

EL USO DE BACTERIAS EN CERVECERÍA Y SU POTENCIAL PARA ELABORAR CERVEZAS ÁCIDAS

Autor: Joan Montasell, Dipl. Brew Technical Sales Manager – Spain Lallemand Brewing

Las cervezas ácidas (o *sours beers* en inglés) son cada vez más populares entre los consumidores. Debido al creciente interés, la producción de este tipo de cervezas requiere de técnicas y métodos para conseguir que su elaboración sea lo más cómoda y controlada posible. Una solución rápida y efectiva sería mediante el uso de cultivos puros de bacterias del ácido láctico en formato seco, sin necesidad de propagar ni mantener dichos cultivos.

En el presente artículo repasaremos los principales métodos de acidificación existentes (tradicionales y modernos), además de los microorganismos responsables y los exitosos resultados obtenidos utilizando una cepa liofilizada de *Lactobacillus plantarum*, entre otras.

La cerveza es un producto que existe desde hace miles de años la cual, durante la mayoría de éstos, se ha elaborado con cultivos mixtos, no solo basados en levadura cervecera, sino también en distintos microorganismos, aunque ese fue un detalle desconocido por los mismos que la producían.

El perfil ácido es una característica muy presente y típica en la historia de la cerveza. Sin embargo, la incorporación del lúpulo como ingrediente cervecero en los últimos 500 o 600 años, ha aportado un papel muy relevante en el perfil organoléptico de la cerveza hasta el día de hoy. La influencia más destacada es el aumento del sabor amargo y la disminución del sabor ácido, debido principalmente a las propiedades bactericidas del lúpulo, que inhiben el crecimiento de algunas bacterias productoras de ácido.

Las investigaciones pioneras de científicos como Louis Pasteur y Emil Christian Hansen aportaron novedosas técnicas para la obtención de cultivos puros de levaduras a partir del aislamiento y purificación de una cepa concreta. Además de los descubrimientos mencionados, se produjeron avances tecnológicos muy importantes durante la mitad y final del siglo XIX, que permitieron obtener cervezas más homogéneas obtenidas a partir del uso de cultivos puros, promoviendo así la proliferación y expansión de las cervezas tipo *lager*, hasta llegar a ser el estilo más producido del mundo, representando más del 90% de la producción mundial de cerveza.

A pesar de que dicho estilo fue el más popular, hubo muchos otros menos conocidos, pero que perduraron a lo largo de los años en el viejo continente. Este es el caso de las cervezas ácidas, que, a pesar de tener un fuerte resurgimiento en la actualidad, no son de hecho ninguna novedad, como también ha sucedido con muchos otros estilos no ácidos.

Dentro de las cervezas ácidas encontramos algunos estilos originarios de Bélgica como son las *Lambic* o *Flanders Red Ale* entre otros, mientras que en Alemania hay las *Berliner Weisse* o las *Gose*.

El resurgimiento de las cervezas ácidas surge en gran parte gracias a la revolución cervecera *craft* procedente de los Estados Unidos a partir de los años 90. Además, la importación de cervezas ácidas de origen belgas, como son las *Lambic*, permite alinear dicha tendencia con el gusto de los consumidores y del mismo modo influenciar también a los productores.

Una muestra de la tendencia ascendente de las cervezas ácidas es su incorporación como estilo propio en el *Great American Beer Festival* (GABF) en el año 2002, donde se presentaron pocas referencias, pero a lo largo de los años ganó popularidad y las inscripciones para este estilo incrementaron hasta los varios centenares. Otro ejemplo más cercano, es el Congreso ACCE (Asociación Cerveceros Caseros de España), celebrado en Burgos durante marzo del 2017, donde el estilo sugerido para el concurso fue también el mismo, dentro de la categoría *European Sour Ale and American Wild Ale*, de la reconocida BJCP (*Beer Judge Certificate Program*).

La diversidad de cervezas ácidas, aromas y creatividad hacen que el fenómeno sea no solo local, sino más bien global, dando lugar a una fusión de los estilos más tradicionales con las técnicas más modernas de elaboración.

Microorganismos responsables

Lactobacillus spp.

Los lactobacilos (también conocidos como “lacto”) son un tipo de bacteria del ácido láctico (LAB, del inglés *Lactic Acid Bacteria*), Gram-positivas y de forma alargada (bacilo), que se caracterizan principalmente por producir ácido láctico, entre otros metabolitos secundarios.

