

ELABORACIÓN DE UNA CERVEZA ESTILO SOUR SIN GLUTEN UTILIZANDO BACTERIAS LÁCTICAS PARA SU DEGRADACIÓN

Autores: Andreu Mayor, Alejandro; Avilés Martínez, José Javier; Campos Grijalbo, Amaya; López Menchen, Fernando; Ríos Navarro, Mónica.

Artículo redactado por: Mónica Ríos Navarro

Alumnos de la 53 promoción del Máster en Ciencia y Tecnología Cervecera impartido en la Universidad de Alcalá de Henares en colaboración con la Escuela Superior de Cerveza y Malta (ESCYM).

Este trabajo forma parte del proyecto de Máster tutorizado por la profesora de Teoría de las Transformaciones Cerveceras y Coordinadora Académica, D^a. ANA GARCÍA MARTÍ.

RESUMEN

El objetivo de este estudio es evaluar la degradación del gluten en una cerveza estilo sour, usando la técnica Sour Mash, acidificada con dos géneros distintos de bacterias lácticas, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, seleccionadas en base a estudios previos en masa fermentada de pan de trigo.

El uso de masas agrias fermentadas con bacterias lácticas (BAL) ha tomado gran importancia debido a que existen investigaciones que reportan que durante la fermentación de estas masas las proteínas de gluten sufren una hidrólisis debido a la actividad proteolítica de las BAL, rompiendo los enlaces de los péptidos que provocan la intolerancia al gluten.

La importancia de este trabajo radica en que cada vez aumenta más el número de personas intolerantes al gluten, actualmente la prevalencia de la celiaquía se estima en el 1% de la población, surgiendo la necesidad de buscar alternativas para elaborar productos a base de harinas libres de este alérgeno.

La estrategia marcada en este proyecto para conseguir una cerveza que pueda ser denominada sin gluten o bajo contenido en gluten es combinar harina de malta de cebada con otra harina no alergénica como es el maíz, aplicando la técnica de elaboración de cerveza Sour Mash. En esta técnica se aplican cultivos de bacterias lácticas en maceración a una temperatura entre 35-45°C de uno a tres días hasta la reducción del pH a 3,3 para la acidificación del mosto. Junto con la utilización de adjuntos en la receta se consiguió una cerveza de bajo contenido en gluten.

Palabras clave: bacterias lácticas, gluten, cerveza, sour

ABSTRACT

The focus of this project is to evaluate the gluten degradation using the Sour Mash Technique, acidifying with two genes of lactic bacteria, *Lactobacillus* and *Pediococcus*, selected from previous studies in wheat dough fermentation.

The use of sourdoughs fermented with lactic bacteria (LAB) is becoming more important due to research which reports that during the fermentation of this sourdough the gluten proteins have a hydrolysis due to the proteolytic activity of the LABs, breaking the bonds of peptides that cause celiac disorders.

This project is important because the number of celiac is increasing. Nowadays, it is estimated that 1% of people are celiac, consequently, there is a need to find alternative flour products without this allergen.

The aim of this project is to produce a beer that can be labeled gluten free or low gluten content by combining barley malt with other non-allergenic flour such as maize, by applying the Technique Sour Mash. In this technique cultures of lactic bacteria are added to the mash added at temperature of 35-45°C from one to three days to reach pH 3,3 to acidify the wort. By using adjuncts in the recipe was achieved a low gluten beer.

Keywords: lactic bacteria, gluten, beer, sour.

INTRODUCCIÓN

La combinación de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* para producir la hidrólisis de la gliadina, prolaminas del trigo caracterizadas por una gran proporción de residuos de prolina que hace que estos péptidos tóxicos sean extremadamente resistentes a la proteólisis provocando la enfermedad celíaca, ha sido estudiada por investigadores del Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA) de Argentina en masa fermentada de pan de trigo.

La primera conclusión derivada del estudio [1] es que las enzimas proteolíticas endógenas del trigo se activan a pH bajos (pH óptimo 3,4-4,5). Si a esto se le suma la acción combinada de las BAL para participar en la hidrólisis de la gliadina, se obtuvo que después de 24h de incubación de estas masas con las bacterias mencionadas se hidrolizaron el 60% de los polipéptidos de gliadina como queda reflejado en el siguiente gráfico.

