

Levaduras autóctonas de origen sidrero para la elaboración de cerveza

ROBERTO RODRÍGUEZ MADRERA. Área de Tecnología de los Alimentos.

ROSA PANDO BEDRIÑANA. Área de Tecnología de los Alimentos. rpando@serida.org

BELÉN SUÁREZ VALLES. Área de Tecnología de los Alimentos. mbsuarez@serida.org



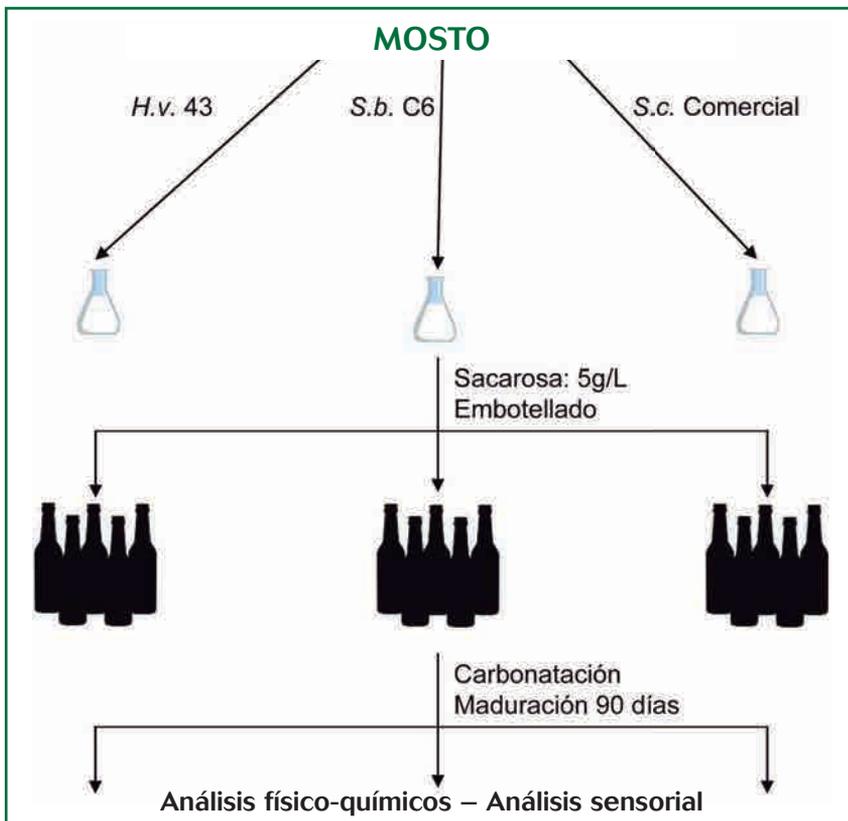
Figura 1.-Diseño experimental seguido para la elaboración de cervezas.

La reglamentación española define la cerveza como el “alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales” (Real Decreto 678/2016). Se entiende como mosto cervecero el producto obtenido a partir de malta molida o de sus extractos, mediante extracción acuosa al que se agregará lúpulo o sus derivados y que finalmente se somete a un proceso de cocción.

Es importante destacar que a diferencia de otras bebidas alcohólicas, en las que la fermentación se produce espontáneamente por la microbiota natural, en el caso de la cerveza se recurre al uso de un cultivo iniciador o *starter* de levaduras seleccionadas que garantizan la regularidad de las elaboraciones.

El principal papel de las levaduras es consumir los azúcares del mosto originando, además de etanol y anhídrido carbónico (CO₂), numerosos compuestos responsables de olores y sabores, que unidos a las características aportadas por la malta y el lúpulo, dan el perfil sensorial y la sensación en boca característica de cada cerveza. Es por ello, que existen en el mercado amplios catálogos de levaduras cerveceras, principalmente del género *Saccharomyces*, que permiten elegir la cepa en función del tipo de cerveza que se desee elaborar.