Su principal característica es la rápida producción ácido láctico bajo ciertas condiciones óptimas, aportando una acidez suave, cítrica, agradable y refrescante. La temperatura es un parámetro crítico para su desarrollo, siendo el rango óptimo entre 30°C y 49°C, dependiendo de la cepa.

La actividad de muchos lactobacilos queda inhibida por la presencia de compuestos amargos (principalmente iso- α -ácidos), haciendo que no se reproduzcan en mostos o cervezas que contengan lúpulo. Sin embargo, algunas cepas pueden desarrollar resistencias mediante el proceso de conjugación bacteriana. Dicho proceso se basa en la transferencia de material genético entre una bacteria donadora y una receptora mediante el contacto directo o una conexión que las una.

En la Tabla 1 se muestra la relación de los distintos tipos de lactobacilos y la clasificación en función de su metabolismo, ya sea homofermentativo o heterofermentativo.

<u>Tabla 1 . Clasificación de los lactobacilos según su metabolismo</u>		
Homofermentativos	Heterofermentativos facultativos	Heterofermentativos obligados
L. acidophilus	L. casei	L. brevis
L. delbrueckii	L. curvatus	L. bunchneri
		L.
L. helveticus	L. plantarum	L. fermentum reuteri
L. salivarius	L. sakei	L. pontis

A continuación se define los distintos metabolismos comentados:

- Homofermentativos: Aquellos que solo son capaces de producir ácido láctico
- Heterofermentativos facultativos: En presencia de carbohidratos generan solo ácido láctico, pero si estos escasean el metabolismo pasa a ser heterofermentativo produciendo ácido láctico, CO₂ y etanol (ácido acético si hay O₂)

- Heterofermentativos obligados: Aquellos que producen ácido láctico, CO₂ y etanol (ídem)

El ácido láctico es el compuesto principal de los estilos *Berliner Weisse* y *Gose*. De todos modos, se encuentra también muy presente en el resto de los estilos comentados, compartiendo protagonismo con otros ácidos orgánicos.

Pediococcus spp.

Los *Pediococcus* (también conocidos como “pedio”) son otro tipo de bacterias del ácido láctico. Gram-positivas y de forma redondeada, también se caracterizan por producir ácido láctico.

Aunque tienen una actividad más lenta que los lactobacilos, toleran pH más bajos y producen una acidez más “agresiva” y notoria. Algunas cepas son capaces de producir diacetilo a distintas concentraciones, y son las responsables también de la llamada “*sick phase*” (fase enfermiza), “*sick beer*” (cerveza enferma), o conocida también como “*ropiness*” (viscosidad). Éste último efecto es debido a la presencia de exopolisacáridos producidos por el propio pediococo, generando una viscosidad extrema en la cerveza que puede llegar a ser muy desagradable para el consumidor final.

En general, la temperatura óptima de crecimiento de los “pedio” oscila entre los 20 y 25°C (pH=5,5). Son más termosensibles que los lactobacilos, por lo que a partir de los 35°C ya no se desarrollan. A diferencia de los anteriores, son tolerantes a los compuestos amargos del lúpulo.

Brettanomyces spp.

Los *Brettanomyces* (también conocidos como “bret”) son levaduras salvajes cuyo nombre proviene del griego “hongo británico”, ya que se aisló por primera vez en cervezas tipo ale del Reino Unido en el siglo XVII.

A diferencia de las cepas cerveceras convencionales, estas se caracterizan principalmente por su alta capacidad atenuante, además del amplio rango de compuestos aromáticos que producen. Entre estos, se conoce habitualmente en enología por generar el 4-etilfenol (olor a corral/establo, detectable a partir de 140ppb) y 4-etilguaiacol (olor a clavo/especias, detectable a partir de 600ppb), los cuales se consideran importantes defectos en la industria enológica.

A parte de las sustancias mencionadas, también es capaz de producir ácido acético (en presencia de O₂), y un amplio rango de compuestos esterificados mencionados en Tabla 2.