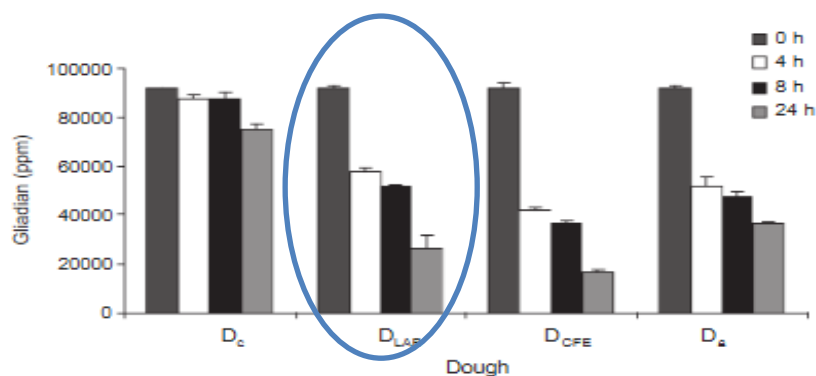


Fig. 2. Gliadins concentration in doughs. Control dough (D_c); chemically acidified dough (D); doughs supplemented with pooled *L. plantarum* CRL 775/*P. pentosaceus* CRL 792 as cell suspension (D_{LAB}) and cell free extract (D_{CFE}).

SOUR MASH

El estilo de cerveza sour es el estilo de cerveza más antiguo del mundo. Antiguamente las cervezas se elaboraban utilizando fermentaciones abiertas las cuales permitían que cualquier bacteria o levadura disponible en el ambiente entrara en contacto con el producto durante su elaboración, lo cual daba como resultado una cerveza con mayor acidez. A lo largo de la historia y según la zona de su elaboración se han ido creando ciertos estilos principalmente diferenciados unos de otros no solo por su estilo de elaboración sino también por los materiales utilizados, siendo Bélgica y Alemania los principales sitios donde se originan estos estilos. Suelen ser cervezas con un aporte de amargor bajo, baja carbonatación y espuma, y con aromas y sabores que recuerdan mucho a cítricos y frutas, incluso algunas con notas que recuerdan a vinos. Algunos estilos recogidos por el Beer Judge Certification Program (BJCP) son: Berliner Weisse, Lambic, Flanders Red Ale, Flanders Brown Ale, Gueuze, Lambic Fruta y Gose.

Las cervezas Sour en los últimos años han estado teniendo un auge a nivel mundial. En España también es un estilo que gana terreno y en los últimos cinco años ha pasado de producir solamente tres cervezas a más de 100 en lo que va de este año.

Para obtener una cerveza Sour, existen múltiples técnicas para poder alcanzar la acidez deseada. Dependiendo de las instalaciones disponibles y del estilo de cerveza Sour que se busca existen métodos de conseguir la acidez en el mosto, en la fermentación o en la guarda. Sour Mash es la técnica que permite conseguir esta acidez en el mosto y es la que se ha empleado en nuestro proyecto evaluando a su vez la degradación de las prolaminas de la cebada (hordeínas) por las bacterias lácticas para obtener una cerveza sin gluten o con bajo contenido en gluten.

BACTERIAS LÁCTICAS EN CERVEZA

Las bacterias del ácido láctico (BAL) constituyen un grupo diverso de microorganismos que han sido utilizados a lo largo de la historia humana como agentes fermentativos en la preparación de alimentos y conservación. Contribuyen a la mejora organoléptica y nutricional de productos fermentados, así como a la inhibición de microorganismos de descomposición. El ácido láctico es un acidulante versátil, potenciador del sabor y conservante de los alimentos en la industria,

y en el sector cervecero la creciente popularidad del ácido en cervezas de elaboración artesanal requiere un conocimiento más profundo sobre las bacterias.

Algunos de los efectos positivos de elaborar una cerveza con BAL son:

-Formación de ácido láctico: el ácido láctico es el ácido orgánico cuantitativamente más importante producido por las BAL. Es utilizado como acidulante de pH o inhibidor de esporas de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados.

-Formación de sabores y olores por BAL: compuestos activos de olor y sabor son liberados por las BAL como compuestos intermedios durante la fermentación que se canalizan en diferentes vías metabólicas que finalmente conducen a compuestos organolépticos activos específicos. El piruvato es el compuesto intermedio y es el punto de partida para reacciones posteriores. Metabolitos comunes de sabor activo de las BAL son el ácido láctico y acético, diacetilo, acetoína y acetaldehído.

