

LEVADURAS SACCHAROMYCES PROCEDENTES DEL VINO PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANA



Este trabajo forma parte del Doctorado Industrial llevado a cabo por Vanesa Postigo en Cervezas La Cibeles y en colaboración con el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), bajo la dirección de la Dra. Teresa Arroyo (IMIDRA) y David Castro (Cervezas La Cibeles).

Resumen

Diversos estudios recientes han destacado el potencial que pueden presentar levaduras salvajes del género *Saccharomyces*, en lo que se refiere al aporte de nuevos perfiles aromáticos, además de conferir propiedades funcionales a la cerveza. En este sentido, se ha visto que levaduras aisladas de sustratos como el vino, pan o la kombucha pueden ser de interés para su empleo en la elaboración de cerveza. La finalidad de este estudio fue determinar la idoneidad de 141 cepas de levadura *Saccharomyces* aisladas de la agricultura madrileña (uvas, mosto, vino, viñedos y bodegas) para la elaboración de diferentes tipos de cerveza. Se analizaron diferentes parámetros fermentativos, se determinó la concentración de 33 compuestos aromáticos diferentes, así como la producción de melatonina. Todos los ensayos fueron contrastados frente a la cepa comercial S-04 (SafAle, Fermentis). Los resultados obtenidos permitieron seleccionar 10 cepas de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la más relevante la cepa G 520, que mostró alta producción de ésteres, alcoholes superiores y ácidos, en comparación con la cepa control S-04. La atenuación aparente obtenida por la cepa G 520 fue menor que la cepa comercial, lo que se traduce en una concentración superior de azúcares residuales, aspecto que fue valorado positivamente por el panel de cata y por los consumidores. Así mismo, la cepa G 520 produjo una mayor concentración de melatonina, y presentó mayor capacidad antioxidante en relación con la cepa comercial S-04. Con estos resultados y junto a los obtenidos en el estudio de consumidores, se pudo concluir que la cepa de levadura seleccionada G 520 presentaba aptitudes adecuadas para la elaboración de una cerveza con características destacables en el actual mercado y más en concreto una cerveza pale ale novedosa.

Palabras clave: cerveza, *Saccharomyces cerevisiae* salvaje, compuestos volátiles, cerveza funcional

Abstract

Several recent studies have highlighted the potential of wild yeasts of the genus *Saccharomyces* to provide new aromatic profiles, in addition to conferring functional properties to beer. In this sense, it has been shown that yeasts isolated from substrates such as wine, bread or kombucha can be of interest for use in beer brewing. The aim of this study was to determine the suitability of 141 *Saccharomyces* yeast strains isolated from Madrid agriculture (grapes, must, wine, vineyards and wineries) for the production of different types of beer. Different fermentation parameters were analyzed, the concentration of 33 different aromatic compounds was determined, as well as the production of melatonin. All assays were tested against the commercial strain S-04 (SafAle, Fermentis). The results obtained allowed the selection of 10 yeast strains of the *Saccharomyces cerevisiae* species, the most relevant being strain G 520, which showed high production of esters, higher alcohols and acids, compared to the control strain S-04. The apparent attenuation obtained by strain G 520 was lower than the commercial strain, which translates into a higher concentration of residual sugars, an aspect that was positively valued by the tasting panel and by consumers. Likewise, strain G 520 produced a higher concentration of melatonin and had a greater antioxidant capacity than the commercial strain S-04. With these results and together with those obtained in the consumer study, it was possible to conclude that the selected yeast strain G 520 presented suitable aptitudes for the production of a beer with outstanding characteristics in the current market and more specifically a novel pale ale beer.

Keywords: beer; wild *Saccharomyces cerevisiae*; volatile compounds; functional beer

Introducción

La industria de la cerveza artesana ha crecido durante los últimos años en Europa, con el consecuente interés por parte de los consumidores de probar nuevos estilos y sabores. Para producir cervezas ale innovadoras con un valor añadido, los cerveceros han empleado una variedad de ingredientes, con un especial interés en las levaduras, siendo los principales objetivos el de mejorar la calidad de la cerveza, así como la eficiencia de la fermentación y proveer de notas sensoriales características a la cerveza. Por tanto, la elección de la levadura es un factor importante a tener en cuenta a la hora de elaborar una cerveza que sea apreciada por los consumidores y posea atributos característicos.