Tabla 2. Principales ésteres generados por <i>Brettanomyces</i> spp.		
PRECURSORES (ácido + alcohol)	COMPUESTO	AROMA
Ácido acético (vinagre) + Etanol	Acetato de etilo	Afrutado, disolvente
Ácido butírico (pútrido) + Etanol	Butirato de etilo	Mango, piña, fruta tropical
Ácido caproico + Etanol	Caproato de etilo	Afrutado, piña, anisado
Etanol + ác. caprílico (autolizado)	Caprilato de etilo	Coñac, setas, pera, floral
Ácido cáprico (Cera) + Etanol	Caprato de etilo	Brandy, uvas, floral
Ácido isovalérico (Queso) + Etanol	Isovalerato de etilo	Bayas maduras
Ácido láctico (logurt) + Etanol	Lactato de etilo	Afrutado, mantecoso
Ácido valérico (Queso) + Etanol	Valerato de etilo	Manzana verde, piña, bayas
Ácido acético + Alcohol de isoamilo	Acetato de isoamilo	Plátano (<i>Hefe-weissen</i>)
Ácido acético + Alcohol fenilético	Acetato de feniletilo	Miel, rosas

Como se puede observar, los precursores de los ésteres (ácido orgánico + alcohol) se caracterizan por tener un olor desagradable (vinagre, queso rancio, vómito, etc...) Al reaccionar con el alcohol (reacción de esterificación), estos compuestos se convierten en sustancias aromáticas más agradables afrutadas y florales. Por ejemplo, *Brettanomyces bruxellensis* tiende a producir aromas que recuerdan a tierra o madera, mientras que *Brettanomyces claussenii* produce ésteres afrutados, como el aroma a piña.

Principales orígenes de las bacterias del ácido láctico (BAL)

Existen diferentes fuentes de cepas bacterianas ideales para la producción de cervezas ácidas. Entre las más comunes hay:

Laboratorio – Las cepas disponibles a nivel comercial son una opción cada vez es más popular, ya sean cultivo puro o bien cultivo mixto.

Residuo en botellas – Las cervezas ácidas refermentadas en botella y que no han sido filtradas ni pasteurizadas, contienen microorganismos que se pueden aislar y reproducir (dependiendo de su estado fisiológico).

Naturaleza – Exponer el mosto, o la propia cerveza, a ambientes donde existan bacterias y levaduras salvajes que puedan desarrollar su actividad. Esta es una técnica tradicional ampliamente empleada en Bélgica.

Yogur – Los productos lácteos fermentados mediante el uso de lactobacilos, pueden ser utilizados para promover la acidificación del mosto o la cerveza. De todos modos, hay que tener en cuenta que éstos contienen grasas y lactosa.

Maltas – Los lactobacilos están presentes en la cáscara de la malta, por lo que infusionar un saco de malta molida en un mosto con las condiciones necesarias, puede promover la proliferación de las bacterias presentes para acidificarlo.

Pruebas I+D en Lallemand

Introducción

Las cervezas ácidas están ganando popularidad en el sector cervecero artesanal, y los productores buscan un método fácil pero consistente para elaborar este tipo de cervezas sin necesidad de propagar y mantener cultivos bacterianos en las mismas instalaciones. El uso de cultivos puros de lactobacilo en formato seco, y listos para ser inoculados, serian una solución para satisfacer las demandas de los cerveceros. El objetivo es alcanzar un valor de $\text{pH} \leq 3,4$ en el mosto en menos de 48 horas con una alta concentración de ácido láctico y la menor presencia de ácido acético posible.

Materiales y Métodos

Cepas

En el presente estudio se analizaron 6 cepas de lactobacilos:

L. plantarum (cepa A)

L. plantarum (cepa B)

L. delbrueckii (cepa A)

L. delbrueckii (cepa B)

L. helveticus

L. brevis

L. acidophilus

Fermentación

La temperatura de los mostos se ajustó a 4 temperaturas distintas (20°C, 30°C, 40°C y 50°C) en erlenmeyers de 500ml. El mosto a 12° Plato se obtuvo a partir de un extracto de malta, sin lúpulo añadido y se introdujo dentro de los erlenmeyers previamente esterilizados. Las bacterias en formato seco se hidrataron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se inocularon a razón de 1g/hl, excepto la cepa *L. plantarum* (cepa A) la cual se inoculó a razón de 10g/hl.

La densidad del mosto y los valores de pH se midieron a lo largo de la fermentación. Al final de la fermentación láctica, se obtuvieron muestras para analizar la concentración de ácido láctico y acético por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con una columna Jolie Waters Ic-Pak Ion-exclusion 50A 7um 7.8x150mm.

