgica y acción conjunta de varios compuestos aromáticos. Actualmente podemos encontrar un amplio rango de aromas en función de la variedad que se utilice en la producción de cerveza, lo que aumenta la diversidad de productos y posibilita el desarrollo de nuevos tipos de cervezas con características muy diferentes entre ellas.

La matriz de la cerveza y los procesos que afectan a los compuestos aromáticos de los lúpulos juegan un papel clave en el efecto que aporta el lúpulo en el carácter sensorial de las cervezas. Con el objetivo de conocer y caracterizar mejor las variedades, es necesario un mayor análisis en el campo de estudio del lúpulo. Estos avances permitirán incrementar la eficacia de los procesos relacionados con el lúpulo y conocer los cambios acontecidos en los compuestos durante el proceso de elaboración de la cerveza.

7. Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al tutor de este trabajo, el Dr. Carlos Blanco, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo. Agradezco a mis tutoras de prácticas Ana Isabel Calviño y Yolanda Cabado por la dirección y la ayuda facilitada. Asimismo, agradezco a mis compañeros del Departamento de Calidad de Estrella Galicia y al panel de catadores su participación, orientación y ayuda.

8. Bibliografía

- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N., y Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79 (2), 324–331
- Barrado, J. A. (2014). Cultura Cervecera. Historia de la cerveza II. [en línea] Disponible en <<https://cerveceraIndependiente.com/cultura-cervecera/historia-de-la-cerveza-ii/>> [Fecha consulta: 17/05/2018]
- Bonnländer, B., Cappuccio, R., Liverani, F.S., Winterhalter, P. (2006). Analysis of enantiomeric linalool ratio in green and roasted coffee. *Flavour Fragrance J.* 21,637–641.
- Charry-parra, G., Dejesus-echevarria, M., & Perez, F. J. (2011). Beer Volatile Analysis : Optimization of HS / SPME Coupled to GC / MS / FID, 76(2), 205–211.
- Cerdán, M. (2015). El lúpulo, parte II.[en línea] Disponible en : <<http://www.cerveceroscaseros.com.ar/influpulo.htm>> [Fecha consulta: 26/05/2017].
- De Keukeleire, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica Nova*, 23(1), 108–112.
- Dupire, S. (1999). Determination of DMS and other Volatile Compounds in Beer by Headspace Capillary Gas Chromatography and Flame Ionisation Detection Submitted by S . Dupire on behalf of the Analysis Committee of the European Brewery Convention The determination of beer vol. *Journal of The Institute of Brewing*, 105(5), 265–267.
- Eyres, G., Marriott, P., y Dufour, J. (2007). Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6252–6261.
- Eyres, G., Marriott, P., Leus, M., y Lysaght, B. (2015). Characterisation of impact aroma compounds in hop essential oils. Weurman flavour research symposium (15 September 2015 to 19 September 2015).
- Fachuerlag, H. C. (2010). Analytica EBC, European Brewery Convention. Fahner Druck GmbH, Alemania, 794.
- Gigliarelli, P. (2009). *El hervor*. Revista Mash [en línea] Disponible en: <<http://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=364>> [Fecha consulta: 02/07/2018]
- Goldstein, H., Ting, P., Navarro, A., Ryder, D. (1999). Water soluble hop flavor precursors and their role in beer flavor. *Proc. 27th Cong. Eur. Brew. Conv.*, Cannes, 53-62.
- Guadayol Cunill, J. M. (1994). *Estudio de los parámetros para la determinación de los compuestos orgánicos volátiles de la oleoresina de pimentón*. Universidad Politécnica de Cataluña.

- Hertel, M., & Dillenburger, M. (2011). Low temperature wort flavour evaporation : A new dimension in evaporation. *Cerevisia*, 36(1), 11–16.
- Hijos de Rivera. (2017). *La cerveza según Hijos de Rivera*. Seteseis Comunicación Creatividade S.L., 1ºEd. , España. 76.
- Hughes, P. y Simpson, W.J. (1996). Bitterness of congeners and stereoisomers of hop-derived bitter acids found in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54:234-237.
- Katsiotis, S.T., Langezaal, C.R. y Scheffe, J.J.C. (1989). Analysis of the Volatile Compounds from Cones of Ten *Humulus lupulus* Cultivars. *Planta Medica*, 55: 634.
- Kunze, W. (2006). *Tecnología para cerveceros y malteros*. VLB Berlín, 1075.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018). *Cultivos Herbáceos e Industriales: Lúpulo*. [en línea] Disponible en <<http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/lupulo/>> [Fecha consulta: 05/06/2018]
- Morales, P. M. T., & Gutiérrez, R. A. F. (1981). Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles de aceites vegetales. *Grasas Y Aceites. Revistas CSIC*, (c), 164–173.
- Oladokun, O., James, S., Cowley, T., Dehrmann, F., Smart, K., Hort, J., & Cook, D. (2017). Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma, 230, 215–224.
- Oladokun, O., Tarrega, A., James, S., Cowley, T., Dehrmann, F., Smart, K., ... Hort, J. (2016). Modification of perceived beer bitterness intensity , character and temporal profile by hop aroma extract, 86, 104–111.
- Oliver, G., & Colicchio, T. (2011). *The Oxford companion to beer*. New York: Oxford University Press, 490.
- Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Santos, H. M. L. M. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction, 1121, 145–153.
- PubChem, Open Chemistry Database. (2018). [en línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/myrcene#section=Top> [Fecha consulta: 18/06/2018]
- 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. Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales. [en línea] Disponible en <https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2016-11952> [Fecha consulta: 18/05/2018].
- Roberts, T. R. (2016). *Brewing Materials and Processes*. Elsevier Inc, 3:47-75.
- Schutter, D. P. De, Saison, D., Delvaux, F., Derdelinckx, G., Rock, J., Neven, H., & Delvaux, F. R. (2008). Optimisation of wort volatile analysis by headspace solid-

phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry, *1179*, 75–80.