-Producción de bacteriocinas: las bacteriocinas son componentes proteínicos antibacterianos producidos por las BAL comúnmente presente en alimentos. Son un preservante natural y satisface la demanda de los consumidores de tener alimentos higiénicamente seguros.

- Fermentaciones rápidas en cerveza (alta atenuación): debido a la actividad extracelular amilolítica de algunas BAL que son capaces de disponer de las dextrinas y/o almidón, incluyendo entre ellas el *Lactobacillus plantarum* utilizado en el presente estudio [2].

-La acción de la lipoxigenasa se reduce a medida que el pH disminuye, lo que conduce a una menor descomposición de los ácidos grasos insaturados y finalmente una mayor estabilidad del sabor de la cerveza.

MATERIAS PRIMAS Y COADYUVANTES

Para la elaboración de la cerveza se emplearon tres tipos de maltas: Pilsen, Munich y Tostada (sólo para aporte de color) y maíz como adjunto cervecero que es un cereal libre de gluten. Los lúpulos seleccionados fueron las variedades Citra y Motueka todos ellos en formato pellet 90. La levadura seleccionada fue la cepa Lager Safale 04 de Fermentis, debido a que el flavor que caracteriza esta levadura es neutral y por tanto se puede realzar el sabor y aroma que proporciona la maceración ácida.

Tabla 1. Cantidades de Malta / Maíz

	Extracto (%)	Materia Prima (%)	Cantidad extracto (kg)	Cantidad materia prima (kg)
Malta Pilsen	82.5	40	5.48	6.65
Malta Munich	80.3	10	1.37	1.71
Malta Tostada	-	-	0.00	0.09
Maíz	80.5	50	6.85	8.51

Tabla 2. Cantidades lúpulos

Lúpulos	Cantidad (g)	α-ácidos %
Citra (Inicio ebullición)	20	12.4
Citra (Final ebullición)	10	12.4
Motueka (Final ebullición)	10	7

Por otro lado, también se utilizaron las siguientes sales y enzimas exógenas:

- Ácido fosfórico (H_3PO_4)
- Cloruro cálcico ($CaCl_2$)
- Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$)
- Bicarbonato sódico ($NaHCO_3$)
- β-glucanasa
- α-amilasa (Alfalisin)
- Amilo-glucosidasa (Amigase)

Para la acidificación del mosto en maceración y degradación de gluten se utilizaron las cepas de bacterias lácticas *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*.

PROCESO DE PRODUCCIÓN

La elaboración de la cerveza se llevó a cabo en las instalaciones de la Asociación Española de Técnicos de Cerveza y Malta (AETCM), situadas en el Parque Tecnológico de la Universidad de Alcalá.

Molienda

La molienda de la malta fue realizada mediante un molino de martillos empleando un tamiz de 2 mm para obtener una molienda lo más fina posible con el fin de facilitar la actividad enzimática.

Maceración ácida

La maceración se realizó mediante el método de infusión escalonada.

El agua de empaste se hirvió el día anterior para liberar cloro y oxígeno. El volumen fue de 26 litros teniendo en cuenta que la ratio de agua-malta fue 3:1. Antes de empezar se subió la temperatura del agua a 40°C y durante 10 minutos se realizó el empaste de la malta con una velocidad rápida del agitador. En este punto se procedió a ajustar el pH a 5,43 añadiendo 15,98 g de H₃PO₄. Para favorecer la degradación de β-glucanos se adicionó 1 ml de β-glucanasa y para asegurar la actividad de las enzimas se añadió 5,07 g de CaCl₂.

Una vez pasado este tiempo se subió la temperatura a razón de 1,25 grados/minuto hasta alcanzar los 50°C, realizando un estacionamiento proteolítico de 50 minutos para facilitar el trabajo posterior de las bacterias para la degradación del gluten. A continuación, se subió a 62°C con la misma rampa y se realizó un estacionamiento amilolítico durante 30 minutos bajando a la mitad la velocidad del agitador. Pasado este tiempo se calentó hasta los 72°C para realizar la sacarificación durante 15 minutos. A los 5 minutos del estacionamiento se produjo la sacarificación. Por último, se subió a 78°C para inactivar enzimas y reducir la viscosidad.