Resultados

Ambas cepas de *Lactobacillus plantarum* mostraron su mayor actividad a 20°C y 30°C, observando una rápida bajada del pH, consiguiendo el valor mínimo en 3 días de fermentación. A 30°C y a 40°C todas las cepas alcanzaron un pH=3,5 en tan solo 2 días, a excepción de la cepa *L. brevis* (30°C y 40°C) y *L. delbrueckii* (30°C). Las cepas *L. helveticus* y *L. acidophilus* mostraron su mayor actividad a 40°C y continuaron parte de su actividad a 50°C, mientras que el resto de las cepas se mostraron inactivas a dicha temperatura (Figuras 1 – 4).

Los resultados por HPLC indicaron que las concentraciones más altas de ácido láctico se obtuvieron a 40°C por parte de *L. helveticus* y seguido por *L. acidophilus*. A 30°C todas las cepas produjeron concentraciones similares de ácido láctico, y *L. brevis* resultó ser la cepa más sensible a las altas temperaturas, ya que la concentración más elevada se logró a tan solo los 20°C. La concentración más alta de ácido acético se produjo a 20°C, y en general se redujo a mayor temperatura.

A nivel sensorial, un panel de cata determinó el perfil sensorial de las muestras que se sacaron tras el tercer día de fermentación. Se observó que los mostos en los que se inocularon *L. helveticus* y *L. acidophilus* presentaban un sabor y aroma a ácido bastante intenso, mientras que el mosto acidificado con *L. delbrueckii* produjo notas aromáticas ligeramente afrutadas.

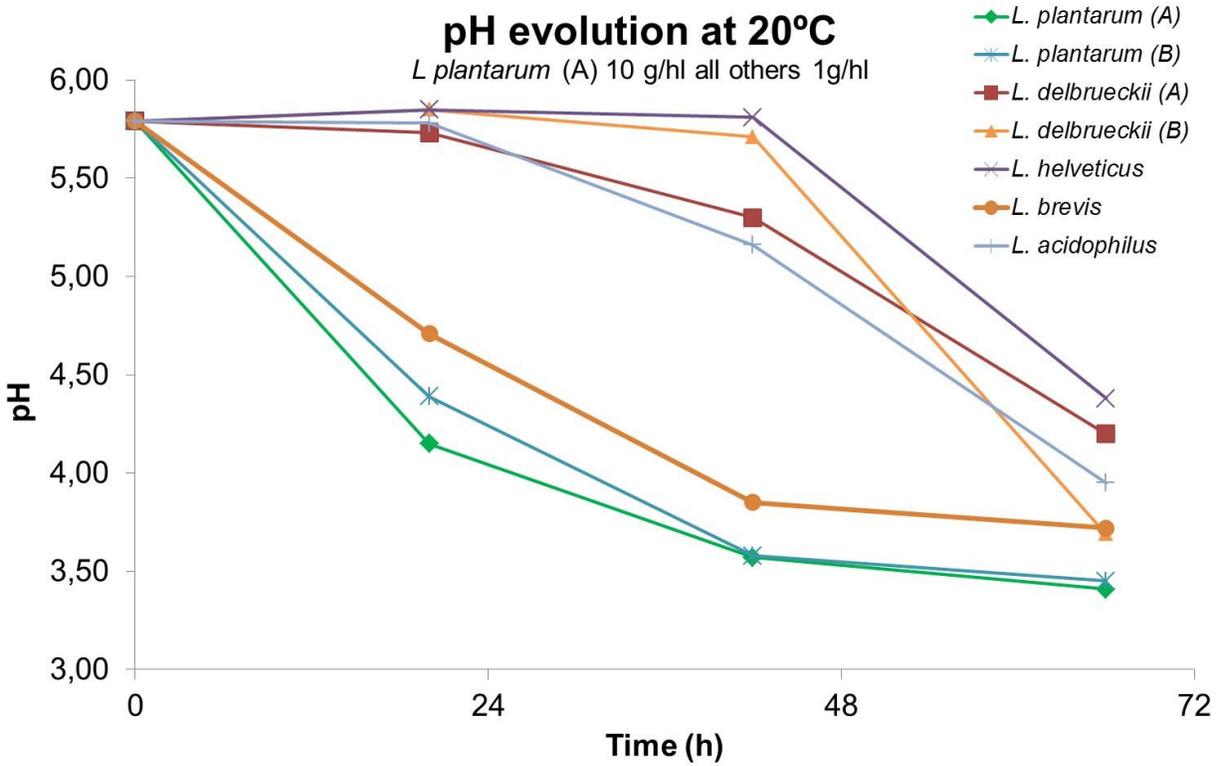


Figura 2 - . Evolución del pH en un mosto de 12° Plato (30°C)

