

# **INFLUENCIA DE LA REFERMENTACIÓN EN BOTELLA CON LEVADURAS *NO-SACCHAROMYCES* SOBRE LA CALIDAD DE LA CERVEZA**

Autor: Enrique Arévalo Fernández como Trabajo Fin de Master para obtener el título Máster Ingeniería Alimentaria aplicada a la Salud (SALINA) por la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) en junio de 2018. Tutores: María Jesús Callejo y Antonio Morata.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quería agradecer a Carlos Inaraja González, director de la revista “Cerveza y Malta”, tanto la oportunidad de escribir este artículo como su presencia en la defensa de mi Trabajo Fin de Máster. De igual modo, a María Jesús Callejo y Antonio Morata, coordinadores del Máster SALINA (Ingeniería Alimentaria Aplicada a la Salud de la Universidad Politécnica de Madrid), por la oportunidad de vivir una experiencia única investigando con un gran grupo de trabajo y con un tema de gran actualidad.

## **RESUMEN**

El gran desarrollo y crecimiento experimentado por el segmento de las cervezas artesanales en los últimos años, junto a la creciente demanda por parte de los consumidores de un producto único, con una calidad y complejidad sensorial cada vez mayores, ha abierto una nueva tendencia en el mercado. La investigación en cerveza también se ha visto influenciada por esta nueva tendencia. Hasta ahora, las levaduras más estudiadas y utilizadas de forma genérica en la producción de cerveza pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, pero los estudios recientes proponen la posibilidad de emplear levaduras *no-Saccharomyces*, principalmente, debido a sus aportaciones de compuestos metabólicos que participan de

forma positiva en esa calidad sensorial, tan deseada en las cervezas artesanales. Las aplicaciones de levaduras *no-Saccharomyces* han sido ya investigadas y utilizadas en enología desde hace años, sin embargo, en cerveza aún no está muy desarrollado. Por todo ello el presente estudio persigue como objetivo principal evaluar la influencia en la calidad de la cerveza de 4 cepas de especies de levaduras *no-Saccharomyces*, frente a una cepa de *S. cerevisiae* utilizada como control, en la etapa de refermentación o maduración en botella. Los géneros y especies utilizados fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Lachancea thermotolerans* y *Torulaspora delbrueckii*.

## TRABAJO REALIZADO

Con el objetivo de comparar sólo la influencia de las diferentes levaduras utilizadas en el estudio en la etapa de refermentación, lo primero es elaborar una cerveza verde (no madura) común para todas ellas. Para ello se utilizó un equipo de elaboración *HOMEMADE, brewferm*.

Las cepas de levaduras utilizadas en este estudio han sido las siguientes:

- *Saccharomyces cerevisiae*, cepa 7VA departamento de Química y Tecnología de alimentos.
- *Torulaspora delbrueckii* cepa 291 de Lallemand.
- *Lachancea thermotolerans* cepa kt 421 de Hansen.
- *Schizosaccharomyces pombe* cepa 938 de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI- CSIC). (Instituto de Fermentaciones Industriales Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ciencia e Investigación)
- *Saccharomyces ludwigii* cepa 979 de la colección del IFI- CSIC

Se llevó un control de los principales parámetros de elaboración: pH, densidad, grado alcohólico y temperatura. Todas las determinaciones se

realizaron por triplicado y fueron tratados estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) a través del programa Statgraphics Centurión XVI.

Una vez elaborado el mosto de malta y tras su fermentación principal, se obtuvieron los inóculos líquidos y se realizó el proceso de embotellado e inoculación de las levaduras seleccionadas con objeto de que llevaran a cabo la refermentación en botella. Se introdujo una cantidad de 7 ml. de inóculo en plena fase de fermentación tumultuosa en cada botella con 293 ml. de cerveza verde. Previamente, se disolvieron 8 gramos/litro de cerveza verde para la refermentación con el propósito de conseguir la presión y el CO<sub>2</sub> deseado. De esta forma se obtuvieron 6 botellines de tercio por cepa, es decir, dos tandas de triplicados.



La etapa de refermentación en botella transcurrió a temperatura controlada a 20° C. Con el fin de evaluar la influencia del tiempo de refermentación en botella sobre la calidad final de la cerveza, se realizaron dos análisis (a las 4 y a las 9 semanas del embotellado). Para analizar la calidad de la cerveza se llevaron a cabo controles tanto instrumental como sensorial. En cuanto al análisis instrumental, se obtuvieron los siguientes parámetros: pH final, grado alcohólico final y por último determinación de compuestos volátiles y productos metabólicos de fermentación a través de un cromatógrafo de masas con detector FID. Para el análisis sensorial se realizaron dos catas con 9 jueces entrenados, donde se valoraron distintos parámetros visuales, olfativos y gustativos.