Durante el proceso de fermentación las levaduras, además de producir CO₂ y etanol, son responsables de la producción de numerosos subproductos, incluyendo los alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, cetonas vecinales (VDK), dióxido de azufre (SO₂), ácido láctico, ácido sulfhídrico (H₂S), además de otros ácidos. Los principales compuestos aromáticos deseables en la cerveza son los alcoholes y los ésteres, mientras que algunos compuestos como las VDKs, el H₂S y los ácidos orgánicos (hexanoico, octanoico, decanoico) pueden presentar aromas desagradables en la cerveza cuando sus concentraciones superan su umbral de percepción.

En comparación con las levaduras convencionales empleadas en la elaboración de cerveza, las levaduras no convencionales pueden aportar numerosos beneficios funcionales, como la producción de compuestos que otorguen a la cerveza propiedades antioxidantes, así como la producción de melatonina. La melatonina es una hormona reguladora del sueño ya que modula los ritmos circadianos y estacionales de las personas,

posee capacidad antioxidante y las levaduras pueden producirla durante el proceso de fermentación.

Materiales empleados para el desarrollo del proyecto

Se emplearon 141 cepas de levadura pertenecientes a la Colección de Levaduras Autóctonas del IMIDRA. Estas cepas fueron aisladas de diferentes localizaciones y ambientes (uvas, mosto, vino, viñedo y bodegas) pertenecientes a la D.O. Vinos de Madrid.

El mosto empleado para los diferentes experimentos fue elaborado en Cervezas La Cibeles, siguiendo en todos los ensayos la misma receta utilizada para elaborar cerveza tipo Ale.

Características analíticas del mosto	
pH	5,7
Densidad	11,6° Plato/1.047 g/cm ³
FAN (nitrógeno fácilmente asimilable)	235,7 ppm
Amargor	32,8 IBU

Tabla 1. Características del mosto

Preselección de levaduras a escala de laboratorio

La evaluación de la idoneidad de las 141 cepas de levadura *Saccharomyces* estudiadas se llevó a cabo mediante el estudio de la habilidad que presentaban las cepas para fermentar maltosa (azúcar más abundante en el mosto), la producción de H₂S (puede ocasionar malos aromas como el de huevos podridos), así como su comportamiento fermentativo en un volumen de 100 mL de mosto de cerveza. Del total de cepas estudiadas, únicamente 12 cepas no fermentaron la maltosa bajo condiciones anaerobias, y un 70,9% mostraron una producción moderada de H₂S, aunque posteriormente este aroma no fue detectado en las catas de las cervezas finales. Así mismo, las cepas restantes (129) mostraron una buena capacidad fermentativa, aunque inferior a la de la cepa S-04.

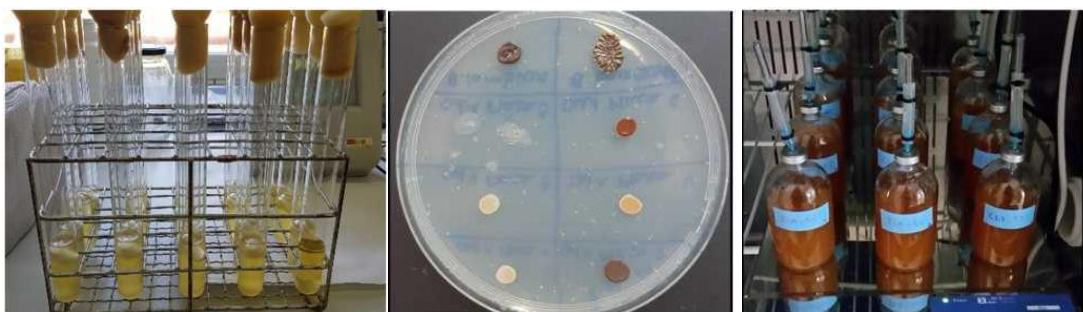


Imagen 1. Preselección de cepas

Tras este primer screening, 126 cepas de levadura fueron seleccionadas como aptas para su posterior ensayo a escala de 1 L, a una temperatura de 18 °C y en agitación.