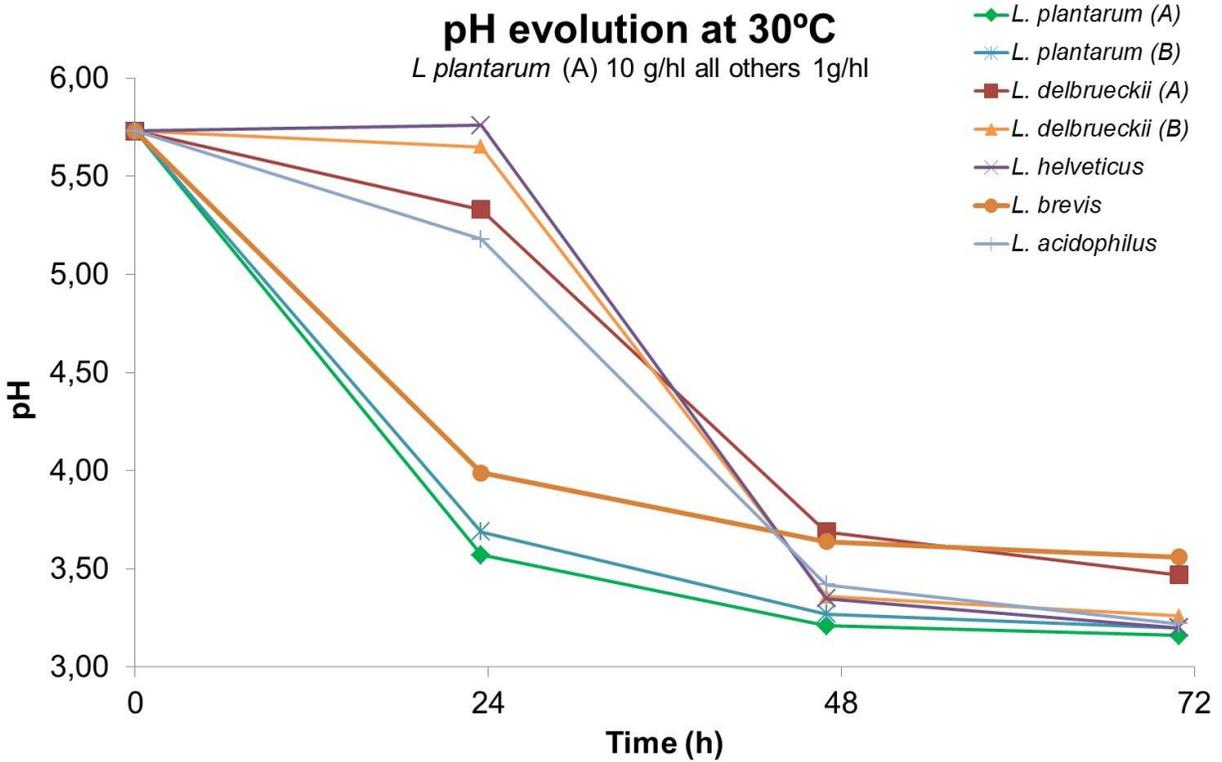


Figura 3 - Evolución del pH en un mosto de 12° Plato (40°C)