Una vez terminada la maceración se enfrió el mosto hasta 40°C usando un baño maría. Con el mosto a 40°C se inocularon las bacterias (*L. plantarum* y *P. pentosaceus*) y rápidamente se selló la caldera para evitar el contacto con el oxígeno. El agitador se puso en marcha a velocidad lenta para homogeneizar la masa y la temperatura se programó para mantenerse a 40°C un tiempo infinito. La maceración ácida permaneció en estas condiciones durante 3 días. El proceso queda representado en la **Figura 1**.

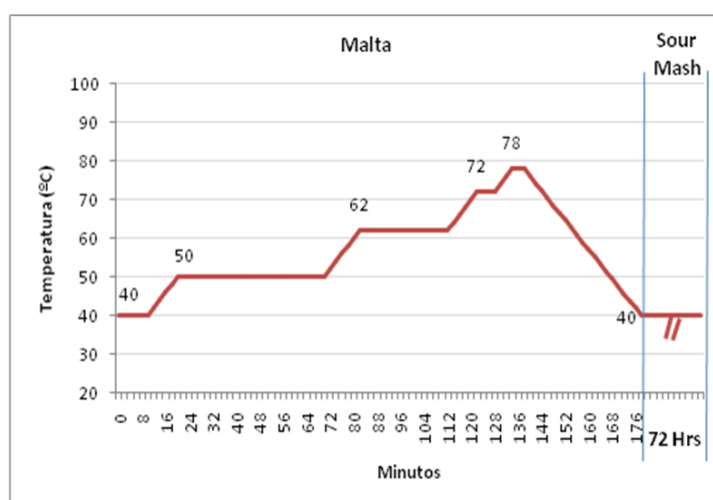


Figura 1. Curva de maceración malta

En la **Tabla 3** se muestran los datos de pH y gluten durante la maceración ácida.

Tabla 3. Evolución pH y gluten maceración ácida

Parámetro	0 h	18 h	44 h	66 h
pH	5.43	3.53	3.39	3.37
Gluten, ppm*	-	14400	6372	3930

*Método Elisa Competitivo (Universidad del País Vasco)

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus* disminuyeron el pH inicial 1,9 puntos a las 18h de la maceración ácida para conseguir una masa agria al final de los tres días con pH 3,37.

Los resultados de la UPV por Elisa competitivo demuestran que sí hay una reducción de gluten entre los diferentes días de actuación de las BAL (**Figura 2**), del primer al segundo día hay una reducción del 56% de gluten y al tercer día se ha conseguido un 73%. Y se debe tener en cuenta que la degradación total es superior al 73% ya que no se dispone del dato de gluten del mosto inicial antes de la inoculación.

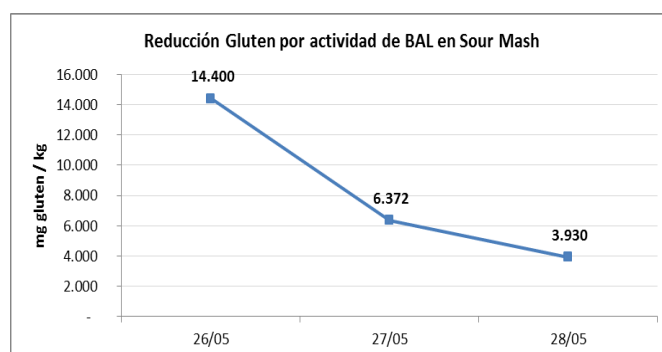


Figura 2. Reducción de gluten por las BAL

Molienda del maíz

El grits de maíz se molió para obtener un mayor beneficio en la caldera de crudos. Después de limpiar bien el molino se procedió a moler una cantidad a fondo perdido para asegurar que no quedaran restos de gluten en la instalación. Se usó el molino de martillos con un tamiz de 1 mm.

Maceración del maíz

La maceración se realizó mediante el método de infusión escalonada.

El agua de empaste se hirvió el día anterior para liberar cloro y oxígeno. El volumen fue de 40 litros teniendo en cuenta que la ratio de agua-maíz fue 5:1.

Se subió la temperatura del agua a 45°C y se estacionó durante 10 minutos. En este estacionamiento se realizó el empaste del grits de maíz con una velocidad rápida del agitador

para favorecer la hidratación. Se inició con un pH de 6,2, óptimo para la enzima Alfalisin (5,5 a 6,5) y se ajustó la concentración de iones calcio con 4,84 g de CaCl_2 .