En el SERIDA se dispone de una Colección de Cultivos Autóctonos de origen sidrero constituida por cepas de levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas. En los últimos años, se han realizado trabajos de identificación y caracterización de la Colección con el objetivo de contribuir al conocimiento y preservación de la biodiversidad microbiana, posibilitando con ello su uso en procesos biotecnológicos. En el caso particular de las levaduras, se han seleccionado cepas de diferentes géneros y especies, con excelente aptitud para realizar la fermentación alcohólica, capaces de dar lugar a productos con perfiles aromáticos bien diferenciados.





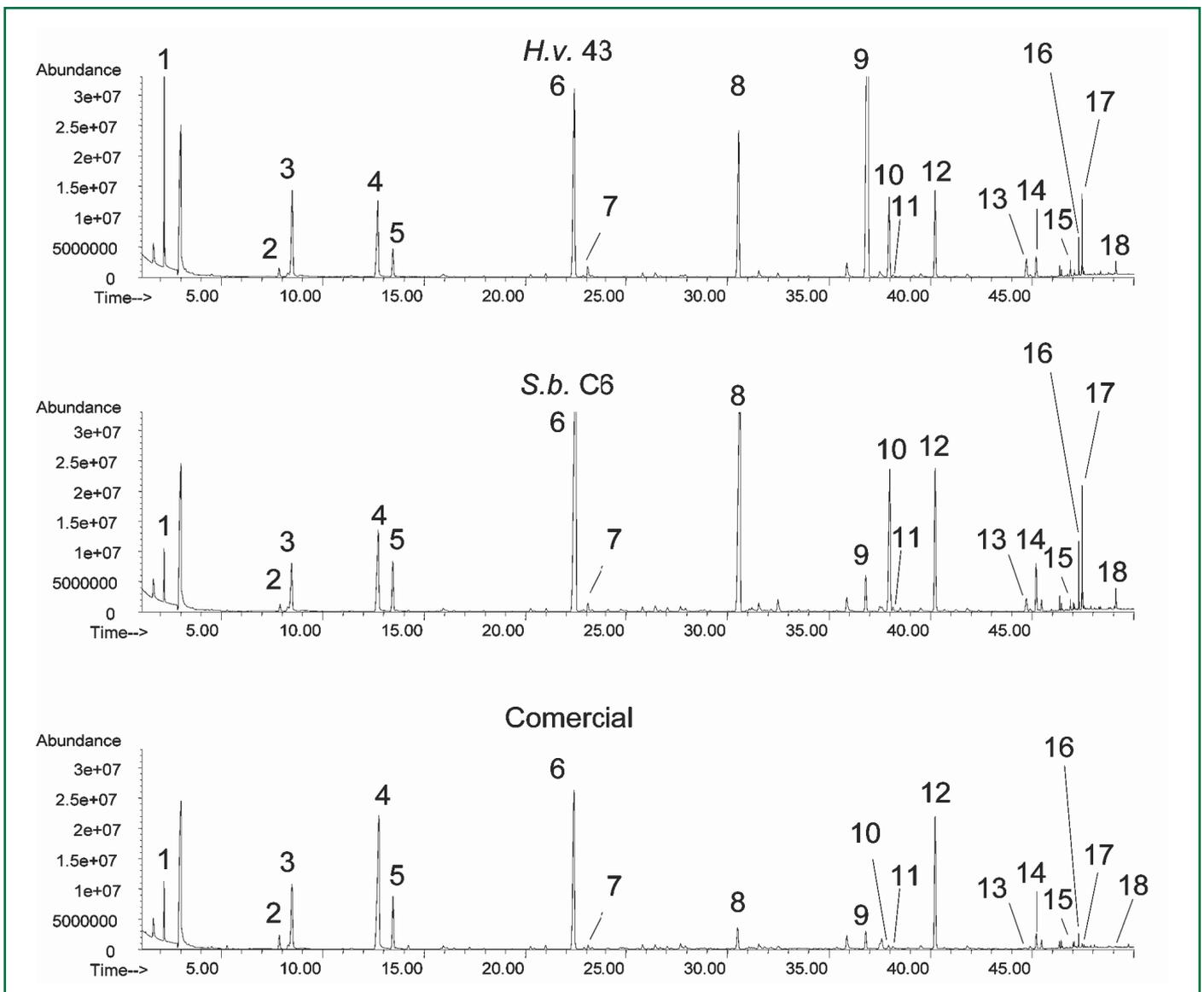
En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la elaboración de cerveza con cepas sidreras de la Colección de Cultivos pertenecientes a las especies *Saccharomyces bayanus* y *Hanseniaspora valbyensis*.