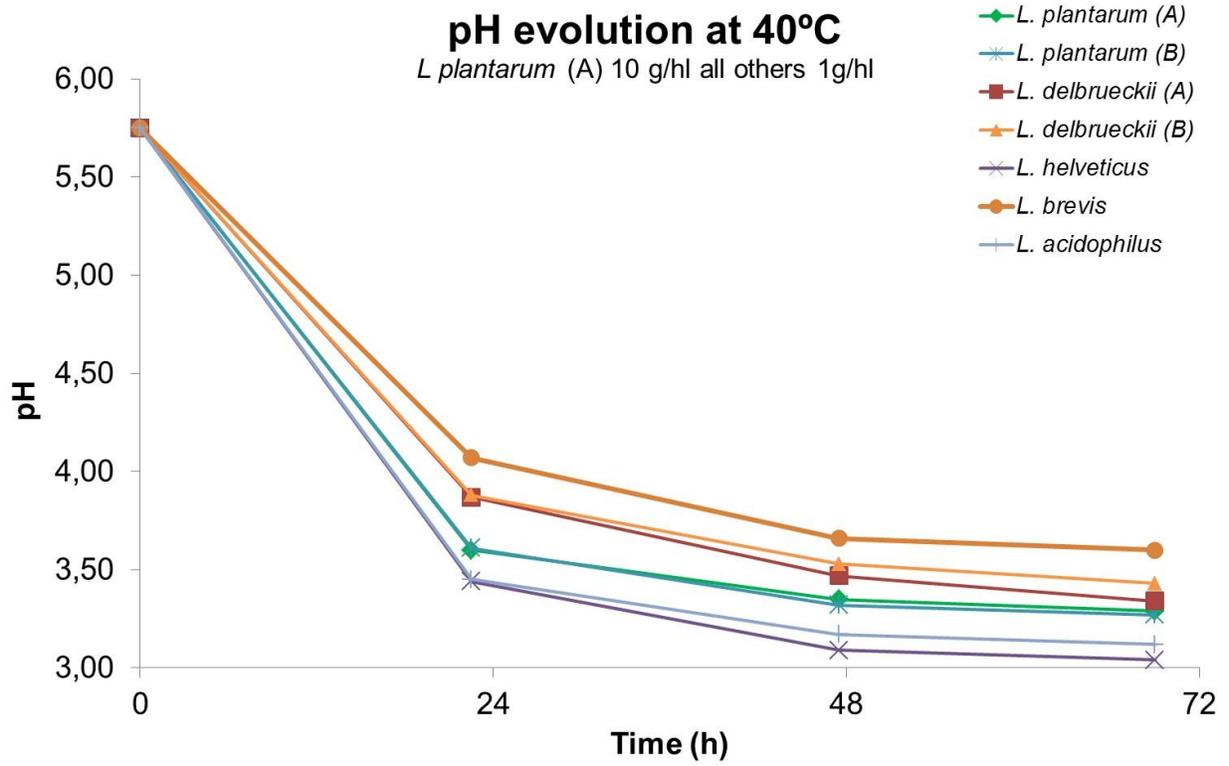
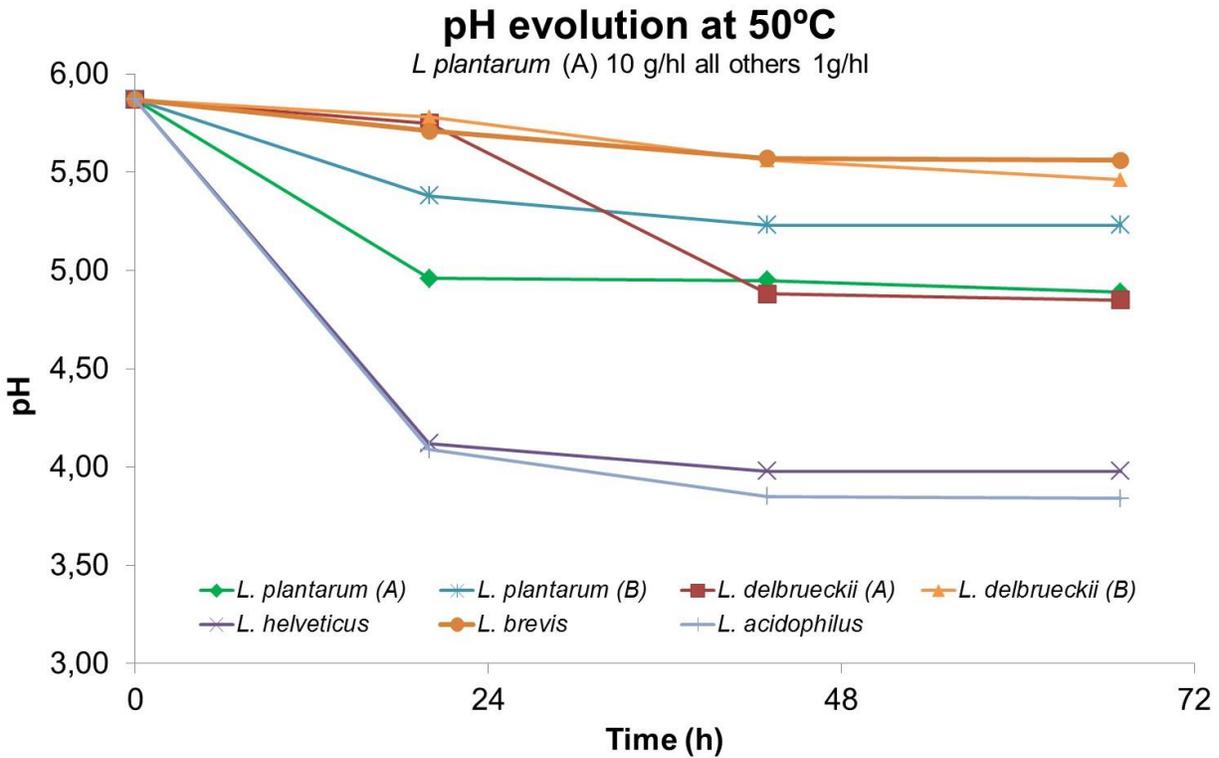