Imagen 2. Fermentaciones 1 L

Cepa de levadura	Atenuación aparente (%)	Etanol % (v/v)
G 4	21,0	1,6
G 354	72,0	5,1
G 450	68,9	4,6
G 487	68,9	4,6
G 502	72,0	5,1
G 520	72,0	5,1
CLI 70	68,9	4,4
CLI 275	71,1	4,6
CLI 1056	64,0	4,0
CLI 1109	71,0	5,1
S-04	82,2	5,5

Tabla 2. Atenuación aparente y etanol producido por las cepas seleccionadas y S-04

En general, las cepas mostraron una buena cinética fermentativa con una duración de la fermentación de 7 a 10 días y una atenuación aparente de entre el 68,9 y el 72%, frente al 82,2% de la cepa comercial S-04. El etanol producido por las distintas cepas se situó en valores de 4,4 y 5,1%. Del conjunto de cepas analizadas, las cepas G 4 y CLI 1056 no fermentaron la totalidad del azúcar fermentable en el mosto, aunque mostraron un perfil aromático adecuado. Por tanto, este incremento de los azúcares residuales en la cerveza hace que aumente el dulzor de la misma y pueda influir en propiedades como la viscosidad, que contribuye al cuerpo de la cerveza. Estas cepas pueden ser empleadas para la elaboración de cerveza de bajo contenido en alcohol, ya que además reducen los aldehídos del mosto y por tanto se elimina el típico sabor a “mosto” de la cerveza.

En una segunda etapa de selección de las cepas en base a sus características organolépticas mediante la cata realizada por el panel de expertos del IMIDRA y junto con el equipo de La Cibeles, destacaron 10 cepas levaduras con el siguiente perfil organoléptico:

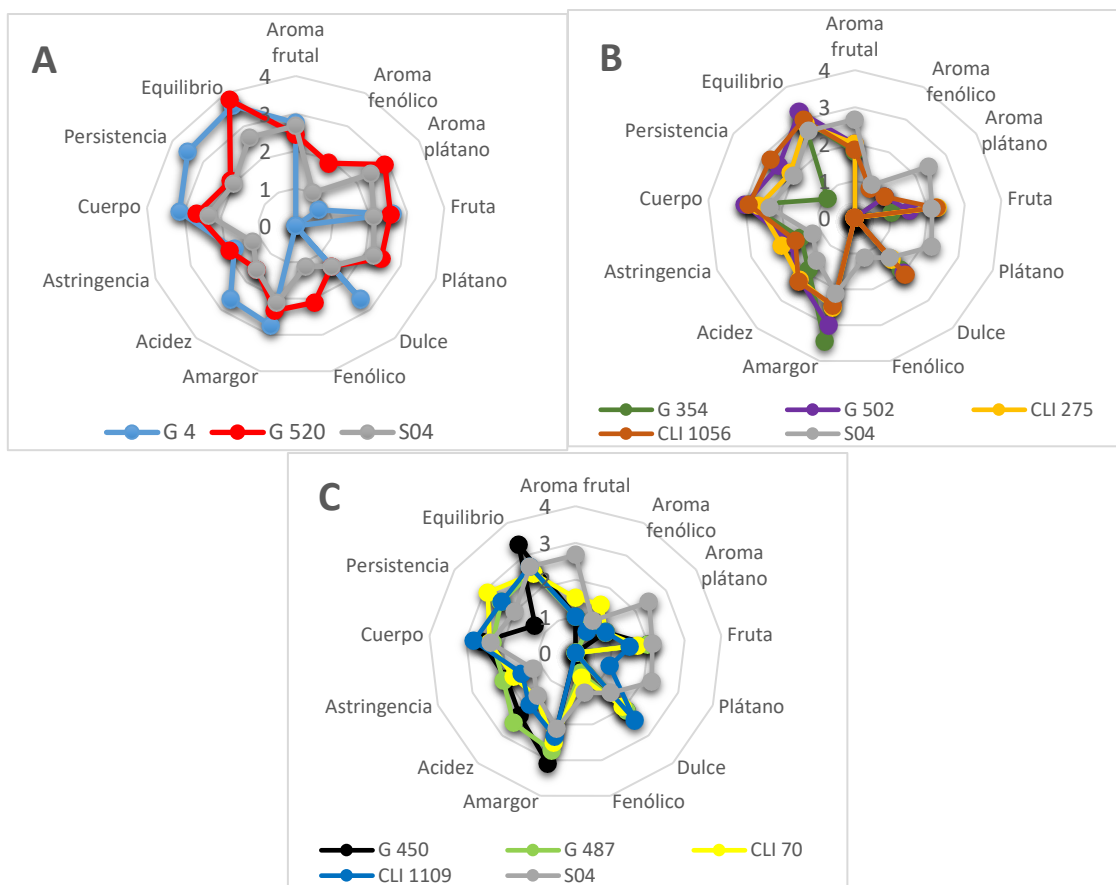


Imagen 3. Perfil aromático de las 10 cepas de levadura seleccionadas en comparación con S-04