Mosto cervecero y fermentación

El mosto de preparó a partir de un extracto comercial de malta y lúpulo "Brewmaker Pilsner Lager" (Brewmaker Cedars Malting Stowmarket Suffolk, Reino Unido). Según indica el fabricante se diluyó el extracto (100 g/L) en agua destilada y se suplementó con azúcar (33g/L). A continuación, el mosto se hierve (30 min), se enfría (20 °C) y se trasvasa a matraces de fermentación.

Para la elaboración de las cervezas se eligió una levadura cervecera *Saccharomyces cerevisiae* (Ref: Nottingham-Ale-Yeast, Lallemand) y las cepas sidreras *Saccharomyces bayanus* (Ref: S.b. C6, SERIDA) y *Hanseniaspora valbyensis* (Ref: H.v. 43, SERIDA). Las cepas autóctonas se inocularon a una concentración de 10⁶ ufc/mL, a partir de un cultivo puro con una densidad celular de 2x10⁹ ufc/mL, y la cepa comercial a una concentración de 100 g/hL. Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado (20° C). Finalizada la fermentación alcohólica, cada lote de cerveza se decantó y se embotelló añadiendo 5g/L de sacarosa para facilitar la toma de espuma en botella. Las cervezas se mantuvieron a 20° C durante tres meses y al cabo de este tiempo se analizaron y cata-

↓
Figura 2.-Cromatogramas obtenidos por análisis del espacio de cabeza en las cervezas elaboradas.
 1: acetato de etilo; 2: isobutanol; 3: acetato de isoamilo; 4: alcoholes amílicos; 5: hexanoato de etilo; 6: octanoato de etilo; 7: ácido acético; 8: decanoato de etilo; 9: acetato de 2-feniletilo; 10: dodecanoato de etilo; 11: ácido hexanoico; 12: 2-feniletanol; 13: tetradecanoato de etilo; 14: ácido octanoico; 15: 4-vinilguayacol; 16: hexadecanoato de etilo; 17: ácido decanoico; 18: ácido dodecanoico.