Se adicionó 16,13 g de Alfalisin para favorecer la licuefacción. Seguidamente se subió de temperatura a razón de 1,67 grados/minuto hasta alcanzar los 70°C realizando un estacionamiento de gelatinización de 20 minutos. Por último, se subió con rampa 1,32 grados/minuto a 95°C para llevarlo a ebullición durante 15 minutos. El proceso queda representado en la **Figura 3**.

Una vez terminado el proceso de crudos se bajó la temperatura con baño maría hasta los 50°C. Se ajustó el pH a 5 con 16 ml de H_3PO_4 , óptimo de la enzima Amigase de la cual se añadieron 188,37 g, y también se adicionó 2,68 g de CaCl_2 . Se inició la maceración a 55°C con un reposo de 80 minutos para favorecer la actuación de la enzima Amigase. Pasado este tiempo se calentó hasta los 72°C para realizar la sacarificación adicionando 8 g de enzima Alfalisin. La prueba de sacarificación confirmó la degradación del almidón a los 60 minutos. El proceso queda representado en la **Figura 4**.

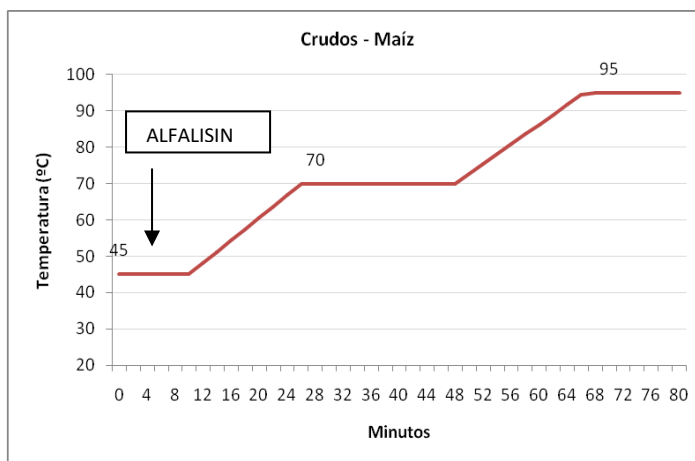


Figura 3. Curva de crudos del maíz

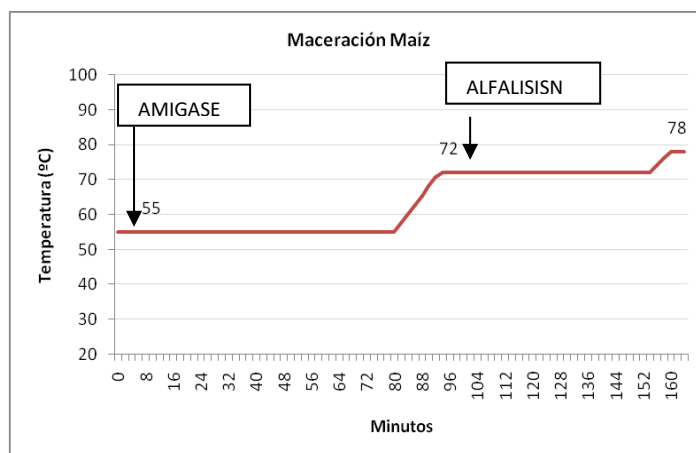


Figura 4. Curva de maceración del maíz

Blending

La transferencia del mosto de la maceración ácida desde la caldera de crudos hasta la caldera de maceración del grits de maíz se realizó por gravedad mediante la válvula inferior de la caldera de crudos. La temperatura de la mezcla fue de 57°C y se subió a 78°C para el “mash out”. El proceso queda representado en la **Figura 5**.