Obtenidos los diferentes resultados, se realizó una discusión de los mismos a la luz de los datos recogidos en la bibliografía consultada. Se elaboró matriz

de correlaciones para obtener posibles relaciones entre los resultados del análisis instrumental y sensorial.

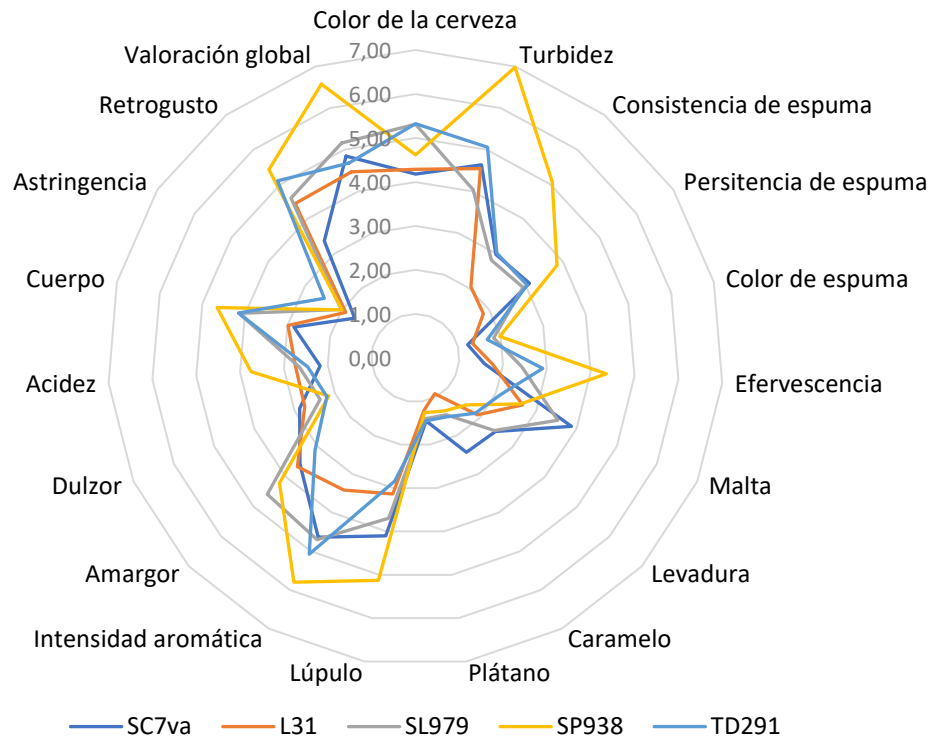
A continuación, se exponen algunos de los resultados obtenidos en el presente estudio: una tabla resumen de los resultados instrumentales, y un gráfico con los datos sensoriales. Ambos proceden del análisis realizado a las 9 semanas de maduración.

*Resultados de la analítica instrumental: pH, grado alcohólico y compuestos volátiles más importantes (mg/L)*

<b>Parámetro /Levadura</b>	<b>S.c</b>	<b>L.t</b>	<b>S.l.</b>	<b>S.p</b>	<b>T.d</b>	<b>Cerveza verde</b>
<b>pH</b>	4,09 ± 0,02a	4,07 ± 0,04a	4,08 ± 0,06a	4,18 ± 0,01b	4,09 ± 0,01a	4,11 ± 0,02a
<b>° Alcohólico(%v/v)</b>	6,73	6,8	6,76	7,5	6,85	5,9
<b>acetaldehído</b>	17,95 ± 0,32b	30,41 ± 2,02d	11,74 ± 1,7a	23,93 ± 0,98c	9,38 ± 0,8a	8,67 ± 0,4a
<b>diacetilo</b>	3,11 ± 0,32b	7,37 ± 0,87b	3,10 ± 0,09a	1,93 ± 0,38a	1,93 ± 0,07a	2,76 ± 0,9a
<b>Alcoholes superiores</b>	399,6 ± 9,0c	482,2 ± 7,5d	354,1 ± 40,2bc	285,9 ± 6,8a	340,1 ± 46,6b	-
<b>Ésteres</b>	106,3 ± 3,7d	122,6 ± 11,9e	96,7 ± 13,27d	37,48 ± 0,78a	62,5 ± 1,2b	-
<b>Volátiles totales</b>	966,2 ± 14,4c	1.151,8 ± 28,8d	878,6 ± 83,4b	737,1 ± 19,1a	816,6 ± 63,5ab	-

Los valores representan el promedio ± su desviación estándar y las letras diferentes de la misma fila indican diferencias significativas para un nivel de significación <0,05, según el test de LSD. S.c: *Saccharomyces cerevisiae* 7VA; L.t: *Lachancea thermotolerans* kt 421; S.p: *Schizosaccharomyces pombe* 938; S.l: *Saccharomyces ludwigii* 979; T.d: *Torulaspora delbrueckii* 291. Los valores de los compuestos volátiles están en mg/L.