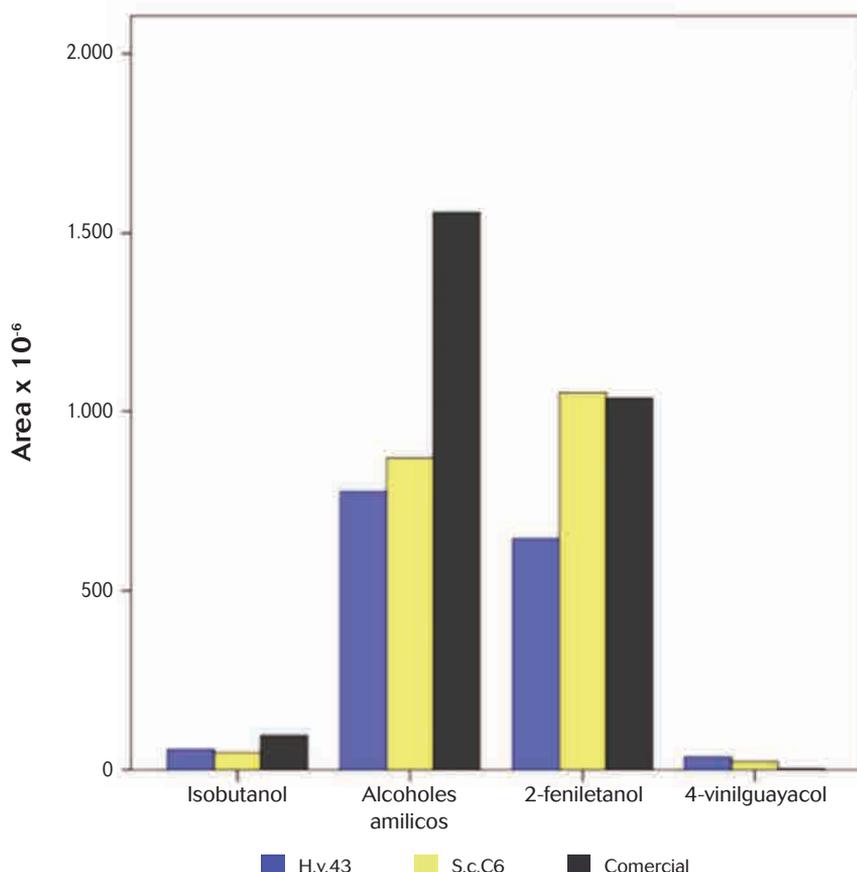


	Densidad (g/mL)	TS	DS	G (g/L)	F	Azúcares*	pH	Color	Amargor (IBU)	Extracto seco (g/100 mL)	% vol	°Plato
Mosto	1,0457	13,9	66,7	6,8	1,0	88,4	5,9	18,1	32,2	123,9	0,0	11,4
H.v. 43	1,0058	10,3	n.d.	n.d.	n.d.	10,3	4,1	16,6	29,7	40,4	5,6	12,4
S.b. C6	1,0072	12,3	n.d.	n.d.	n.d.	12,3	4,1	16,2	27,0	42,9	5,3	12,4
Comercial	1,0027	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	2,3	3,8	17,0	28,0	33,4	5,9	12,3

↑
Tabla 1.-Características el mosto y las cervezas elaboradas.

TS: Trisacáridos, expresados como maltotriosa.
DS: Disacáridos, expresados como maltosa.
G: Glucosa. F: Fructosa.
n.d.: No detectado.
*: suma de TS, DS, F y G.

↓
Figura 3.-Niveles de alcoholes en las cervezas.



ron. En la Figura 1 se presenta el diseño experimental.

Análisis físico-químicos y sensoriales

En mosto y cerveza, se determinaron, siguiendo los métodos de la European Brewery Convention (EBC): la densidad (densimetría), el grado alcohólico (destilación y densimetría), el extracto seco primitivo o grado plato (cálculo: fórmula de Balling), el extracto seco total (densimetría), el pH (potenciometría), el amargor (IBU unidades: espectrofotometría a 275 nm) y el color (espectrofotometría a 430 nm). Los azúcares fueron analizados, siguiendo el método validado por nuestro

grupo de trabajo, sobre una columna Sugar-Pak y cromatografía HPLC-IR.

En las cervezas se analizó el perfil aromático mediante microextracción en fase sólida del espacio de cabeza seguido de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (SPME-HS-GC-MS). Las condiciones de la extracción fueron las siguientes: Volumen del vial: 20 mL; volumen de muestra: 10 mL; T^a extracción: 50 °C; Tiempo de extracción: 30 min. Fase estacionaria: PDMS/DVB (65 µm). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Temperatura del inyector: 280 °C; Tiempo de desorción 15 min; Modo de inyección: Splitless (2 min); Columna: DB-WAX 30 m x 320 µm x 0.5 µm; Flujo: 3 mL/min. Horno: Temperatura inicial: 40 °C (5 min) rampa 3 °C/min hasta 160 °C (0 min) rampa 30 °C/min hasta 225 °C (10 min). Detección: Modo Scan.

Las cervezas fueron evaluadas sensorialmente, en una única sesión, por catadores habituales del Área de Tecnología de los Alimentos. Se utilizó una ficha cervecera clásica, en la que se valoran la fase visual, olfativa y de boca, además de la complejidad y equilibrio. Los atributos fueron valorados en una escala de intensidad creciente: 1 (Inapreciable), 2 (Suave), 3 (Fuerte), 4 (Intenso) y 5 (Muy intenso).

Resultados

En la Tabla 1, se resumen las características del mosto y las cervezas elaboradas.