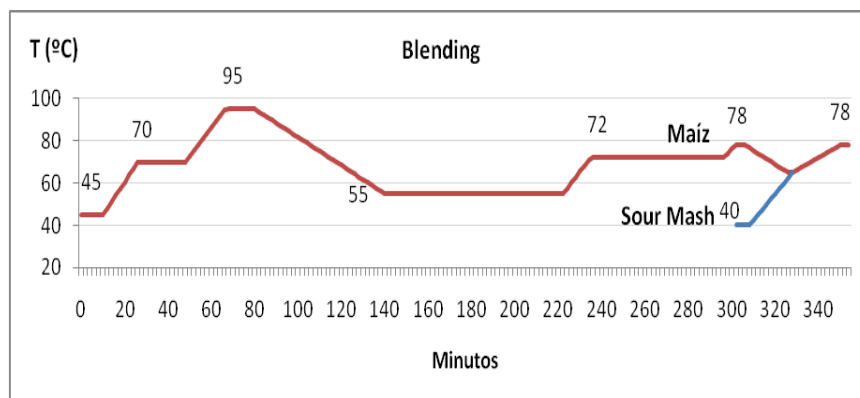


Figura 5. Blending mosto ácido y maíz

Filtración

La filtración del mosto se realizó mediante un filtro prensa de una sola cámara que previamente se calentó con agua a 80°C para favorecer la elasticidad de las membranas y conseguir un mayor rendimiento.

El tiempo de llenado del filtro fue de 3 minutos y 40 segundos y el tiempo total de filtración fueron 43 minutos. Se obtuvo un primer mosto a 17,4°P y pH de 3,52. El volumen total del agua de lavado fue 40 litros a 80°C. El extracto del mosto final fue 14,7°P y pH de 3,5. Como el mosto se tamponó se adicionaron 80 g de NaHCO₃ para subir el pH hasta 4,2 antes de ir a ebullición.

Ebullición y Whirlpool

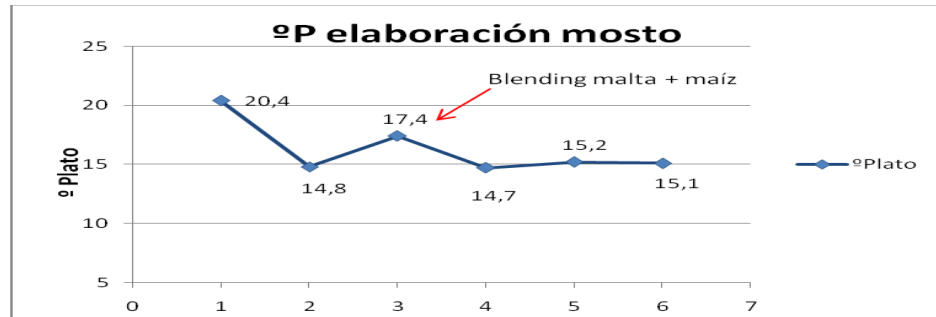
Una vez filtrado el mosto, se envió de nuevo a la olla de maceración, que hace a su vez de olla de ebullición.

El mosto filtrado se llevó a ebullición durante 60 minutos partiendo de extracto inicial de 14,7°P hasta alcanzar un extracto final del mosto de 15,2°P. Se efectuaron dos dosificaciones de lúpulo, la primera de Citra al inicio de la ebullición para conseguir amargor y la segunda adición fue de Motueka y Citra a los 20 minutos del final para buscar sabor y aroma. Se adicionó la misma cantidad de ambos lúpulos, los cuales se caracterizan por sus distintivos tonos cítricos y notas de frutas tropicales. Al final de la ebullición se alcanzó una tasa de evaporación del 8,5%.

Una vez terminada la ebullición el mosto fue transferido al tanque de Whirlpool a la entrada tangencial al tanque. Se adicionó 0,014 g ZnSO₄ y 8 g de CaCl₂. El tiempo de reposo fue de 15

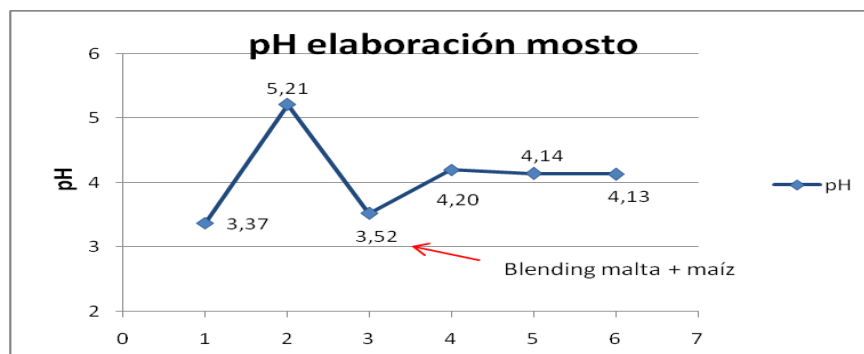
minutos para asegurar la formación de un buen trub caliente y así poder garantizar la estabilidad coloidal de la cerveza.