Las cepas G 487, G 520, CLI 70, CLI 1056 y CLI 1109 mostraron un perfil aromático fenólico que no fue encontrado en el resto de las cepas. Los análisis de compuestos aromáticos indican que todas las cepas produjeron acetato de isoamilo, aunque en el análisis organoléptico sólo fue detectado en las cervezas elaboradas con las cepas G 520, CLI 1109 y S-04. En cuanto al amargor detectado en cata, su intensidad no pudo ser correlacionarla directamente con los resultados de los análisis efectuados ya que algunos componentes de la cerveza, así como el dulzor, pueden enmascarar la intensidad de dicho atributo. La cerveza más dulce, con buen rendimiento aromático y ausencia de aromas o sabores a mosto, correspondió a la elaborada con la cepa G 4, que no fermentó maltosa y se podría considerar por tanto como una buena candidata para la elaboración de cerveza de bajo contenido en etanol. Del conjunto de cepas seleccionadas, la cepa G 520 destacó por su aromas y sabores afrutados a plátano y fenólicos, además de presentar un buen equilibrio y persistencia media, lo que hace que la cerveza resultante sea más bebestible.

Las cervezas elaboradas con las 10 cepas seleccionadas fueron analizadas fisicoquímicamente y mostraron las siguientes características analíticas:

Cepa de levadura	de Ácido láctico (ppm)	Color (EBC)	Amargor (IBU)	VDKs (ppm)	SO ₂ (ppm)
G 4	208,5	12,0	34,4	≤0,05	≤1
G 354	278,5	11,0	30,6	≤0,05	1,9
G 450	266,0	11,0	28,6	≤0,05	2,1
G 487	417,5	11,0	32,3	≤0,05	1,7

G 502	236,0	11,0	20,8	≤0,05	≤1
G 520	321,0	13,0	21,8	0,03	≤1
CLI 70	317,3	12,0	23,1	0,02	≤1
CLI 275	232,0	11,5	24,6	0,07	≤1
CLI 1056	259,3	10,5	17,3	0,03	≤1
CLI 1109	248,5	12,0	21,9	≤0,05	3,6
S-04	321,0	13,0	16,5	0,11	≤1

Tabla 3. Parámetros analíticos de las cervezas obtenidas con las distintas cepas

Atendiendo a cada uno de los parámetros analizados, en la producción de **ácido láctico** cabe destacar la cepa G 487, cuya concentración obtenida se encuentra por encima del umbral de percepción del ácido láctico (400 ppm). Las diferencias encontradas en el **color** no son muy grandes, pero si se puede observar como las cepas de levadura han influido en el color debido a la oxidación y oscurecimiento de las melanoidinas. Las melanoidinas son compuestos que se producen durante el malteado de la cebada, además están influenciadas por el tipo de malta que se esté empleando. Así mismo, diversos estudios han demostrado que las levaduras de alta fermentación pueden oxidar las melanoidinas presentes en la cerveza y obtener así una tonalidad más oscura en la misma. En cuanto al **amargor** y en comparación con la cepa comercial S-04, se han producido diversas variaciones (17,3 – 34,4 IBU) respecto al amargor inicial del mosto (32,8 IBU). Algunos estudios sugieren que las moléculas de α -ácidos del lúpulo podrían adherirse a las paredes de las células de levadura y por tanto sedimentarse junto a estas una vez finalizada la fermentación, disminuyendo así su amargor. Las **cetonas vecinales** (VDKs) engloban al diacetilo y a la 2,3-pentanodiona, que otorgan aromas y sabores a mantequilla en la cerveza, con lo cual no es un parámetro deseado. Sin embargo, todas las cepas seleccionadas mostraron una concentración por debajo del umbral de detección. Los niveles de **SO₂** obtenidos en las distintas cervezas se encontraban por debajo del límite legal establecido en España de 10 ppm, por lo que además no otorgaban aromas desagradables a la cerveza, pudiendo incluso contribuir a la estabilización de la cerveza en bajas concentraciones.