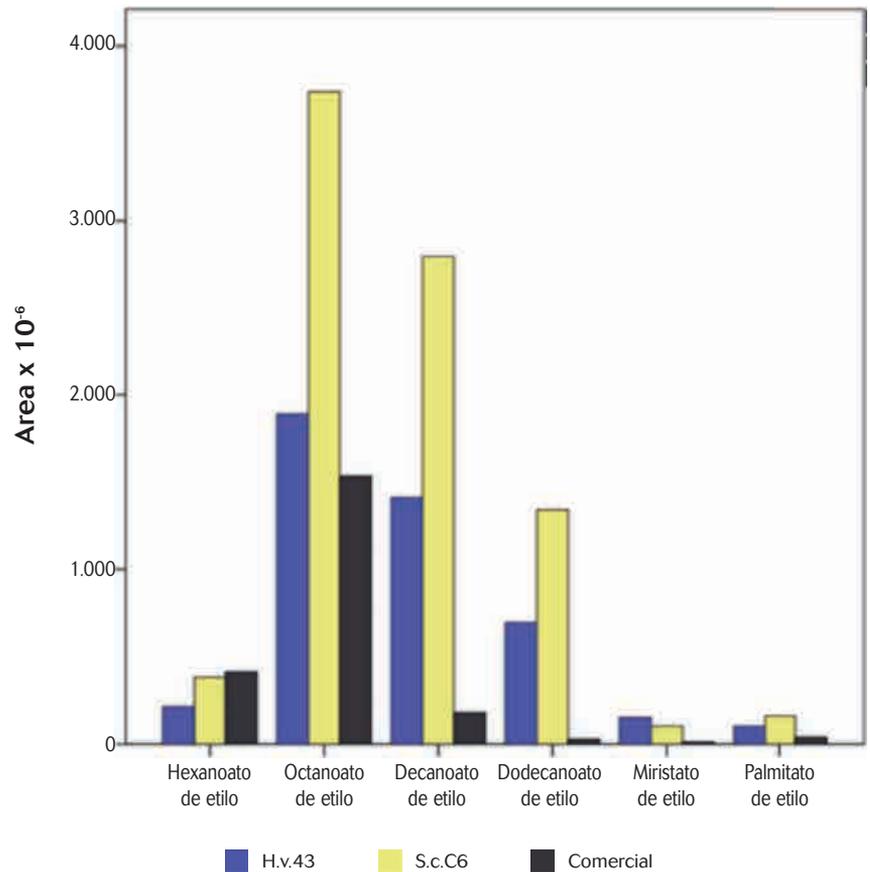
Se apreciaron diferencias importantes en el tiempo de fermentación del mosto en función de la cepa inoculada. La levadura comercial sólo necesitó dos semanas para consumir el 90% de los azúca-

res, mientras que las cepas autóctonas mostraron fermentaciones más lentas, especialmente, los mostos inoculados con la levadura no *Saccharomyces* (*H.v. 43*) cuya velocidad de metabolización de los azúcares resultó cuatro veces menor.

En todos los casos se detectó un descenso del pH durante la fermentación respecto al mosto, debido a la desaminación de los aminoácidos y a la producción de CO_2 , con valores finales ligeramente más elevados en las cervezas elaboradas con las cepas autóctonas. No obstante, todas las cervezas cumplen con el requisito de calidad establecido para este parámetro ($\text{pH} \leq 5,5$). También se detectaron diferencias en el extracto seco, la densidad y la producción de etanol, siendo la cerveza elaborada con la cepa *Saccharomyces* comercial la que mostró mayor grado alcohólico (Tabla 1).

Uno de los parámetros con mayor interés en el perfil sensorial de la cerveza es su amargor (IBU). Este parámetro es una característica deseable en toda cerveza y se contrapone al sabor dulce de la malta. La causa del amargor se deriva de la isomerización y la solubilización de los α -ácidos aportados por los lúpulos durante la cocción del mosto. La intensidad y calidad varían en función del estilo de cerveza. En todas las cervezas analizadas se detectó un ligero descenso del IBU frente al valor inicial del mosto, con variaciones que oscilaron entre el 7,6% (*H.v. 43*) y el 16,0 % (*S.b. C6*).