### Tela de araña de la analítica sensorial.



## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

Las levaduras utilizadas en este estudio han mostrado diferencias significativas en los parámetros tanto instrumentales como sensoriales. Por lo que se puede concluir que los productos finales son significativamente diferentes, dando lugar a cervezas distintas con matices marcados y definidos.

*S. pombe* demostró una capacidad de refermentación mayor que el resto de levaduras, lo que produjo un mayor grado alcohólico, un mayor pH y puntuaciones más elevadas, por parte de los jueces, en la mayoría de atributos sensoriales, aunque ello no significó una mayor concentración de compuestos volátiles de fermentación.

La cerveza obtenida a partir de *L. thermotolerans* fue la mayor producción de compuestos volátiles de fermentación registró. Hecho que no quedó refrendado en el análisis sensorial por el panel de jueces.

*S. cerevisiae* destacó por su marcado perfil aromático en la cerveza frente al resto de levaduras, sobre todo destacando en aromas a levadura y malta.

*S. ludwigii*, además de mostrar un pobre perfil aromático en la cerveza, fue la única a la que se le atribuyeron olores a reducción y sulfhídrico, aromas indeseados en cervezas de calidad.

La cerveza refermentada en botella con *T. delbrueckii* mostró una cantidad de diacetilo muy alta y una valoración elevada por el panel de jueces, destacando por su peculiar perfil aromático y sabor equilibrado.

El análisis de la correlación entre los resultados instrumentales y sensoriales sirvió para apoyar la hipótesis de que la mayor capacidad fermentativa, es decir una producción superior de CO<sub>2</sub> y etanol, está directamente relacionada con una mayor consistencia y persistencia de espuma, efervescencia y turbidez.

La influencia del tiempo de guarda, en la maduración de la cerveza, se ha demostrado que es positiva. Destacando la reducción de diacetilo y aumentando la complejidad en la calidad sensorial de la cerveza.

Como comentario final, el sector cervecero artesanal está experimentando una época de expansión. Una de las vías interesantes para desarrollar nuevos productos en este mercado, ya de por sí muy diferenciado, es el uso de levaduras *no-Saccharomyces*, tal y como se ha venido haciendo muy recientemente en el sector enológico. Por lo tanto, todavía queda un largo camino por recorrer.

## **RESUMEN BIBLIOGRAFÍA:**

Principal bibliografía empleada en la discusión de los resultados obtenidos en este estudio:

Alba R. Influencia de levaduras no- *Saccharomyces* en la fermentación y envejecimiento de cerveza. Trabajo fin de Máster, Universidad Politécnica de Madrid, 2017.

- Basso R, Alcarde A, Portugal C. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? .Food Research International. 2016; 86: 112-120.
- Schizosaccharomyces pombe: A Promising Biotechnology for Modulating Wine Composition
- Loira, I., Morata, A., Palomero, F., González, C., Suárez-Lepe, J. A. Fermentation 2018, 4(3), 70; <https://doi.org/10.3390/fermentation4030070>
- Callejo MJ, González C, Morata A. Use of Non- *Saccharomyces* Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers. Brew Technol 2017;101–19.
- Callejo, Maria Jesús; González, Carmen; Morata A. Aplicaciones biotecnológicas recientes en la elaboración de cerveza. 2017;28–32.
- Canonico L, Agarbati A, Comitini F, Ciani M. *Torulaspota delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. Food Microbiology. 2016; 56: 45-51.
- Del Fresno JM, Morata A, Loira I, Bañuelos MA, Escott C, Benito S, et al. Use of non-Saccharomyces in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. Eur Food Res Technol. 2017;243(12):2175–85.
- Domizio P, House JF, Joseph CML, Bisson LF, Bamforth CW. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer †. 2016.
- GACBB. Global Association of Craft Beer Brewers 2018. Garavaglia C, Swinnen J. Economic Perspectives on Craft Beer: A Revolution in the Global Beer Industry. Springer; 2017.
- Kunze W, Pratt S, Manger H. Technology brewing and malting. Berlín: VLB; 2004.
- Loira I, Morata A, Comuzzo P, Callejo MJ, González C, Calderón F, et al. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspota delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality., 2015.

- Martínez Muñoz A. Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial. Trabajo fin de Grado, Universidad de Lleida, 2015.
- Morata A, Benito S, Loira I, Palomero F, González MC, Suarez-Lepe JA. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *Int J Food Microbiol.* 2012;159(1):47–53.
- Schutter DP De, Saison D, Delvaux F, Derdelinckx G. *The Chemistry of Aging Beer.* 2009.
- Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen K, Derdelinckx G, Verachtert H. Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2003; 62(2-3): 140-150.
- Yeo HQ, Liu SQ. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. *Int J Food Sci Technol.* 2014;49(7):1607–18.