Los compuestos aromáticos más abundantes en la cerveza son los alcoholes superiores, aunque el grupo más importante es el de los ésteres. Los ésteres presentan umbrales de percepción más bajos que los alcoholes, y es por ello que pueden presentar una mayor incidencia organoléptica durante la cata. Así mismo también están presentes ácidos grasos, aldehídos/cetonas y compuestos fenólicos como el guaiacol, que aporta un carácter ahumado a la cerveza.

Cepa de levadura	Alcoholes superiores	Ésteres	Ácidos grasos	Aldehídos/cetonas	Guaiacol
G 4	36,9	0,7	6,3	0,6	0,06
G 354	94,8	1,3	14,7	0	0
G 450	75,9	1,0	14,8	0	0,03
G 487	97,4	0,9	11,7	0	0
G 502	76,4	2,1	16,7	0	0,03
G 520	177,3	3,1	22,3	0	0,05
CLI 70	84,5	1,8	15,1	1,7	0
CLI 275	98,7	1,2	18,2	0	0
CLI 1056	132,2	0,8	14,4	0	0
CLI 1109	129,4	2,4	18,3	0	0,03
S-04	139,1	2,9	17,1	0,7	0,13

Tabla 4. Concentración de los diferentes grupos de compuestos aromáticos producidos por las 10 cepas y S-04 (mg/L)

El contenido total en **alcoholes superiores** osciló entre 36,9 y 177,3 mg/L, siendo las concentraciones obtenidas para los diferentes compuestos analizados, inferiores a su umbral de percepción. La cepa que mayores concentraciones de **ésteres** produjo fue la cepa G 520. Los ésteres van a ser los responsables de aportar el carácter afrutado a la cerveza, siendo uno de los más llamativos el acetato de isoamilo que aporta aroma y sabor a plátano. En este caso las cepas G 520, CLI 1109 y S-04 fueron las que produjeron concentraciones por encima del umbral de percepción. Los **ácidos grasos** estudiados producen los llamados “off flavours” en cerveza y correspondieron por una parte a aquellos que producen aroma caprístico y los que aportan aromas a queso rancio. Únicamente se superó el umbral del ácido butírico (aroma a vómito de bebé) en las cepas G 450, G 487, G 520, CLI 275 y CLI 1056, sin embargo, no fue un aroma detectado durante las catas. Dentro de los “off flavours” también nos encontramos con aquellos aromas fenólicos que aportan aromas a clavo o aromas ahumados, característicos de determinados estilos de cerveza, por lo que dependiendo del estilo que se quiera desarrollar, se pueden considerar como deseados o no deseados. A su vez, en el estudio se analizó la producción de **guaiacol** (aroma/sabor ahumado), para el que las cepas G 4, G 450, G 502, G 520 y CLI 110 mostraron valores superiores a su umbral de detección (0,004 mg/L).

Cervezas funcionales

Las cervezas funcionales se definen como aquellas que aportan beneficios a la salud bajo un consumo moderado. En este caso, la melatonina tiene una especial mención, ya que es una hormona capaz de regular los ritmos circadianos, además de aportar una capacidad antioxidante.

Cepa de levadura	Melatonina (ng/mL)
G 4	33,6
G 354	nd
G 450	30,1
G 487	26,0
G 502	5,0
G 520	28,9
CLI 70	31,6
CLI 275	nd
CLI 1056	56,5
CLI 1109	27,4
S-04	20,4

Tabla 5. Concentración de melatonina producida por las distintas cepas.
nd = no detectado

Los niveles de melatonina detectados fueron de entre 5 y 56,1 ng/mL, siendo superiores a los que se pueden encontrar en otros alimentos como el pan, tomate, té negro (entre 0,012 y 0,529 ng/mL).

Así mismo, se determinó la capacidad antioxidante total de las cervezas fermentadas con las diferentes cepas de levadura. Para ello se empleó el equipo eBQC que mide la

capacidad antioxidante a dos niveles: compuestos de oxidación rápida (Q1) y compuestos con un mayor potencial que se oxidan más lentamente (Q2).