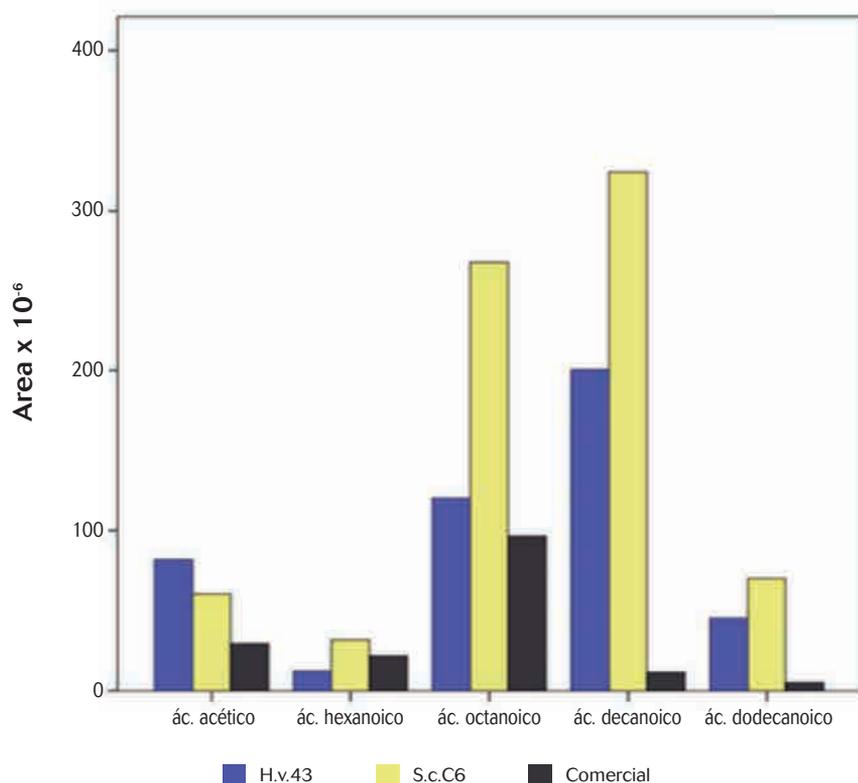
En cervecería, es habitual hablar del nivel de atenuación de la levadura usada, entendiendo como tal la capacidad para convertir los azúcares fermentables en etanol. Una levadura produce una alta atenuación cuando la práctica totalidad de azúcares han desaparecido, dando lugar a una cerveza proporcionalmente más alcohólica, con menos cuerpo y más seca. En este ensayo las cepas de origen sidrero poseen menor capacidad de atenuación, esto es, estas cepas únicamente metabolizaron pequeñas cantidades de maltotriosa. Este trisacárido de glucosa siempre está presente en el mosto cervecero y proviene, al igual que otras dextrinas y azúcares, de la degradación del almidón de los cereales.



Se eligió la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases para el análisis de los volátiles por ser una técnica sencilla, rápida, fácilmente automatizable y que no necesita solventes. Los compuestos fueron extraídos por inmersión de una fibra de polidivinilsiloxano/divinilbenceno en el espacio de cabeza (HS) de la muestra y finalmente liberados en el cromatógrafo de gases por desorción térmica. Se identificaron un total de 18 compuestos pertenecientes a distintas familias aromáticas (Figura 2).