La **Figura 6 y 7** muestran la evolución de °Plato y pH de todo el proceso de la sala de cocción.



1. mosto maceración malta 2. mosto maíz 3. Blending malta+maíz 4. Inicio ebullición 5. Final ebullición. 6. Mosto frío

Figura 6. Evolución °Plato sala cocción



1. mosto maceración malta 2. mosto maíz 3. Blending malta+maíz 4. Inicio ebullición 5. Final ebullición. 6. Mosto frío

Figura 7. Evolución pH sala cocción

Enfriamiento, fermentación y guarda

La transferencia del mosto hacía el tanque de fermentación pasó por el enfriador de placas enfriándolo a 18°C y con una aireación de 8 ppm para facilitar el arranque de la fermentación.

Una vez lleno el tanque de fermentación se procedió a sembrar 28 g de la levadura Safale S-04. Antes de las 24 horas se evidenció el arranque de la fermentación y la temperatura se ajustó a 19°C durante 3 días hasta alcanzar un extracto aparente de 3,0°P. Se bajó la temperatura en 26 horas hasta los 4°C, en este punto se realizó una purga de 1,5 litros de levadura y seguidamente se bajó en 40 horas hasta la temperatura de guarda de 0°C. La guarda fue de 3 días a 0°C para que la cerveza se estabilizase coloidal y organolépticamente. Gracias a la alta floculación de la levadura y la clarificación en guarda, se optó por dejar la cerveza tal cual y no filtrarla.

A continuación, se muestra una gráfica (**Figura 8**) con la evolución de pH, °P y temperatura durante la fermentación y la guarda.

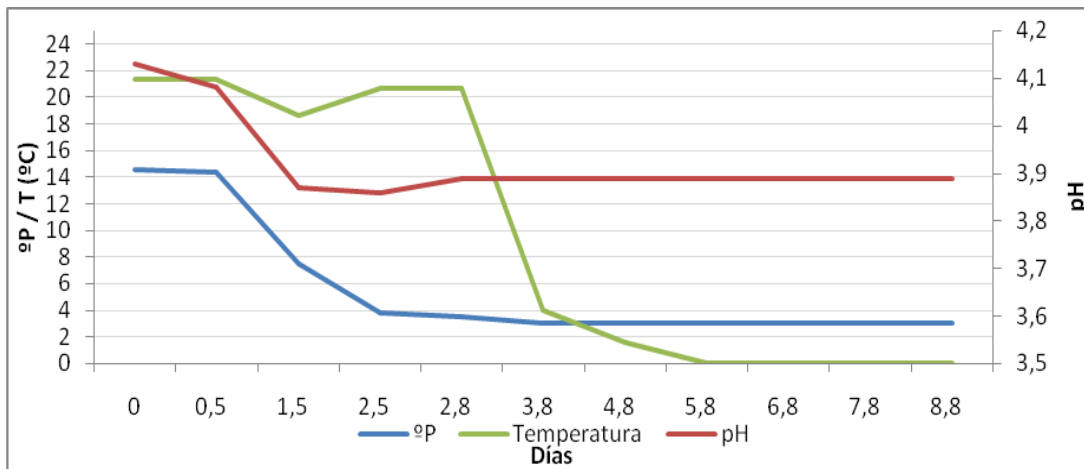


Figura 8. Evolución pH, °P y Temperatura fermentación y guarda

Carbonatación y Envasado

Terminada la guarda, la cerveza se envió directamente al tanque BBT sin filtrar, realizando una carbonatación previa en línea. Desde el BBT se realizó el envasado en botellas de 33 cl mediante una llenadora neumática con una única cánula. El cerrado de las botellas se realizó con una cerradora manual y tapón corona de 26 mm. Posteriormente se realizó el etiquetado también de manera manual.

El diseño del etiquetado sobre vinilo se hizo conforme a la legislación española vigente (véanse **Figura 9** y **Figura 10**).



Figura 9. Diseño de la etiqueta



Figura 10. Diseño de la contraetiqueta

Debido a que se trata de un producto de bajo contenido en gluten, con una concentración de gluten comprendida entre 20 mg/l y 100 mg/l, además, se utilizó el símbolo de la “Espiga Barrada” regulado por la asociación de celíacos europeos, AO ECS, con un 100 debajo del mismo (aunque sin número de licencia) para indicar que se trata de un producto con bajo contenido en gluten.