Cepa de levadura	Q1	Q2	Qt
G 4	3,0	6,2	9,2
G 354	3,9	9,1	13,0
G 450	3,9	8,6	11,6
G 487	3,4	8,3	11,6
G 502	4,4	9,1	13,5
G 520	4,7	8,7	13,4
CLI 70	3,8	8,5	12,4
CLI 275	4,7	8,8	13,7
CLI 1056	4,3	8,9	13,2
CLI 1109	4,1	8,2	12,3
S-04	3,8	8,4	12,2

Tabla 6. Niveles de capacidad antioxidante aportados por cada cerveza fermentadas con las diferentes cepas

En la mayoría de los casos, los valores obtenidos para las cepas estudiadas fueron superiores a los de la cepa comercial S-04.

Fermentación a escala industrial

La cepa finalmente seleccionada para su fermentación a escala industrial fue la G 520, por sus características obtenidas en los diferentes análisis, así como los resultados obtenidos por cata, ya que se ha visto que los consumidores tienen preferencia por aquellas cervezas que presentar perfiles afrutados principalmente.



Imagen 4. Fermentadores 100 L

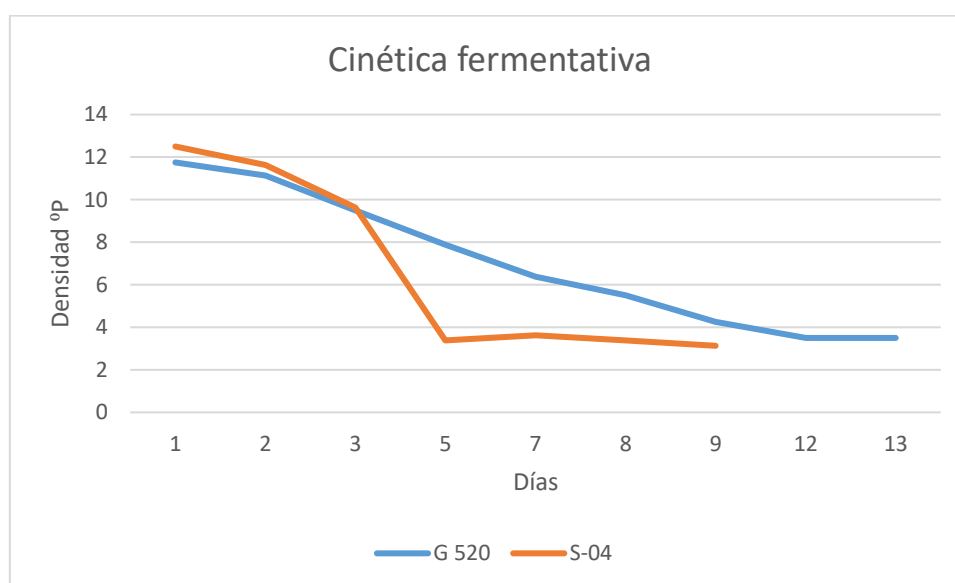
El escalado a la hora de seleccionar una cepa de levadura es un factor importante para determinar si se existe alguna variación en el producto obtenido. Para ello se llevaron a cabo fermentaciones en 100 L, donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Parámetros	G 520
Etanol % (v/v)	4,15
pH	4,5
Ácido láctico (mg/L)	268,5
Color (EBC)	5,5

Amargor (IBU)	22,4
SO ₂ (mg/L)	1,2
Alcoholes superiores totales (mg/L)	91,1
Ésteres totales (mg/L)	0,8
Ácidos grasos totales (mg/L)	13,0
Guaiacol (mg/L)	nd
Melatonina (ng/mL)	22,0
Capacidad antioxidante (mmol TE/L)	12,1

Tabla 7. Parámetros obtenidos en la fermentación de 100 L con la cepa G 520

En el escalado de 100 L se observó principalmente una reducción en la concentración de los diferentes compuestos analizados si se compara con la fermentación a escala de laboratorio en 1L, así como una prolongación en el tiempo de fermentación:



La fermentación en 100 L se realizó de manera estática, sin agitación, lo que puede incidir en la falta de homogenización del mosto y causar variaciones analíticas con respecto a los resultados obtenidos a escala de laboratorio, en los que sí se aplicó agitación. Por el contrario, el valor de amargor obtenido fue mayor, pudiendo ser la causa una menor biomasa de células a las que se pueden adherir las moléculas de α -ácidos y por tanto sedimentarse en el fermentador. Así mismo, también se pueden observar diferencias en el color puesto que, a escala de laboratorio, el mosto era previamente esterilizado (donde influyen las reacciones de Maillard), mientras que a escala industrial era directamente trasvasado al fermentador una vez macerado y enfriado.