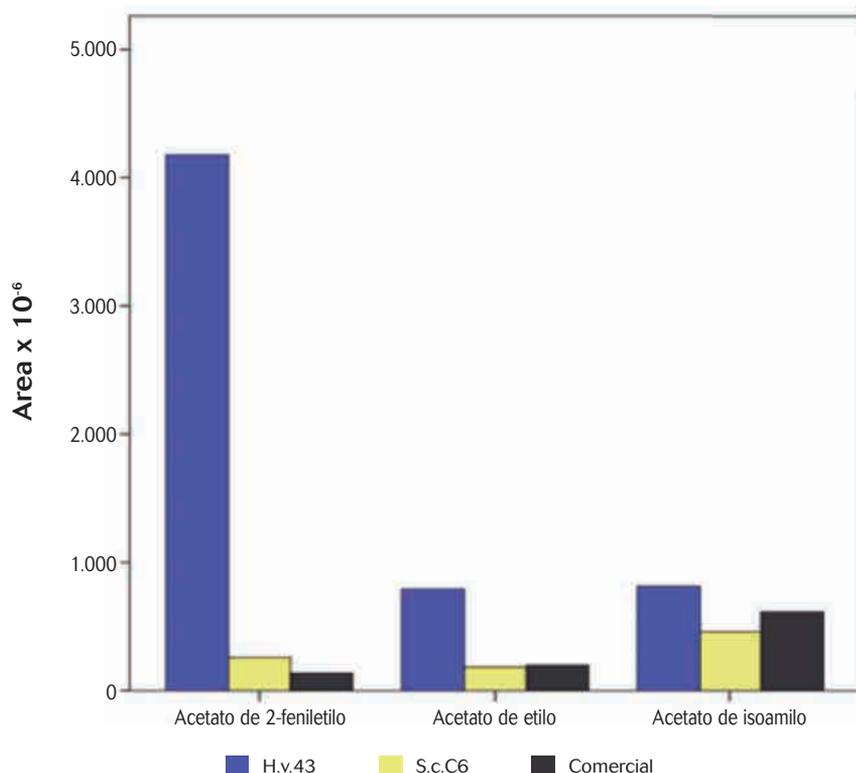
Los alcoholes amílicos (3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol) son, junto con el etanol, los principales alcoholes de las bebidas fermentadas. El análisis del espacio de cabeza de las cervezas mostró una mayor concentración de estos alcoholes, entre 1,8 y 2,0 veces, en la fermentación con la cepa comercial (Figura 3). Igualmente se detectó un mayor contenido de isobutanol en la cerveza elaborada con la levadura comercial, mientras que la concentración de 2-feniletanol (aroma floral, rosas) fue superior en las cervezas elabo-

↑
Figura 4.-Niveles de ésteres etílicos en las cervezas.



↑
Figura 5.-Niveles de ácidos grasos en las cervezas.

↓
Figura 6.-Niveles de ésteres del ácido acético en las cervezas.



radas con las dos levaduras *Saccharomyces*. Por el contrario, las cepas autóctonas produjeron los mayores niveles de 4-vinilguayacol, responsable de un característico aroma especiado (clavo, curry).

Entre los volátiles minoritarios, se detectaron importantes diferencias en los perfiles de ácidos grasos y sus ésteres etílicos. En este sentido, cabe resaltar el mayor contenido global de ésteres observado en las cervezas elaboradas con las cepas autóctonas *S.b. C6* y *H.v. 43*, destacando desde el punto de vista cuantitativo los ésteres octanoato, decanoato y dodecanoato de etilo (Figura 4). Esta familia aromática destaca por aportar a las bebidas carácter afrutado.

Al igual que se observó en los ésteres, las cepas autóctonas originaron mayor concentración de ácidos grasos, siendo su contenido mayor en la fermentación con *S.b. C6*, seguido de *H.v. 43* y por último la cepa comercial (Figura 5).

Como era de esperar, la cepa no *Saccharomyces* (*H.v. 43*) dio lugar a los mayores niveles de ésteres del ácido acético (Figura 6), destacando especialmente la concentración de acetato de 2-feniletilo, responsable de un marcado aroma floral (rosas).

Sensorialmente, el panel de cata valoró como correctas todas las cervezas elaboradas, detectando diferencias en sus perfiles aromáticos como resultado de las cepas utilizadas. Así, en la cerveza fermentada con *H.v. 43* destacó la presencia de aromas frutales y florales, asociados con ésteres del ácido acético, mientras que en las cervezas elaboradas con las cepas *Saccharomyces* predominó el aroma a lúpulo y malta. Por otro lado, no se detectaron diferencias en la sensación de amargor entre las cervezas, aunque la elaborada con la cepa no *Saccharomyces* resultó mas compleja en boca y con mayor cuerpo.

En resumen, la fermentación de mostos de malta con cepas de levaduras sidreras puede ser interesante en la búsqueda de cervezas más atractivas por sus diferentes cualidades organolépticas frente a las levaduras comerciales. ■