Snow, N.H. y Slack, G.C. (2002). Headspace analysis in modern gas chromatography. *Trends Anal Chem* 21:608-17.

Steenackers, B., Cooman, L. De, & Vos, D. De. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process : A review. *Food Chemistry*, 172, 742–756.

Tinseth, G. (1993). Hop Aroma and Flavor. *Brewing Techniques*. [en línea] Disponible en <<http://realbeer.com/hops/aroma.htm>> [Fecha consulta: 04/06/2018]

Van Opstaele, F., Goiris, K., De Rouck, G., Aerts, G., & De Cooman, L. (2012). Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets. Part 1: Preparation of single variety total hop essential oils and polar hop essences. *Cerevisia*, 37(4), 97–108.

Walsh, A. (1998). The mark of nobility. An investigation into the purity of noble hop lineage. *Brewing Techniques*, 2:60-69.

Yange, X., Lederer, C. McDaniel, M. y Deinzer, M. (1993). Evaluation of hydrolysis products of humulene epoxides II and III. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (8): 1300-1304.

9. ANEXO I: Cuestionario “Evaluación de Variedades de Lúpulo en Infusión”

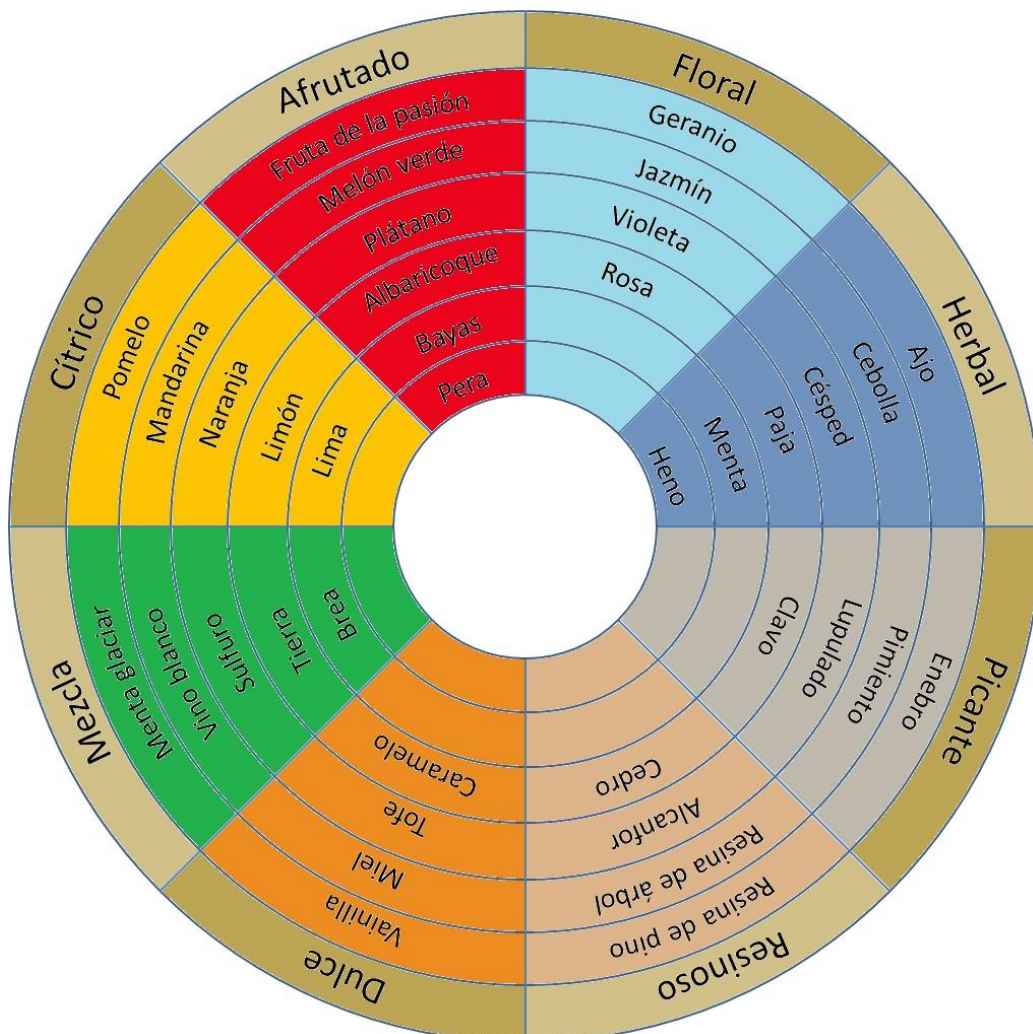
Fecha:

Número de catador:

Código de variedad:

Evaluación de Variedades de Lúpulo en Infusión

1. Por favor, marque las impresiones que obtuvo al oler la muestra de lúpulo. Indique la intensidad al lado de cada descriptor valorado en una **escala del 1-9**, donde 1 es muy poco intenso y 9 muy intenso.



2. Indique otros aromas encontrados (no mencionados anteriormente):

3. En relación al tacto, ¿Qué sensaciones percibe en la muestra en boca?

4. Indique las sensación de amargor (Muy alto, Alto, Medio, Bajo y Muy Bajo):

- Gusto:

- Postgusto:

5. Aspectos hedónicos. Indique con una X en qué grado le parece aceptable la muestra.

	Olor	Tacto	Amargor Gusto	Amargor Postgusto
Me gusta mucho				
Me gusta				
Ni me gusta ni me disgusta				
No me gusta				
Me disgusta mucho				

¡Muchas gracias!