Análisis de consumidores

La aceptabilidad por parte de los consumidores es la etapa final en la elaboración de un producto nuevo, para determinar así la idoneidad de la cerveza a escala industrial. El estudio se llevó a cabo con 112 voluntarios, de los cuales el 63,7% correspondía a mujeres y el 36,3% restante a hombres, con edades comprendidas entre los 20 y los 73 años. La fase visual la evaluaron con una consistencia de espuma ligera y una impresión general

de la cerveza ligeramente turbia. Los principales atributos aromáticos y de sabor que encontraron en cata fueron el lúpulo, cereal, fruta, plátano y fenólico. El 85% de los consumidores evaluaron el amargor como bajo-medio. Y para la impresión general de la cerveza en un rango de 1 a 9 se obtuvo una puntuación de 6,6 puntos para el 71,4% de los consumidores y una intención de compra del 67%.

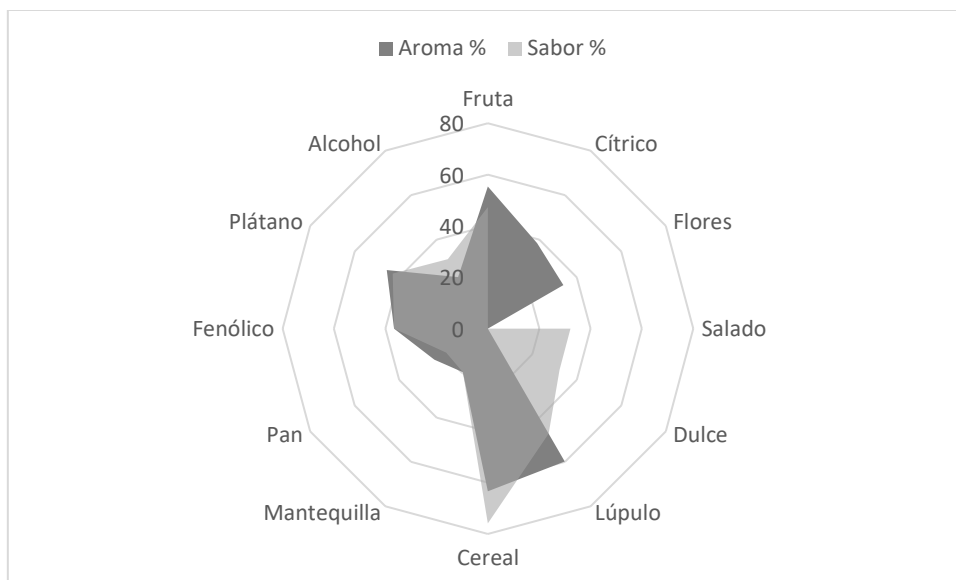


Imagen 5. Porcentaje de detección de diferentes parámetros por parte de los consumidores

Conclusiones

La finalidad de este estudio fue determinar la idoneidad de cepas de levaduras vínicas para la elaboración de cerveza, donde se obtuvieron diferentes comportamientos y perfiles aromáticos.

Entre las cepas que presentaron nula capacidad para la fermentación de la maltosa, el azúcar más abundante en el mosto, la cepa G 4 destacó por su aportación a la composición aromática, siendo por tanto considerada de interés para la elaboración de cerveza de bajo contenido en etanol o para su uso junto con otras levaduras en la mejora del perfil organoléptico de la cerveza. Las otras 9 cepas seleccionadas, fueron destacables frente al total de ensayadas por su composición aromática y de sabor, una acidez y amargor equilibrados, así como un marcado equilibrio entre aroma y sabor.

La cepa G 520 mostró unos niveles moderados en el contenido de ésteres y contenido de amargor, lo que marcó su preferencia por parte del panel de consumidores.

Las cepas seleccionadas mostraron una producción de melatonina, y una capacidad antioxidante superior a los contenidos medios establecidos para otros alimentos, pudiendo englobarse por tanto las cervezas producidas, como un alimento funcional bajo consumo moderado.

Agradecimientos

A la Dirección General de Investigación e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid por la concesión de ayuda a Cervezas La Cibeles y al IMIDRA

(IND2017/BIO7787) para la realización del Doctorado Industrial por parte de Vanesa Postigo.