Figura 4 - Evolución del pH en un mosto de 12° Plato (50°C)



Conclusiones

L. helveticus y *L. acidophilus* mostraron la mayor actividad a 40°C, dando lugar a una alta concentración de ácido láctico en el mosto. Sin embargo, las que mostraron una actividad más rápida fueron las cepas *L. plantarum* (A y B) a 30°C. En relación con la producción de ácido acético, en la mayoría de las cepas se observaron mayores concentraciones a 20°C, mientras que a mayor temperatura se observaron valores inferiores.

La diversidad y funcionalidad de los lactobacilos es más que evidente. Prueba de ello son las distintas condiciones óptimas de cada especie estudiada en el este artículo, parámetros como la sensibilidad a la temperatura y la concentración de ácidos orgánicos producidos, entre otros metabolitos secundarios detectados sensorialmente. Mediante la identificación, caracterización y estudio del comportamiento de cada una de las subespecies en mosto y/o cerveza acabada, se pueden escoger las mejores cepas para la producción de cultivos puros de bacterias liofilizados para su uso en cervecería.

Actualmente en el banco de Lallemand hay disponible un amplio rango de cepas que, gracias a su alto rendimiento, fácil aplicación y comodidad, son una alternativa interesante para los cerveceros.

Para encuadrar en medio del artículo:

Técnicas para la acidificación

- **Acidificación del macerado (*Mash Sourcing*)**
 - Ajustar proporción de malta
 - Bacterias presente en la propia malta
 - Duración: 2 – 3 días
- **Acidificación en caldera (*Kettle Sourcing*)**
 - Mosto inoculado con lactobacilos
 - Duración: 2 -3 días
- **Co-fermentación**
 - Mezcla de levadura y bacterias
 - Tiempo dependiendo de los microorganismos empleados
- **Barrica/*Foeder*/espontánea**
 - En madera
 - Múltiples cepas de levaduras y bacterias
 - Gran complejidad

Ejemplo de un proceso de *kettle souring*

- 1) Maceración
- 2) Lauter/Filtración
- 3) Ebullición corta (2-5 minutos) para eliminar microorganismos presentes
- 4) Bajar pH con ácido láctico hasta 4,2-4,5 para inhibir microorganismos no deseados
- 5) Enfriar entre 30 y 40°C (según cepa de lactobacilo)
- 6) Inocular lactobacilo
- 7) Acidificación (pH=3,3 entre 14 y 36h según condiciones)
- 8) Ebullición (condiciones estándar)
- 9) Enfriamiento y fermentación

Principales bacterias lácticas

Lactobacillus plantarum
Lactobacillus helveticus
Lactobacillus brevis
Lactobacillus delbrueckii

BIBLIOGRAFIA:

Chris White & Jamil Zainasheff . *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation (Brewing Elements)*. 2010
Tobias Fischborn. Lallemand Brewing R&D (comunicación personal). 2017
Milk The
Funk http://www.milkthefunk.com/wiki/Table_of_Contents#Brewing_Techniques
Lactobacillus acidophilus