Cerveza embotellada

Los parámetros medidos en la cerveza final envasada se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros en cerveza final

Parámetro	Valor
Extracto original (°P)	14.68
Extracto aparente (°P)	3.02
Alcohol (%v/v)	6.31
Atenuación aparente (%)	79
Ph	3.89
Color (EBC)	13
Amargor (IBU)	6,9
Polifenoles totales (mg/l)	111
Diacetilo total (ppb)	310
TAF (EBC)	20
SO ₂ (mg/l)	0,26
CO ₂ (g/l)	3.5

Espuma Nibem (s)	160
Gluten (ppm)	43,6

El valor de extracto original (14.68°P) está dentro del rango para que la cerveza sea categorizada como cerveza “Especial” según el RD 678/2016 y como producto “muy bajo en gluten” según el RD 828/2014.

Nota de cata

Es una cerveza con grado alcohólico de 6,3 % v/v, poco amarga de baja carbonatación y espuma, al igual que la mayoría de los estilos comerciales de cerveza SOUR. Tiene una nota ácida agradable, cítrica y destaca su aroma a acetato de isoamilo (banana) y acetaldehído (manzana verde). Es refrescante y con cuerpo.

CONCLUSIONES

Como conclusión podemos decir que se ha conseguido el objetivo principal del proyecto, el cual era elaborar una cerveza con bajo contenido en gluten única en su categoría. El porcentaje total de hordeínas degradado durante la maceración ácida ha sido de superior al 73%, confirmando la capacidad de las BAL en la degradación del gluten.

Además, los resultados de los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales nos muestran que la cerveza elaborada también se ajusta perfectamente a las pretensiones que planteamos como objetivos también del proyecto. Se ha conseguido una cerveza estilo Sour Ale aplicando la técnica de elaboración Sour Mash con unas características organolépticas notables. La acidez que aporta el ácido láctico de las bacterias empleadas con el balance de dulzor que aporta el extracto de la malta y el maíz le confieren un sabor muy agradable.

Refiriéndonos al ámbito microbiológico, todas las mediciones mostraron que en ningún momento hubo presencia de contaminación microbiana en la cerveza terminada, ni como resultado de la utilización de bacterias en el proceso de elaboración.

Con todo ello, podemos sugerir en futuras investigaciones que para conseguir una cerveza sin gluten basándose en el método utilizado en este proyecto se podría apuntar a un Extracto Original menor facilitando una mayor dilución de la cantidad de gluten en cerveza final. Y además considerar el empleo de maíz pregelatinizado para la reducción del tiempo en la sala cocción.

AGRADECIMIENTOS

Al personal docente de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá de Henares y de la Escuela Superior de Cerveza y Malta, en especial a Virginia Rojano, Elena Roche y Marta García

por su soporte y orientación en la realización de este proyecto, y a **los miembros de la Fundación Benéfico Docente de la Escuela Superior de Cerveza y Malta**.

A la **Universidad del País Vasco** por su colaboración en los ensayos de gluten, en especial a la Dra. Edurne Simón Magro, profesora titular de Nutrición y Bromatología.

Al equipo de la **Planta Piloto de la Asociación Española de Técnicos de Cerveza y Malta** por su colaboración en el desarrollo del presente proyecto, en especial a Esther Santalla y Ana García Martí.

A las **empresas colaboradoras del Máster**: Universidad de Alcalá de Henares, Universidad del País Vasco, Grupo Mahou-San Miguel, Heineken España S.A., DAMM S.A., DACSA S.A., Intermalta S.A., Cargill S.L.U., por impartir los seminarios y, en especial, a las empresas que nos han suministrado los materiales necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A **todos los compañeros** de esta promoción por los conocimientos compartidos, su colaboración y los buenos momentos que hemos pasado juntos en el transcurso de este Máster.

REFERENCIAS

[1] Gerez, C. L., Dallagnol, A., Rollán, G., Font de Valdez, G. A combination of two lactic acid bacteria improves the hydrolysis of gliadin during wheat dough fermentation. Food Microbiology. 2012; volume 32 issue 2: 427-430.

[2] Peyer, Lorenzo. Lactic acid bacteria fermentation of wort as a tool to add functionality in malting, brewing and novel beverages. PhD Thesis University College Cork. 2017.